

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Universität Würzburg

Lehrstuhl für Anatomie III

Vorstand: Prof. Dr. med. J. Waschke

Die Rolle von cAMP bei Pemphigus vulgaris

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius – Maximilians – Universität Würzburg

vorgelegt von

Franziska Vielmuth

aus Steinach

Würzburg, Februar 2014



Referent: Prof. Dr. med. Jens Waschke

Koreferent: Prof. Dr. med. Matthias Goebeler

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2014

Die Promovendin ist Ärztin.

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Epidermis	1
1.2. Interzellularkontakte	2
1.2.1. Desmosom	3
1.2.2. Desmosomale Cadherine	5
1.3. Cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP)	7
1.4. Die Rolle desmosomaler Cadherine in der Pathogenese von Erkrankungen	9
1.5. Pemphigus	10
1.5.1. Diagnostik und Therapie	13
1.5.2. Pathogenese von Pemphigus vulgaris	15
1.6. Fragestellung	20
2. MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 Testreagenzien und Antikörper	21
2.1.1. Testreagenzien	21
2.1.2. Antikörper	21
2.2. Zellkultur	23
2.3. Aufreinigung der Patientenautoantikörper und Kontrollantikörper	24
2.4. Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (EIA)	25

2.5. Bestimmung der Proteinkonzentration	26
2.5.1. Bradford-Methode	26
2.5.2. Amidoschwarz-Methode	27
2.6. Elektrophorese und Western-Blot	27
2.7. Indirekte Immunfluoreszenzdarstellung	30
2.8. Keratinozytendissoziationsversuch	31
2.9. In vivo Pemphigus-Maus-Modell	32
2.9.1. Mauslinie BALB/c und Durchführung	32
2.9.2. Aufarbeitung der Maushaut	33
2.10. Aufnahme und Auswertung des Daten- und Bildmaterials	34
3. ERGEBNISSE	36
3.1. Protektiver Effekt von cAMP bei Pemphigus vulgaris in vitro	36
3.1.1. Forskolin/Rolipram und Isoproterenol erhöhen die cAMP-Spiegel von HaCaT-Zellen.	36
3.1.2. Eine cAMP-Erhöhung vermindert die Dsg3-Reorganisation in vitro.	37
3.1.3. Durch cAMP-Erhöhung kann eine Reduktion des PV-IgG-induzierten Adhäsionsverlusts erreicht werden.	39
3.1.4. cAMP-Erhöhung blockiert die PV-IgG-induzierte Dsg3-Depletion.	41
3.2. cAMP-Erhöhung verhindert die Blasenbildung im Pemphigus-Maus-Modell.	43
3.3. Zellregeneration nach PV-IgG	47
3.3.1. PV-IgG erhöhen die intrazellulären cAMP-Spiegel in HaCaT-Zellen.	47
3.3.2. HaCaT-Zellen regenerieren innerhalb von 12 Stunden nach PV-IgG Inkubation.	50
3.3.3. Erhöhung des cAMP-Spiegels beschleunigt die Regeneration der Zelladhäsion in vitro.	52

3.4. cAMP-Erhöpfung vermindert die durch PV-IgG induzierte p38MAPK-Aktivierung.	54
4. DISKUSSION	56
4.1. cAMP wirkt protektiv bei Pemphigus vulgaris	56
4.1.1. cAMP-Erhöpfung verhindert den PV-IgG-induzierten Verlust der Zell-Zell-Adhäsion in Keratinozytenkultur und Blasenbildung im Pemphigus-Maus-Modell.	56
4.1.2. cAMP-Erhöpfung vermindert die Dsg3-Reorganisation und Depletion in der Keratinozytenkultur.	59
4.2. Der protektive Effekt von cAMP könnte durch die Hemmung der p38MAPK-Aktivierung zustande kommen.	60
4.3. Die cAMP-Erhöpfung könnte einen zellulärer Rettungsmechanismus darstellen.	61
4.4. Ausblick	64
5. ZUSAMMENFASSUNG	65
6. LITERATUR	67
7. ANHANG	79
7.1. Abkürzungsverzeichnis	79
7.2. Danksagung	82
7.3. Lebenslauf	83

1. EINLEITUNG

1.1. Epidermis

Die Hautdecke des Menschen besteht aus drei Schichten: Epidermis, Dermis und Subkutis. Sie erfüllt als äußere Abdeckung des Körpers lebenswichtige Funktionen wie den Schutz vor Wasserverlust und schädigenden Einflüssen der Umwelt. Als Sitz von Schmerz-, Temperatur- und Empfindungsrezeptoren ermöglicht sie weiterhin die Aufnahme verschiedener Reize aus der Umwelt. Mit entsprechender Gefäßarchitektur und Schweißdrüsen leistet die Haut einen wichtigen Beitrag zur Thermoregulation des Körpers (Lüllmann-Rauch, 2012).

Bei der Epidermis handelt es sich um ein gefäßloses, verhorntes und mehrschichtiges Plattenepithel mit einer Dicke von ca. 50-100µm, das zu 90 Prozent aus Keratinozyten besteht. Als klassisches Proliferationsgewebe erneuert sich die Epidermis etwa alle vier Wochen, indem Keratinozyten in den Schichten nach oben wandern, verhornen und schließlich durch mechanische Reize abgeschilfert werden (Blanpain und Fuchs, 2009). Für den ständigen Zellnachschub ist das Stratum basale, eine einzelne Lage kubischer epidermaler Zellen direkt oberhalb der Basalmembran, verantwortlich. Es ist Ausgangspunkt der weiteren Differenzierung. Als nächste Schichten folgen das Stratum spinosum und das Stratum granulosum. In Letzterem lassen sich erstmalig Keratohyalin granula als Zeichen für den beginnenden Verhornungsprozess nachweisen. Die Letzte der insgesamt vier Epidermisschichten stellt das Stratum corneum dar; eine aus toten und verhornten Keratinozyten bestehende äußerste Schicht der Haut (Drenckhahn, 2008).

1.2. Interzellularkontakte

Zell-Zell-Kontakte sind essentiell für die Integrität, mechanische Stabilität und Polarität von Geweben. Beim Menschen gibt es dabei Kommunikationskontakte (Nexus), welche die chemische und elektrische Kopplung benachbarter Zellen vermitteln, Verschlusskontakte (Zonulae occludentes), die essentiell für die Etablierung der Epithel- und Endothelbarriere sind, und Adhäsionskontakte, die den mechanischen Zusammenhalt von Zellverbänden gewährleisten und auch das kortikale Zytoskelett in der Nähe der Plasmamembran organisieren. Sie können einzeln oder gemeinsam, beispielsweise als Schlussleistenkomplex, vorkommen (Niessen, 2007) und sind in intra- und interzelluläre Signalwege integriert, die sie z.T. auch aktiv modulieren (Green et al., 2010). Daneben gibt es Zell-Substrat-Kontakte wie Hemidesmosomen und fokale Kontakte, die es Zellen ermöglichen an Bindegewebelementen zu binden (Drenckhahn, 2008).

Adhäsionskontakte lassen sich in Desmosomen (Maculae adherentes) und Adhärenskontakte einteilen. Bei letzteren unterscheidet man Adhärenspunkte (Puncta adherentia), Adhärensgürtel (Zonulae adherentes) und Adhärensstreifen (Fasciae adherentes) voneinander (Drenckhahn, 2008). Adhärenskontakte bestehen grundsätzlich aus zwei Bindungseinheiten: zum einen aus dem Nektin-Afadin Komplex; zum anderen aus dem Cadherin-Catenin-Komplex. In Letzteren sind mit den klassischen Cadherinen die Haftmoleküle lokalisiert, die ebenso wie die desmosomalen Cadherine zur Cadherinsuperfamilie gehören (Niessen, 2007). Klassische Cadherine sind Ca^{2+} -abhängige, homophil bindende Adhäsionsmoleküle mit einer Transmembrandomäne. Sie werden meist nach dem Gewebe benannt, in dem sie vorwiegend vorkommen; so ist z.B. E-Cadherin vorwiegend in epithelialen Geweben, N-Cadherin in Nervengewebe und VE-Cadherin (VE: engl.: *vascular endothelial*) im Gefäßendothel exprimiert (Gumbiner, 2005). Ihre zytoplasmatische Domäne bindet direkt an p120- und β -Catenin, zwei Vertreter der Armadilloproteinfamilie, sowie indirekt an α -Catenin; über diesen intrazellulären Komplex wird eine Verbindung zum

Aktinzytoskelett hergestellt (Shapiro und Weis, 2009). Neben ihrer Aufgabe als Adhäsionsstrukturen erfüllen die Komponenten der Adhärenskontakte eine Vielzahl weiterer Funktionen z.B. im Rahmen von Wachstums- und Differenzierungsprozessen, sowie bei der Ausbildung von polaren Geweben. Desweiteren sind sie an verschiedenen Signalkaskaden beteiligt (Niessen und Gottardi, 2008).

1.2.1. Desmosom

Der Begriff Desmosom setzt sich aus den griechischen Worten „desmos“ (Bindung) und „soma“ (Körper) zusammen und wurde erstmals 1920 von Josef Schaffner eingeführt, obgleich die Struktur bereits im 19. Jahrhundert von Giulio Bizzozero beschrieben wurde (Delva et al., 2009).

Desmosomen sind jene Adhäsionsjunctionen, die für eine starke Bindung zwischen Zellen verantwortlich sind (Thomason et al., 2010). Durch ihre Verankerung an Intermediärfilamenten des Zytoskeletts vermitteln sie mechanische Widerstandsfähigkeit und kommen entsprechend am zahlreichsten in Geweben vor, die ständig mechanischen Reizen ausgesetzt sind. Hierzu zählen das verhornte Plattenepithel der Haut, die Schleimhäute von Mundhöhle, Speiseröhre, Analkanal und Vagina sowie das Herz. Darüber hinaus lassen sich Desmosomen aber auch in einfachen Epithelien im Schlussleistenkomplex und nicht epithelialen Zellen wie etwa Neurothelzellen der Arachnoidea und follikulär dendritischen Zellen von Lymphfollikeln nachweisen (Waschke, 2008).

Desmosomen besitzen einen Durchmesser von 0,2-0,5µm und bestehen ultrastrukturell aus zwei symmetrisch angeordneten Plaques auf der zytoplasmatischen Seite von zwei aneinanderhaftenden Zellen sowie einem extrazellulären Teil, der die Plasmamembranen der benachbarten Zellen circa 30nm voneinander trennt und durch eine verdichtete Mittellinie charakterisiert ist (Thomason et al.,

2010). Innerhalb der intrazellulären Plaques kann eine innere von einer elektronendichteren äußeren Membranplaque unterschieden werden.

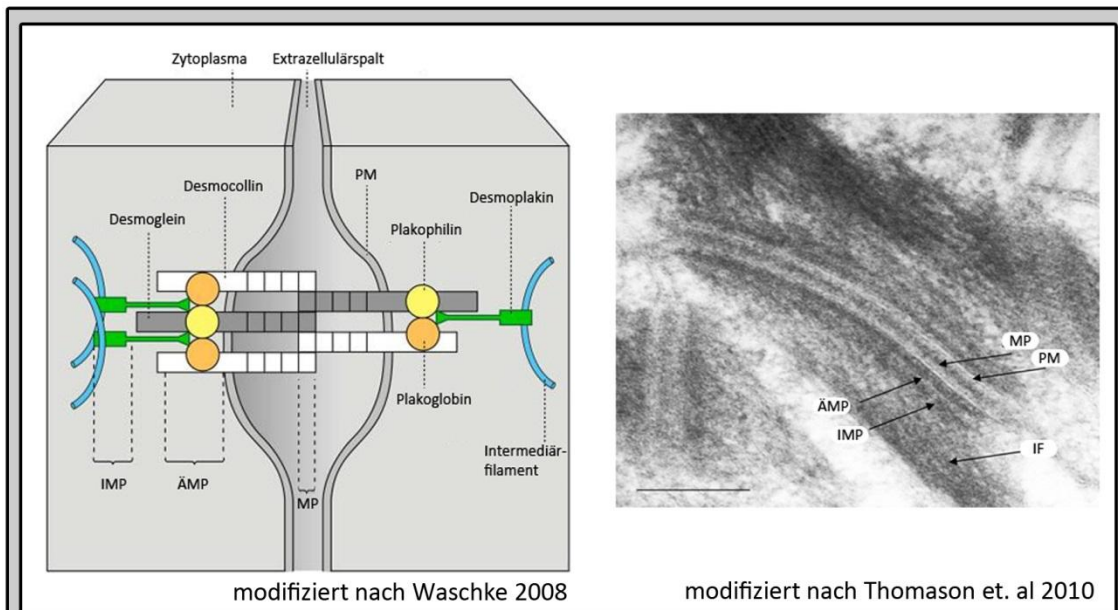


Abb. 1: Aufbau eines Desmosoms

Links: schematische Darstellung eines Desmosoms; rechts: entsprechende elektronenmikroskopische Darstellung. Die desmosomalen Cadherine (Desmocolline (Dsc) und Desmogleine (Dsg)) durchspannen die Plasmamembran (PM) und interagieren mit ihren Extrazellulärdomänen, elektronenmikroskopisch als Mesophragma (MP) sichtbar. C-terminal binden die desmosomalen Cadherine an ihre jeweils spezifischen Adaptermoleküle Plakoglobin bzw. Plakophilin über die sie mit Desmoplakin verknüpft sind. Dieser Bereich ist elektronendichter und wird als äußere Membranplaque (ÄMP) bezeichnet. Von intrazellulär strahlen Intermediärfilamente (IF) ein und werden durch Bindung an Desmoplakin am Desmosom verankert. Dieser ebenfalls elektronendichtere Bereich wird als innere Membranplaque (IMP) bezeichnet (Waschke 2008).

Desmosomen bestehen aus Vertretern von drei Proteinfamilien: desmosomale Cadherine sowie Proteine der Armadillo- und Plakinfamilie (Yin und Green, 2004). Die desmosomalen Cadherine durchspannen den Interzellularspalt und vermitteln durch Bindung aneinander die Haftung, während die anderen Proteingruppen die desmosomalen Plaques bilden (Waschke, 2008). Zur Familie der Armadilloproteine zählt Plakoglobin (PG), welches auch in Adhärensjunktionen zu finden ist und desmosomale Cadherinen mit Desmoplakin verbindet (Cowin et al., 1986; Waschke, 2008). Daneben kann es aber auch mit den Plakophilinen (PKP) 1-3 interagieren,

welche ebenfalls zu dieser Gruppe gehören. Sie binden gleichsam an eine Vielzahl von weiteren desmosomalen Proteinen, darunter desmosomale Cadherine und Desmoplakin, sowie Intermediärfilamente (Bass-Zubek et al., 2009; Hofmann et al., 2000) und stabilisieren dabei die desmosomale Plaque. Darüber hinaus spielen sie eine wichtige Rolle beim Desmosomenzusammenbau sowie bei der Regulation verschiedener Signalwege an der Zellgrenze und im Zellkern (Hatzfeld, 2007). Desmoplakin gehört zur Plakinfamilie, bindet an PG und PKPs und verankert intrazellulär Intermediärfilamente im Desmosom (Sonnenberg und Liem, 2007). Bei Intermediärfilamenten handelt es sich um eine gewebs-, differenzierungs- und zelltypspezifische, hochkonservierte Proteingruppe, die für die Stabilisierung der Zellstruktur essentiell ist, aber auch an Zellwachstum, Proliferation und vielen weiteren Prozessen beteiligt ist (Pan et al., 2013). In der Epidermis ist das Netz der Intermediärfilamente aus Zytokeratinen aufgebaut, wobei sich in den basalen Zellschichten vor allem Zytokeratin 5 und 14 finden, während in den oberflächlichen Schichten vor allem Zytokeratin 1 und 10 vorkommen (Chu und Weiss, 2002). Desmosomen sind keine starren Gebilde, sondern können verschiedene Veränderungen von Geweben z.B. während der Embryogenese oder der Wundheilung mittragen und auf äußere Einflüsse verschiedenartig reagieren. Ihre Funktion geht damit über die einfache Zellhaftung weit hinaus (Thomason et al., 2010; Yin und Green, 2004).

1.2.2. Desmosomale Cadherine

Desmosomale Cadherine sind Vertreter der Cadherinsuperfamilie, die ähnlich wie die klassischen Cadherine Ca^{2+} -abhängig bindende Glykoproteine mit einer Transmembrandomäne sind. Dabei werden vier Desmogleine (1-4) und drei Desmocolline (1-3) unterschieden (Yin und Green, 2004). 30% der Aminosäuren sind bei den Desmogleinen, Desmocollinen und den klassischen Cadherinen homolog (Brooke et al., 2012). Ihr ultrastruktureller Aufbau besteht aus vier hochkonservierten Extrazellulärdomänen, einem extrazellulären Anker gefolgt von einem

membrandurchspannenden Bereich, der wiederum von einem intrazellulären Anker und variablen intrazellulären Domänen vervollständigt wird (Delva et al., 2009). Extrazelluläres Ca^{2+} trägt zur Adhäsion bei, indem es die Extrazellulärdomänen in eine rigide Konformation bringt (Pokutta und Weis, 2007). Die Interaktion der Extrazellulärdomänen kann bei desmosomalen Cadherinen im Gegensatz zu klassischen Cadherinen, bei denen wohl vorwiegend homophile Interaktionen auftreten, homo- als auch heterophil sein (Delva et al., 2009).

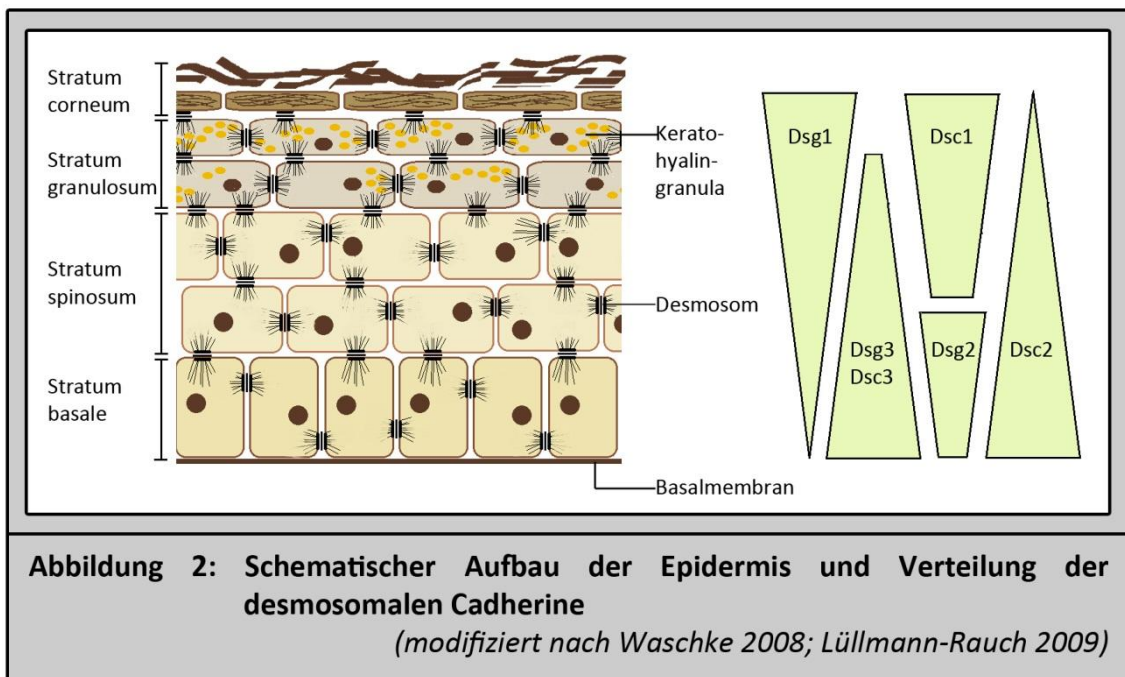


Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Epidermis und Verteilung der desmosomalen Cadherine
(modifiziert nach Waschke 2008; Lüllmann-Rauch 2009)

Beim Erwachsenen liegt eine gewebs- und differenzierungsspezifische Expression der desmosomalen Cadherine vor. So sind Desmoglein 2 (Dsg2) und Desmocollin 2 (Dsc2) wohl in allen Desmosomen-tragenden Geweben zu finden (Dusek et al., 2007) und als einzige Vertreter der desmosomalen Cadherine in einschichtigen Epithelien, Haarfollikeln und dem Myokard exprimiert (Hartlieb et al., 2013; Nuber et al., 1995; Schafer et al., 1994). Dagegen kommen Desmoglein 1 und 3 (Dsg1 und 3) sowie Desmocollin 1 und 3 (Dsc1 und 3) lediglich in mehrschichtigem Plattenepithel vor (Yin und Green, 2004). Auch innerhalb der Epidermisschichten existiert eine unterschiedliche Verteilung der desmosomalen Cadherine. Dsg1 und Dsc1 finden sich vorwiegend in den oberflächlichen Hautschichten, während Dsg3 und Dsc3 vor allen in

den basalen Epidermisschichten zu finden sind (Waschke, 2008). Die Expression von Dsg1 und 3 überlappt in der adulten, humanen Epidermis (Spindler et al., 2007). Dsc2 findet sich verstärkt in der tiefen Epidermis, wohingegen Dsg2 wohl lediglich in der Basal- und Suprabasalzellschicht, in der adulten Haut dagegen nur noch in Haarfollikeln zu finden ist (Hartlieb et al., 2013; Mahoney et al., 2006). Neben ihrer Lokalisation in Desmosomen können desmosomale Cadherine auch extradesmosomal in der Zellmembran auftreten (Waschke, 2008).

1.3. Cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP)

cAMP wurde in Zusammenhang mit der Erforschung von intrazellulären Signalwegen von Hormonen erstmals im Jahr 1957 beschrieben (Sutherland, 1972; Sutherland und Rall, 1957). Es ist an einer Vielzahl verschiedener Stoffwechselprozesse beteiligt und in der Lage, in die Transkription verschiedener Gene einzugreifen (Kopperud et al., 2003).

cAMP entsteht aus Adenosintriphosphat durch das Enzym Adenylatcyclase, wenn membranständige G-Proteine aktiviert werden (Hanoune und Defer, 2001; Löffler, 2007). Dies ist als Antwort auf eine Reihe extrazellulärer Stimuli wie etwa Hormone, Wachstumsfaktoren oder Neurotransmitter möglich (Kopperud et al., 2003). Erhöhte oder erniedrigte cAMP-Spiegel führen in der Zelle zu einer Vielzahl von Veränderungen. Zunächst ist dabei der klassische Weg über die Aktivierung von Proteinkinasen A (PKA) Typ 1 und 2 zu nennen. Diese sind Serin/Threonin-Kinasen und bestehen aus zwei regulatorischen (R-) Untereinheiten, die 2 weitere katalytische (C-) Untereinheiten durch Bindung an diese hemmen. Die Bindung von je 2 cAMP-Molekülen an die regulatorischen Untereinheiten vermittelt eine Dissoziation und somit die Aktivierung der katalytischen Untereinheiten (Potter und Taylor, 1979; Taylor et al., 1990). Diese katalysieren dann reversible oder irreversible Proteinkinasephosphorylierungen. Außerdem können sie in den Kern gelangen und dort lokalisierte Proteine phosphorylieren, so z.B. den Transkriptionsfaktor CREB (engl.: *cAMP response*

element binding protein) (Kopperud et al., 2003). Durch Bindung der regulatorischen Untereinheiten, verankern AKAPs (engl.: *A-kinase anchor protein*) die Proteinkinasen an spezifischen Orten innerhalb der Zelle z.B. in die Nähe von anderen Signalezymen, wie Phosphatasen und Phosphodiesterasen (Michel und Scott, 2002), darunter auch die MAP-Kinasen (engl.: *Mitogen-activated protein kinase*) zu denen die p38MAPK gehört (Teramoto, 2013). Darüber hinaus sind viele weitere cAMP-vermittelten Effekte bekannt, darunter die Proteinkinase-unabhängige Regulation von CNG-Kationenkanälen (CNG; engl.: *cyclic nucleotide gated*) bei der Transduktion visueller und olfaktorischer Signale, wenn cAMP an deren zytoplasmatische Domäne bindet (Goulding et al., 1992; Kaupp et al., 1989).

Ein weiteres wichtiges Ziel von cAMP sind die ubiquitären Guaninaustauscher Epac (engl.: *Exchange protein activated by cAMP*) 1 und 2 (de Rooij et al., 1998; Kawasaki et al., 1998), die unter cAMP-Erhöhung den Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) und Guanosintriphosphat (GTP) an Rap1 und 2 bewirken und dieses damit aktivieren; auch eine Verbindung zu Effektoren der Ras-Superfamilie einschließlich Rho1 und Rac1 gilt als erwiesen, auch wenn der genaue molekulare Mechanismus noch nicht bekannt ist (Schlegel und Waschke, 2013; Schmidt et al., 2013). Der Abbau von cAMP erfolgt über Phosphodiesterasen und ist streng kompartimentiert und reguliert (Ahmad et al., 2012).

Wie zuvor bereits erwähnt spielt VE-Cadherin eine wichtige Rolle in der Adhäsion von Endothelzellen, die nicht zuletzt dadurch im Gefäßendothel in der Lage sind, eine selektive Barriere zwischen Blut und dem Interstitium auszubilden (Dejana et al., 2009). cAMP gilt als ein wichtiger barriestabilisierender Mediator sowohl unter basalen Bedingungen als auch in krankhaften Situationen z.B. bei Sepsis (Michel und Curry, 1999; Schlegel und Waschke, 2013). Wichtig dabei ist der Ort der cAMP-Entstehung. Es wirkt vor allem dann barriestabilisierend, wenn es membrannah gebildet wird; dagegen kann es beispielsweise im zytosolischen Pool sogar zu einer Destabilisierung der Endothelbarriere beitragen (Sayner et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass die mikrovaskuläre Permeabilität durch cAMP-Erhöhung gesenkt wird

und dass dabei die Anzahl der Verschlusskontakte zwischen den Zellen erhöht ist (Adamson et al., 1998). Damit wird eine Verbindung zwischen cAMP-abhängigen Signalwegen und interzellulärer Haftung deutlich. Weiterhin wurde gezeigt, dass cAMP an der Regulierung von VE-Cadherin-Bindungen beteiligt ist. Es ist bekannt, dass die Stabilisierung der Endothelbarriere VE-Cadherin abhängig ist und dass homophile Bindungen zwischen VE-Cadherinen durch eine Erhöhung des cAMP-Spiegels verstärkt werden. Diese verstärkte Haftung ist zum einen über den Epac-Rap1-Signalweg vermittelt (Fukuhara et al., 2005; Kooistra et al., 2005). Aber auch PKA-vermittelte Signalwege sind an der Barrierestabilisierung beteiligt (Lum et al., 1999).

1.4. Die Rolle desmosomaler Cadherine in der Pathogenese von Erkrankungen

Desmosomale Cadherine sind wichtige Haftmoleküle in der Zelle und spielen bei vielen Erkrankungen des Menschen, aber auch zahlreicher Tiere eine Rolle. Dsg1 und 3 werden als Zielmolekül von Autoantikörpern bei Pemphigus erkannt (Stanley und Amagai, 2006). Auch Autoantikörper gegen Dsc3 konnten bei einiger dieser Patienten gefunden und als pathogen herausgestellt werden (Rafei et al., 2011). Dsg1 ist außerdem auch das Zielmolekül des Exfoliativtoxins von *Staphylococcus aureus*, welches Auslöser der bullösen Impetigo sowie des Staphylokokken-induzierten, toxischen Schock-Syndroms ist (Amagai et al., 2000). Genmutationen im Dsg1-Gen führen zur Keratosis palmoplantaris striata (Whittock und Bower, 2003). Dsg2 findet sich auch im Myokard und ist dort mit arrhythmogener rechtsventrikulärer Kardiomyopathie (ARVC) assoziiert (Azaouagh et al., 2011). Auch für Dsc2 ist ein pathogenetischer Zusammenhang mit ARVC gezeigt worden (Awad et al., 2008). Dsg4 spielt vor allem eine Rolle in der Adhäsion von Haarfollikeln, sodass Mutationen im zugehörigen Gen zu einer Störung der Haarentwicklung führen (Amagai, 2010). Auch Patienten mit paraneoplastischem Pemphigus, der als Begleiterscheinung bei Tumoren auftritt, entwickeln Autoantikörper gegen Dsg1 und Dsg3 (Grando, 2012).

1.5. Pemphigus

Bei Pemphigus handelt es sich um eine Autoimmundermatose, bei der es antikörpervermittelt zu einem Verlust der Zell-Zell-Haftung (Akantholyse) und zu intraepidermaler Blasenbildung kommt (Waschke, 2008). Der Wortlaut Pemphigus stammt vom griechischen „Pempnix“, was so viel bedeutet wie „Blase“ und somit einen ersten Hinweis auf die makroskopische Morphologie der Erkrankung gibt (Amagai, 2010). Erkenntnisse über die Erkrankung konnten bereits 1964 von Beutner und Johnson gewonnen werden, denen es erstmalig gelang, aus Patientenserum Antikörper zu isolieren, die gegen die Oberfläche von Keratinozyten gerichtet sind (Beutner und Jordon, 1964). Kurze Zeit später konnte außerdem gezeigt werden, dass sich die Bindungsstellen der Antikörper bei Pemphigus von denen des Pemphigoids unterscheiden und Pemphigus damit in Abgrenzung zum bullösen Pemphigoid eine eigene Krankheitsentität darstellt (Lever und Hashimoto, 1969). In den darauf folgenden Jahrzehnten wurde die Pathogenität der Antikörper dadurch belegt, dass sie sowohl in kultivierter Haut (Schiltz und Michel, 1976) als auch durch Injektion in Mäuse (Anhalt et al., 1982) zur Blasenbildung führten. Dennoch gelang es erst 1991, ein humanes PV-Antigen zu klonieren und es als das desmosomale Cadherin Dsg3 zu identifizieren (Amagai et al., 1991). Zusammenfassend lässt sich Pemphigus heute als eine desmosomale Erkrankung beschreiben, bei welcher Autoantikörper gegen Dsg1 und 3 zu finden sind, die grundsätzlich zu einer Depletion von desmosomalen Komponenten von der Zelloberfläche, Veränderungen der Zytoskelettorganisation und Verlust der Desmosomenhaftung führen (Spindler und Waschke, 2014).

Pemphigus ist mit einer Inzidenz von 0,75-5 Fällen pro 1 000 000 Menschen eine seltene Erkrankung. Grundsätzlich ist ein Auftreten in jedem Alter möglich, allerdings gibt es einen Erkrankungsgipfel zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr (Bystryn und Rudolph, 2005). Im Wesentlichen werden zwei Hauptformen unterschieden: Pemphigus vulgaris (PV) und Pemphigus foliaceus (PF) (Stanley und Amagai, 2006).

Beim in Europa und den USA häufigeren (Bystryn und Rudolph, 2005) Pemphigus vulgaris treten suprabasale intraepidermale Blasen der Haut sowie Erosionen der Schleimhäute auf. Oftmals beginnt die Erkrankung mit schmerzhaften Ulzerationen an den Schleimhäuten und weitet sich im Verlauf auf die Haut aus. Beim schleimhautdominanten Typ weisen die Patienten nur Antikörper gegen Dsg3 auf, während sich bei Patienten mit mukokutanem Typ, mit Läsionen an Haut und Schleimhäuten, sowohl IgG Antikörper gegen Dsg1 als auch Dsg3 nachweisen lassen (Amagai und Stanley, 2012). Die Schleimhautläsionen sind bei PV obligat und können alle Schleimhäute betreffen, so z.B. Konjunktiven, Ösophagus, Anus und Vagina. An der Haut entstehen schlaaffe und oftmals stark nässende Blasen und im weiteren Krankheitsverlauf häufig verkrustete rote Erosionen. Auch diese Läsionen sind stark schmerzhaft und haben eine schlechte Heilungstendenz. Daher besteht die Gefahr von Superinfektionen und Malnutrition und infolge dessen schweren Krankheitszuständen bis hin zum Tod (Amagai, 2010; Kneisel und Hertl, 2011a). PV zeigt keine Geschlechtspräferenz, wohl aber eine Assoziation zu bestimmten ethnischen sowie HLA-Gruppen. Die Erkrankung ist nicht auf den Menschen beschränkt, sondern tritt auch bei vielen Tierarten z.B. Hunden und Pferden auf (Fritsch, 2003).

Beim Pemphigus foliaceus (PF) findet die intraepidermale Spaltbildung in den oberen Schichten der Epidermis statt. Patienten mit Pemphigus foliaceus zeigen nur IgG Antikörper gegen Dsg1 (Amagai und Stanley, 2012). Anders als beim PV sind hier keine Schleimhäute betroffen. Die Krankheit beginnt häufig umschrieben an talgreichen Hautbereichen wie etwa der Kopfhaut oder der Axillarregion. Es entstehen zunächst fragile schlaaffe Blasen. Später bilden sich hyperkeratotische schuppige Bereiche aus (Kneisel und Hertl, 2011a). Die Krankheit kann auf einzelne Hautbereiche beschränkt sein, sich aber gleichfalls auch auf die gesamte Haut ausbreiten und wird dann als Dermatitis exfoliativa-Erythrodermie bezeichnet (Amagai, 2010). Neben dem sporadischen ist auch ein endemisches Auftreten bekannt (Bystryn und Rudolph, 2005; Dasher et al., 2008). Für diese endemische Form, die in Brasilien auch als „Fogo selvagem“ bezeichnet wird, werden Sandfliegen als Vektoren und Induktoren der Erkrankung diskutiert (Eaton et al., 1998; Qian et al., 2012), jedoch ist auch eine

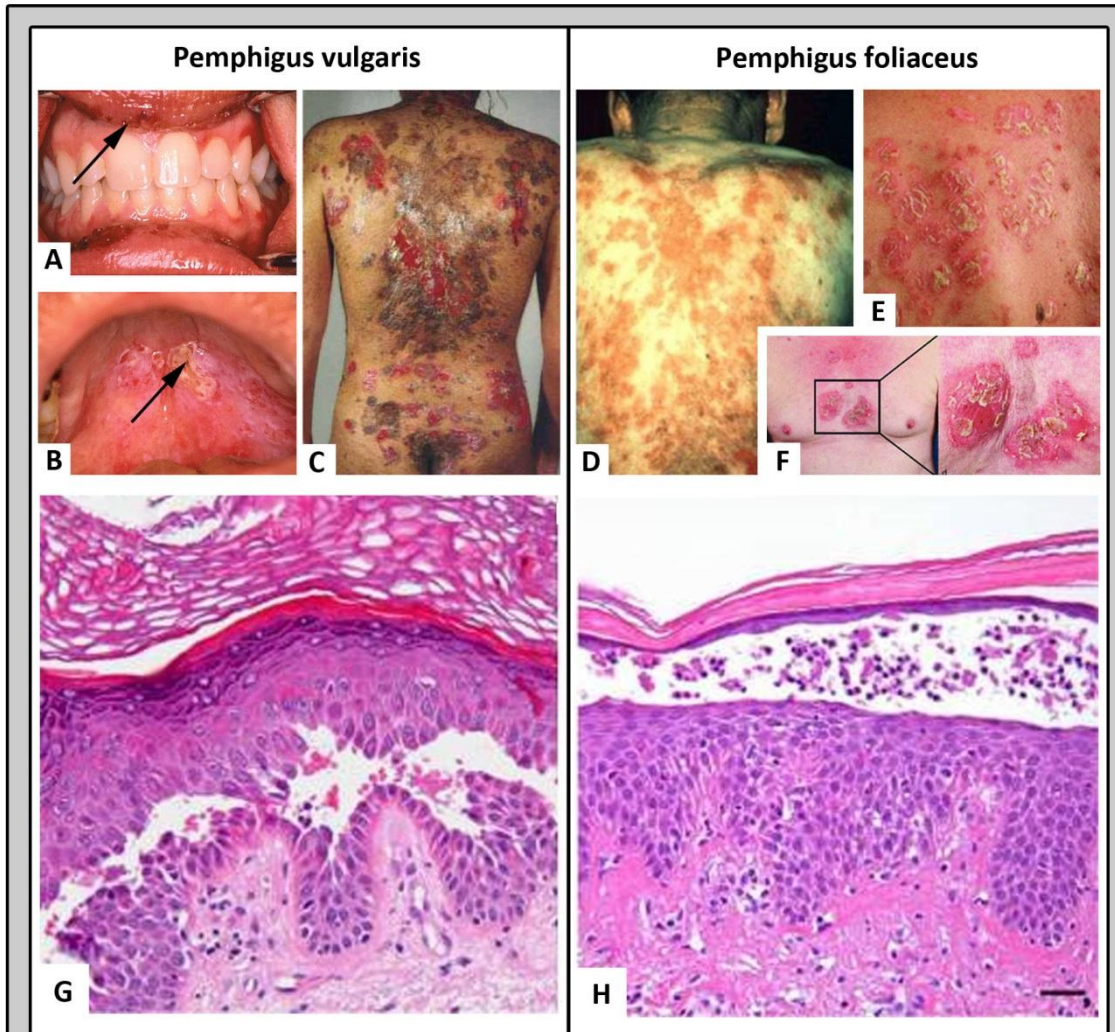


Abb. 3: Klinische Manifestation und Histologie der Haut bei PV und PF

Bei PV treten häufig zuerst schmerzhafte Erosionen der Mundschleimhaut (A;B) auf, aber auch Hautläsionen (C) sind möglich. Die Spaltbildung findet sich suprabasal in der Epidermis (G). Dagegen gibt es bei PF keine Schleimhautbeteiligung und die Läsionen befinden sich häufig im Bereich des Stammes (D-F). Die Spaltbildung findet sich hier oberflächlicher (H). Maßstab: 50µm

*Bilder modifiziert nach:
A-B: Knudson et al. 2010
C-D; G-H: Waschke 2008
E-F: Kneisel und Hertl 2011a*

Häufung in Zusammenhang mit einigen HLA-Konstellationen zu verzeichnen. Insgesamt handelt es sich bei der endemischen Form daher wohl am ehesten um eine umweltgetriggerte Autoimmunerkrankung (Culton et al., 2008).

Pemphigus kann außerdem durch eine Reihe von äußeren Faktoren induziert werden. Dazu gehören verschiedene Medikamente, Strahlen, Viren und Neoplasien (Ruocco et al., 2013b). Unter den Medikamenten sind es vor allem solche mit Thiol-Gruppen z.B. Penicillamin oder Captopril, die dazu in der Lage sind; daneben sind aber auch Fälle unter Medikation mit Antibiotika, wie etwa Penicillinen und Pyrazolonderivaten bekannt. Der paraneoplastische Pemphigus tritt vor allem bei B-Zell-Lymphomen auf; wird aber auch in Zusammenhang mit gutartigen Tumoren z.B. Thymomen beobachtet. Die Erstmanifestation ist hier häufig eine sehr schmerzhaft und oftmals therapieresistente Stomatitis (Kneisel und Hertl, 2011a).

1.5.1. Diagnostik und Therapie

Grundlagen der Diagnostik sind das klinische Erscheinungsbild und klinische Tests. Beim direkten Nikolski-Zeichen (Nikolski 1) lässt sich durch mechanische Irritation auf scheinbar gesunder Haut eine Blasenbildung auslösen. Als indirektes Nikolski-Zeichen (Nikolski 2) wird verstanden, dass bereits bestehende Blasen durch leichten Druck verschoben oder vergrößert werden können (Rassner, 2009). Die direkte Immunfärbung gilt weiterhin als Goldstandard in der Diagnostik des Pemphigus. Dazu werden Hautbiopsate aus der direkten Nachbarschaft von betroffenen Hautregionen histologisch untersucht (Kneisel und Hertl, 2011b; Schmidt und Zillikens, 2010). Entsprechend des klinischen Erscheinungsbildes finden sich die Antikörper bei PV vor allem basal angereichert, während sie bei PF in höheren Schichten der Epidermis zu finden sind. Weiterhin stehen heute serologische Nachweisverfahren für Autoantikörper gegen Dsg1 und 3 in Form von ELISAs (engl.: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) zur Verfügung (Ishii et al., 1997). Außerdem ist es möglich, die zirkulierenden Antikörper der Patienten mittels indirekter Immunfluoreszenzdarstellung nachzuweisen. Als Substrat wird beispielsweise die Ösophagusschleimhaut von Affen verwendet (Knudson et al., 2010).

Aktuelle Bewertungssysteme wie etwa der „Pemphigus Disease Area Index“ (PDAI) helfen die Krankheitsaktivität im individuellen klinischen Verlauf zu beurteilen. Zugrunde liegende Kriterien sind in diesem Fall die Krankheitsaktivität sowie die Größe der befallenen Regionen von Haut, Schleimhaut und Kopfhaut (Daniel et al., 2012). Auch die Kontrolle der serologischen Antikörperspiegel gilt als sinnvoll, da sie mit der Krankheitsaktivität korreliert (Schmidt et al., 2010).

Kortikosteroide sind das am meisten genutzte und am besten etablierte Behandlungsregime bei Pemphigus. Hierunter konnte die Mortalität der Erkrankung deutlich gesenkt werden (Meurer, 2012). Die Kortikoidstoßtherapie richtet sich in Dosis und Dauer nach Krankheitsaktivität und vorliegenden Pemphigussubtyp (Kasperkiewicz et al., 2012). Die zahlreichen Nebenwirkung dieser Therapie wie etwa gestörte Glukosetoleranz, die Entwicklung von Bluthochdruck und Osteoporose machen es allerdings notwendig, in der langfristigen Therapie Alternativen zum Einsatz von Kortikosteroiden zu finden (Mutasim, 2004).

Daher werden nunmehr vermehrt Immunsuppressiva eingesetzt, die in den B- und T-Zellstoffwechsel eingreifen und die Produktion von pathogenen Antikörpern reduzieren und damit gleichzeitig die benötigte Kortikosteroiddosis reduzieren. Häufig eingesetzte Präparate aus dieser Gruppe sind Methotrexat, Mycophenolatmofetil, Ciclosporin und Cyclophosphamid (Knudson et al., 2010; Meurer, 2012). In therapieresistenten Fällen stellen Präparate wie Gold, Antimalariamittel, Dapsone und Tetrazyklin in Kombination mit Nicotinamin weitere Therapiemöglichkeiten dar. In neuerer Zeit wird auch häufig Rituximab eingesetzt, bei welchem es sich um einen monoklonalen Antikörper gegen CD20 von Prä-B-Lymphozyten handelt. Hierdurch können die Autoantikörperspiegel effektiv gesenkt werden (Hertl et al., 2008; Shimanovich et al., 2008). Weitere Optionen der Therapie haben sich in den letzten Jahren aus dem zunehmenden Verständnis der Pemphigus-Pathogenese ergeben; diese Verfahren werden aber bisher meist nur versuchsweise und daher nur bei therapierefraktärem Verlauf eingesetzt (Kneisel und Hertl, 2011b). Dazu gehört der Einsatz von hochdosierten nicht pathogenen Immunglobulinen, unter welchen eine

gesenkte Krankheitsaktivität sowie eine bessere Wirksamkeit der komplementär eingesetzten Immunsuppressiva gezeigt werden konnte (Enk et al., 2009; Kneisel und Hertl, 2011b). Außerdem gibt es die Möglichkeit der Immunoabsorption, bei der im Unterschied zur Plasmapherese gezielt nur Immunglobuline und Immunkomplexe aus dem Patientenplasma entfernt werden können (Zillikens et al., 2007).

Hohe hygienische Standards, das Meiden begünstigender Noxen sowie konsequente Wundpflege sind Grundvoraussetzung für einen positiven Verlauf und für die Prävention von Komplikationen wie Superinfektionen (Kneisel und Hertl, 2011b). Als supportive Therapie ist vor allem eine suffiziente Schmerztherapie wichtig (Rashid und Candido, 2008). Zusammenfassend bleibt die Behandlung der Erkrankung eine Herausforderung und sollte auf den individuellen Krankheitsverlauf, sowie das Patientenprofil angepasst werden (Mutasim, 2004; Ruocco et al., 2013a). Daher ist die Erforschung neuer therapeutischer Ansätze zur Behandlung des Pemphigus ein wichtiges medizinisches Anliegen.

1.5.2. Pathogenese von Pemphigus vulgaris

Als Zielantigene bei Pemphigus konnten in den letzten Jahrzehnten eine große Zahl von desmosomalen und nicht-desmosomalen Adhäsionsproteinen identifiziert werden (Kalantari-Dehaghi et al., 2013). Neben den klassischen Desmogleinen kommen Autoantikörper gegen E-Cadherin (Evangelista et al., 2008), Desmocolline (Dmochowski et al., 1995; Mao et al., 2010; Rafei et al., 2011) und Verschlusskontakt-Proteine (Abreu-Velez et al., 2011) vor. Aber auch andere Membranproteine wie Annexine und Acetylcholinrezeptoren (Cirillo et al., 2012) und intrazelluläre Moleküle wie mitochondriale Proteine (Marchenko et al., 2010) werden als Zielstrukturen von Antikörpern bei Pemphigus beschrieben. Die Relevanz dieser Vielzahl an Antikörpern für die Blasenbildung ist abgesehen von Dsg1, Dsg3 und Dsc3 unklar (Pan et al., 2011).

Es gibt verschiedene Theorien wie Antikörper bei Pemphigus zu einer intraepidermalen Blasenbildung führen. Das zuerst eingeführte Modell bezieht sich auf die extrazellulären Antikörperbindungen an Desmogleine, die dann deren Haftung direkt behindern. Dieses als direkte Inhibition bezeichnete Modell wurde durch Experimente unterstützt, in denen gezeigt werden konnte, dass sich die Autoantikörper gegen für die Interaktionen wichtigen Extrazellulärdomänen der Desmogleine richten (Tsunoda et al., 2003). Weiterhin zeigen Dsg3 defiziente-Mäuse Veränderungen im Sinne eines mukosomal dominanten Pemphigus vulgaris (Koch et al., 1997). Inzwischen wurde gezeigt, dass PV-IgGs die Haftung von Dsg3 tatsächlich direkt reduzieren, während das für die Haftung von Dsg1 weder bei PV noch bei PF belegt ist (Heupel et al., 2008; Waschke et al., 2005).

Daraus resultierte die Desmogleinkompensationstheorie, welche die unterschiedlichen klinischen Phänotypen von PV und PF erklären soll. Sie besagt, dass Dsg1 und Dsg3 sich gegenseitig kompensieren können und durch die ungleiche Verteilung der Desmogleine Spaltbildungen in unterschiedlicher Höhe der Epidermis entstehen, je nach vorliegendem Antikörperprofil (Mahoney et al., 1999). Weisen die Patienten Autoantikörper nur gegen Dsg3 auf, so kommt nur eine Schleimhautbeteiligung vor, da dort kaum Dsg1, aber viel Dsg3 vorkommt. Umgekehrt betrifft der mukokutane PV, mit Autoantikörpern gegen Dsg1 und Dsg3, auch die Haut, da hier beide Desmogleine betroffen sind (Amagai, 2009; Amagai, 2010). So entsteht auch die Spaltbildung bei PF, also bei Patienten die nur Antikörper gegen Dsg1 aufweisen, in den oberen Schichten der Epidermis, da sich dort vor allem Dsg1 aber kein Dsg3 befindet. Die Theorie wurde durch Mausversuche unterstützt. So konnte die durch Immunglobulin G Fraktionen von Pemphigus foliaceus Patienten (PF-IgG) induzierte Akantholyse mittels Überexpression von Dsg3 in der oberen Epidermis unterdrückt werden (Wu et al., 2000).

Gegen die Theorie der direkten Behinderung spricht, dass aus PG-defizienten Mäusen gewonnene Keratinozyten resistent gegen PV-IgG sind (Caldelari et al., 2001; de Bruin et al., 2007). Desweiteren kann bei PF der Haftungsverlust ohne direkte Inhibition

auftreten (Waschke et al., 2005) und die alleinige Bindung von PV-IgG an die Zelloberfläche reicht nicht für eine Zelldissoziation aus (Calkins et al., 2006). Die Desmogleinkompensationstheorie erklärt weiterhin nicht die suprabasale Spaltbildung bei mukokutanem PV. Aufgrund der Autoantikörper gegen Dsg1 und Dsg3 müsste es hier in allen Schichten der Epidermis zu einem Haftungsverlust und damit zu einer Blasenbildung kommen, allerdings ist hier stets eine suprabasale Spaltbildung zu beobachten (Waschke, 2008). Weiterhin sind Patienten beschrieben, deren Antikörperprofil und klinischer Phänotyp nicht in das aufgezeigte Schema passen (Sardana et al., 2013).

Als weitere Theorie wird daher angenommen, dass die IgGs extradesmosomale und desmosomale Desmogleine binden und dadurch Signalwege auslösen, die zu einem Kollaps des Zytoskeletts und dem Abbau von Desmosomen führen, was gut beobachtete Phänomene als Folge einer Antikörperinkubation sind (Galichet et al., 2014). Mittlerweile wurden viele Signalwege in Zusammenhang mit Pemphigus vulgaris demonstriert (Waschke, 2008), so z.B. die Phospholipase C (PLC) und Proteinkinase C (PKC), für die gezeigt wurde dass PV-IgGs einen schnellen PLC-abhängigen Anstieg von Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Ca²⁺ und damit eine Aktivierung der PKC vermitteln (Kitajima et al., 1999; Seishima et al., 1999). Wie oben bereits angedeutet, spielt auch PG eine Rolle; es konnte gezeigt werden, dass es als Suppressor in den c-Myc-Signalweg eingreift und dieser Mechanismus bei Pemphigus blockiert wird, da auch PG unter PV-IgG-Inkubation von der Zellgrenze depletiert wird (Williamson et al., 2006).

Als weiterer zentraler Mechanismus gilt die Aktivierung von p38MAPK. Die Phosphorylierung der p38MAPK sowie deren nachgeschaltetes Protein HSP27 (engl.: *heat shock protein 27*) konnte in Patientenhaut, Mausmodell und auch in Keratinozytenkulturen, die mit PV-IgG behandelt wurden, gefunden werden (Berkowitz et al., 2008b). Durch Blockade des Signalwegs mit verschiedenen Mediatoren konnte die Blasenbildung im Mausmodell sowie in Keratinozytenkultur verhindert werden (Berkowitz et al., 2008a; Berkowitz et al., 2006). Der Mechanismus, über welchen

p38MAPK zur Akantholyse beiträgt, ist noch nicht abschließend geklärt, es konnte aber gezeigt werden, dass es einen Signalkomplex aus p38MAPK, Dsg3 und PG gibt, in welchem p38MAPK nach Gabe Dsg3-spezifischer Antikörpern aktiviert vorliegt (Spindler et al., 2014; Spindler et al., 2013). Für RhoA, einem Vertreter der Rho-GTPasen, die wichtige Regulatoren des Zytoskeletts und der Zelladhäsion (Braga und Yap, 2005) sind, konnte gezeigt werden, dass p38MAPK-abhängig eine Inaktivierung als Reaktion auf PV-IgGs zu finden ist und eine Blockade dieser Inaktivierung protektiv ist, während eine induzierte Inaktivierung von RhoA und Rac1, einer anderen Rho-GTPase selbst zu epidermaler Spaltbildung und Keratinozytendissoziation führt (Spindler et al., 2007; Waschke et al., 2006). Weiterhin führt die Aktivierung von p38MAPK nach PV-IgG-Inkubation zu einer verminderten desmosomalen Verankerung von Intermediärfilamenten, die stattdessen vermehrt perinukleär lokalisiert sind. Dieses als Zytokeratinretraktion bezeichnete Phänomen stellt einen wichtigen Pathomechanismus von PV dar (Spindler et al., 2013; Spindler und Waschke, 2014). Die protektive Aktivierung von RhoA verhindert passend dazu auch die Zytokeratinretraktion (Waschke et al., 2006).

Die Depletion von Dsg1 und 3 ist ein weiteres typisches Ereignis als Reaktion auf die Inkubation mit PV-IgGs. Sie konnte sowohl in Keratinozytenkultur (Aoyama und Kitajima, 1999; Spindler et al., 2011a) als auch im Mausmodell (Shu et al., 2007; Yamamoto et al., 2007) nachgewiesen werden. Dabei scheint die Depletion gerade das Desmoglein zu betreffen, gegen welches die Autoantikörper gerichtet sind, während die Spiegel anderer desmosomaler Proteine unbeeinträchtigt bleiben (Calkins et al., 2006; Spindler et al., 2007). Die Internalisierung und damit der Verlust von desmosomalen Dsg3 schwächt die Haftung zwischen den Keratinozyten (Calkins et al., 2006).

Eine weitere Theorie besagt, dass durch die Endozytose von extradesmosomalen Dsg3 der Nachschub für die Desmosomen verloren geht, wodurch es zu einer Stagnation des Einbaus von Desmogleinen kommt (Oktarina et al., 2011). Weitere Signalmoleküle werden ebenfalls mit Pemphigus in Verbindung gebracht, darunter beispielsweise

EGFR (engl.: *epidermal growth factor receptor*), die Tyrosinkinase Src und cholinerge Rezeptoren (Waschke, 2008). Auch Apoptose wird im Zusammenhang mit Pemphigus diskutiert, weil verschiedene Caspasen (3,6,8,9) und andere proapoptotische Marker wie Bax, im Zuge einer Inkubation mit Pemphigusautoantikörpern, erhöht gefunden wurden (Li et al., 2009; Marchenko et al., 2010). Diese scheinen an Signalwegen beteiligt zu sein; Apoptose stellt aber eher einen nachgeschalteten Mechanismus zur Akantholyse dar (Schmidt und Waschke, 2009). Vielmehr scheinen Caspasen auch an der Regulation der Zellhaftung beteiligt zu sein (Spindler und Waschke, 2014).

Zusammenfassend lässt sich aus den Daten ableiten, dass Signalwege eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Pemphigus spielen, indem sie die desmosomale Plaque vom Netz der Intermediärfilamente loslösen und mit dem Desmosomenumsatz interferieren (Spindler und Waschke, 2014). Verschiedene Mechanismen spielen bei der Entstehung der Krankheitssymptome eine Rolle und können in ihrer Komplexität bis heute noch nicht vollständig zusammengeführt werden. Pemphigus vulgaris ist damit nicht durch ein einfaches pathogenetisches Krankheitsmodell zu erklären, sondern stellt vielmehr ein komplexes autoimmun bedingtes Krankheitsgeschehen dar.

1.6. Fragestellung

Die Epidermis ist als äußere Abdeckung und mechanischer Schutz ein essentieller Bestandteil unseres Körpers. Gerade ihre Stabilität zeichnet sie gegenüber anderen Geweben aus. Diese wird größtenteils durch Interzellularkontakte und dabei insbesondere durch Desmosomen vermittelt. Pemphigus stellt eine schwerwiegende Autoimmunerkrankung dar, bei der Haftmoleküle in den Desmosomen, Dsg 1 und 3, durch Autoantikörper gebunden werden. Bisher gibt es für diese Erkrankung keine kausale Therapie; die Patienten werden vor allem immunsuppressiv behandelt, was schwere Nebenwirkungen mit sich bringt. Ein genaueres Verständnis der Pathogenese des Pemphigus kann damit dazu beitragen, spezifischere Therapiestrategien zu etablieren. cAMP als wichtiger Mediator vieler verschiedener zellulärer Funktionen und bekannter Barriestabilisator im Endothel durch Beeinflussung von Cadherinhaftung scheint dabei ein interessanter Ansatzpunkt für die Untersuchung des Haftungsverlusts bei Pemphigus zu sein. Dies gilt auch im Hinblick darauf, dass cAMP-erhöhende Medikamente wie beispielsweise β_2 -Rezeptoragonisten bei asthmatischen Beschwerden bereits erfolgreich eingesetzt werden (Freissmuth et al., 2012).

In dieser Arbeit soll daher der Einfluss von cAMP auf PV-IgG-vermittelte Effekte untersucht werden. Es soll herausgestellt werden, ob cAMP protektiv in das Krankheitsgeschehen bei PV eingreift und über welche Signalwege diese Wirkung zustande kommt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Testreagenzien und Antikörper

2.1.1. Testreagenzien

Zur Beeinflussung des intrazellulären cAMP-Spiegels wurden die folgenden Mediatoren wie in der Tabelle angegeben verwendet.

Tabelle 1: Mediatoren			
Mediator	Hersteller	Funktion	Eingesetzte Konzentration
Forskolin^{*1}	<i>Sigma-Aldrich (München)</i>	<i>Aktivator der Adenylatcyclase</i>	<i>5µmol/l</i>
Rolipram^{*1}		<i>Hemmer der Phosphodiesterase 4</i>	<i>10µmol/l</i>
Isoproterenol - Hydrochlorid		<i>β-Rezeptoragonist</i>	<i>100µmol/l (in vitro)</i>
			<i>10µmol/l (in vivo)</i>
Propranolol		<i>β-Rezeptorantagonist</i>	<i>10µmol/l</i>
H89		<i>Hemmstoff der Proteinkinase A</i>	<i>10µmol/l</i>

^{*1} Forskolin und Rolipram wurden für die Versuche jeweils gemeinsam verwendet

2.1.2. Antikörper

Antikörper wurden zur Detektion verschiedener Proteine in der direkten und indirekten Immunfluoreszenzdarstellung sowie in Western-Blot-Experimenten zur Bestimmung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen verwendet. Für die Verdünnung der Antikörper wurde phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) für die

Immunfluoreszenzdarstellung und 5% Magermilch in PBS mit 0,05% (w/v) Tween 20 für die Western-Blot-Experimente eingesetzt.

Für die direkte Immunfärbung, die verwendet wurde, um die Bindungen der PV-IgGs in der Maushaut nachzuweisen, wurde ein Cy3-gekoppelter Antikörper gegen den Fc-Teil der humanen PV-IgGs verwendet.

Für alle anderen Versuche wurden Primärantikörper eingesetzt, die gegen bestimmte Epitope des zu untersuchenden Antigens gerichtet sind. Die Sekundärantikörper erkannten dann entsprechend den Fc-Teil des Primärantikörpers und waren ihrerseits entweder mit einem fluoreszierenden Farbstoff (für Immunfärbungen) oder einem Peroxidase-Enzym (zur Reaktion mit ECL-Lösung bei Western-Blot-Experimenten) gekoppelt.

Tabelle 2: Primärantikörper

Antikörper	Hersteller	Typ/Spezies	Konzentration	
			IF	WB
anti-Dsg3 clone H-145	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)	polyklonal/ Kaninchen	n.v.	1:1000
anti-Dsg3 clone 5G11	Invitrogen (Karlsruhe)	monoklonal/ Maus	1:100	n.v.
anti-total-p38MAPK (α, β, γ)	New England Biolabs (Frankfurt)	monoklonal/ Kaninchen	n.v.	1:500
anti-phospho- p38MAPK (Thr180/Tyr182)			n.v.	1:200

Als Ladekontrolle für die Western-Blot-Experimente wurde ein monoklonaler Antikörper gegen die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), der bereits an das Peroxidaseenzym gekoppelt war. Er wurde daher in einer Verdünnung von 1:20000 über Nacht bei 4°C inkubiert und

danach ohne weitere Inkubation mit einem Sekundärantikörper nach Protokoll entwickelt.

Tabelle 3: Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller	Kopplung	Eingesetzte Konzentration
Ziege-anti-Maus-Fc	<i>Dianova (Hamburg)</i>	<i>Cy3 (rote Fluoreszenz)</i>	<i>1:600</i>
Ziege-anti-Maus-Fc		<i>Pox</i>	<i>1:3000</i>
Ziege-anti-Kaninchen-Fc		<i>Pox</i>	<i>1:3000</i>
Ziege-anti-Mensch-Fc		<i>Cy3 (rote Fluoreszenz)</i>	<i>1:600</i>

2.2. Zellkultur

Für alle Versuche in vitro wurde die spontan immortalisierte humane Keratinozytenzelllinie HaCaT (engl.: *human low calcium elevated temperature cells*) verwendet. Es handelt sich um eine stabile Zelllinie, die sich problemlos kultivieren lässt und schnell einen konfluenten Zellrasen bildet. Die Zellen zeigen in vivo kein invasives Wachstum und sind nicht tumorigen (Boukamp et al.; 1988). Die Zellen wurden in DMEM (engl.: *Dulbecco's modified Eagle's Medium*; Life technologies, Karlsruhe, Deutschland) unter Zumischung von 50 U/l Penicillin G, 50µg Streptomycin und 10% fetalem Kälberserum (FCS, Bio-chrom, Berlin, Deutschland) in einer befeuchteten Schutzatmosphäre (95% Luft/ 5% CO₂) bei 37°C bis zur Konfluenz zu einem Zellrasen gehalten und dann für die Versuche verwendet oder zur Fortführung der Zelllinie aufgeteilt. Während dieser Zeit erfolgte alle zwei Tage ein Austausch des Mediums.

Für die Fortführung der Zelllinie wurden die Zellen für 30min mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung (0,05% (w/v) EDTA in PBS) vorbehandelt. Dies diente durch Chelation der Ca^{2+} -Ionen der Schwächung der Ca^{2+} -abhängigen Cadherin-Bindungen. Nachfolgend wurden die Zellen mittels Trypsin (0,05% (w/v) Trypsin, 0,02% (w/v) EDTA in PBS) vom Flaschenboden abgelöst, gründlich re-suspendiert und erneut auf unbehandelte T75-Flaschen oder in die für die jeweiligen Versuche geeignete Deckgläser oder Mehrlochplatten in einem Verhältnis von 1:3 aufgeteilt.

2.3. Aufreinigung der Patientenautoantikörper und Kontrollantikörper

Für die Versuche wurden insgesamt vier verschiedene Seren von Pemphiguspatienten verwendet. Die Erkrankung der Patienten wurde zuvor sowohl klinisch als auch histologisch und serologisch gesichert. Ihre Proben wurden unter Einwilligung der Patienten von Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Schmidt (Universitätsklinikum Lübeck) zur Verfügung gestellt. Für die Kontrollen wurden Seren von gesunden Freiwilligen verwendet.

Die Aufreinigung der IgG-Fraktionen erfolgte mittels Affinitätschromatographie unter Verwendung von Protein A Agarose (Calbiochem; Nottingham), aus welcher das Protein mittels Citratpuffer (25mM, pH 2.4) eluiert wurde. Das Eluat aus gereinigtem Antikörpergemisch der IgG-Fraktionen von Patientenseren und Kontrollpersonen wurde über Nacht gegen 5l PBS dialysiert. Anschließend wurde eine Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford-Analyse durchgeführt und die aufgereinigten Proteine zur weiteren Verwendung portioniert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C . Die Titer der Antikörper gegen Dsg1 und Dsg3 wurden mittels ELISA bestimmt und sind in der Tabelle angegeben.

Tabelle 4: Antikörperprofile der verwendeten Pemphigusseren

<i>ELISA</i>	<i>Anti-Dsg 3 (U/ml)</i>	<i>Anti-Dsg 1 (U/ml)</i>
<i>PV-IgG1</i>	1414	1194
<i>PV-IgG2</i>	6586	-
<i>PV-IgG3</i>	1239	60
<i>PV-IgG4</i>	1185	977

2.4. Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (EIA)

Die zellulären cAMP-Spiegel wurden basierend auf dem Verfahren des enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (EIA) mit einem Versuchsansatz der Firma Sigma-Aldrich (München) durchgeführt. HaCaT-Zellen wurden hierzu bis zur Konfluenz in 12-Lochplatten gehalten und mit den entsprechenden Versuchsbedingungen wie beschrieben inkubiert. Nachfolgend wurde das Medium entfernt und die Zellen in 0,1M Salzsäure für 10min lysiert. Das Lysat wurde dann bei 600xG für 10min zentrifugiert und die Überstände gesammelt; für den weiteren Versuch wurden nur noch diese verwendet.

Nachfolgend wurde der oben genannte vorgefertigte Ansatz verwendet und die darin beschriebenen Schritte genau eingehalten. Prinzipiell wird dabei ein polyklonaler gegen cAMP gerichteter Antikörper am Boden einer 96-Lochplatte immobilisiert. Nachfolgend werden die Proben und eine an cAMP gekoppelte Alkalische Phosphatase zugegeben. cAMP aus der Probe und cAMP, das an das Enzym gebunden ist, konkurrieren nun kompetitiv um die Bindungsstellen des Antikörpers. Die nichtgebundenen cAMP-Moleküle werden nachfolgend abgewaschen und ein Substrat der Alkalischen Phosphatase, nämlich p-Nitrophenylphosphat hinzugefügt. Das gebundene Enzym verfärbt die Lösung je nach dessen vorhandener Menge in unterschiedlicher Intensität gelb. Ist viel cAMP in der Probe, so kann nur wenig Enzymgekoppeltes cAMP binden, somit fällt der Farbumschlag entsprechend gering aus;

invers verhält es sich bei Proben, die wenig cAMP enthalten. Der Farbtintensität verhält sich damit umgekehrt proportional zur in der Probe enthaltenen cAMP-Konzentration. Der gelbe Farbumschlag wurde bei einer Wellenlänge von 405nm photometrisch gemessen und anhand einer mitgemessenen Standardkurve die tatsächliche cAMP-Konzentration errechnet.

2.5. Bestimmung der Proteinkonzentration

2.5.1. Bradford-Methode

Diese Methode wurde erstmals 1976 vom amerikanischen Biochemiker Bradford beschrieben und ist ein quantitatives Verfahren der Proteinbestimmung, das auf der besonderen photometrischen Eigenschaft des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 beruht (Bradford, 1976). Diese besteht darin, dass durch Bindung an ein Protein das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 auf 595nm verschoben wird. Die Zunahme der Absorption bei 595nm kann photometrisch detektiert werden. Um eine quantitative Aussage über die Proteinmenge in den Proben treffen zu können, wurde gleichzeitig eine Standardprobenreihe mit bekannter Proteinkonzentration gemessen. Hier wurden zu je 1ml einer 1:5 verdünnten Bradfordlösung und 10µl der Probe beziehungsweise einer auf bovines Serumalbumin (BSA) basierenden Standardlösung (Konzentrationen aufsteigend zwischen 0,1 bis 2mg/ml) zugegeben. Nach Durchmischen und 10min Inkubation wurden die Proben in Photometerröhrchen umgefüllt und die Extinktion wie oben beschrieben bestimmt.

2.5.2. Amidoschwarz-Methode

Diese Methode basiert auf dem Farbstoff Amidoschwarz 10B, der unter sauren Bedingungen in Proteingemischen an Amidostickstoffe bindet und danach photometrisch bei 620nm detektiert werden kann. Dazu wurden schmale Streifen einer Zelluloseacetatfolie mit 5µl der Probe bzw. eines auf BSA basierenden Proteinstandards (Konzentrationen zwischen 0,125 und 4mg/ml) beträufelt. Diese wurden dann für 10min in eine Färbelösung [0,5% (w/v) Amidoschwarz, 45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure und 45% (v/v) Aqua dest.] getaucht und nachfolgend mittels einer Entfärbelösung [47,5% (v/v) Methanol, 5% (v/v) Essigsäure und 47,5% (v/v) Aqua dest.] so lange gewaschen, bis jene Abschnitte der schmalen Streifen, die nicht mit dem Protein beträufelt wurden, wieder komplett weiß erschienen. Nachfolgend wurden die Streifen getrocknet, in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und die Membranen mittels Lyselösung [2% (w/v) Trichloressigsäure, 16% (v/v) Ameisensäure, 2% (v/v) Essigsäure, 82% (v/v) Aqua dest.] über 30min bei 60°C aufgelöst. Dabei wurden die Proben immer wieder durchmischt, um abschließend eine gleichmäßige Verteilung des Farbstoffes zu erreichen. Die so vorbehandelten Proben wurden abermals in Photometerröhrchen überführt und die Extinktion bei 620nm photometrisch gemessen.

Der Vorteil gegenüber dem Verfahren zur Proteinmengenbestimmung nach Bradford besteht hierbei darin, dass die Amidoschwarz-Methode auch unter denaturierenden Bedingungen möglich ist, wie sie bei Western-Blot-Experimenten verwendet werden (Nakamura et al., 1985).

2.6. Elektrophorese und Western-Blot

Zur semiquantitativen Untersuchung von Proteinen wurde ein kombiniertes Verfahren aus Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), Western-Blot

und abschließend der Detektion der Proteine mittels immunologischer Methodik durchgeführt.

HaCaT-Zellen wurden im Verhältnis 1:3 aufgeteilt und bis zur Konfluenz in 12-Lochplatten gehalten. Nach Entfernung des Mediums und einmaligem Waschen mit PBS wurde der Zellrasen in einem speziellen mit SDS versetzten Puffer (0,5% (w/v) SDS; 12,5mmol NaF, 1mmol EDTA, 12,5mmol HEPES, Proteaseinhibitorenmischung (1Tbl./50ml Lysepuffer; cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Berlin)) lysiert und die Proben 10mal sonifiziert. Das zugegebene SDS bewirkt dabei, dass die Ladungen der Moleküle verdeckt werden und somit keinen Einfluss auf die Laufgeschwindigkeit haben, andererseits werden so die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen zerstört. Letzteres wird durch eine Thermodenaturierung bei 95°C für 5min abgeschlossen, sodass auch eine Beeinträchtigung der Laufgeschwindigkeit durch die strukturellen Gegebenheiten der Proteine vermieden werden kann.

Danach wurde wie zuvor beschrieben eine Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Amidoschwarz-Methode durchgeführt, um sicher zu stellen, dass in den weiterführenden Versuchsschritten jeweils eine einheitliche Gesamtproteinmenge verwendet werden konnte.

Bei der SDS-Gelelektrophorese werden Moleküle nach ihrer Größe aufgetrennt, indem sie unterschiedlich schnell durch eine Gelmatrix aus Acrylamid und Bisacrylamid laufen. Die Aufteilung des Gesamtproteins erfolgte nach der Laemmli-Methode (Laemmli, 1970). Die wie oben beschrieben vorbereiteten Proben wurden zunächst in einem 5%igem Polyacrylamid-Gel gesammelt und nachfolgend in 7,5%igem Gel nach ihrer Größe aufgetrennt. Zur Herstellung der Gele wurde Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Katalysator und Ammoniumpersulfat (APS) als Initiator der Polymerisation verwendet. Die Gele wurden in vertikale Elektrophorese-Gelsysteme (Biorad, München) gegeben. Dazu wurde in den Zwischenraum von ca. 1mm entfernten Glasplatten zunächst ein Trenngel in definierter Höhe gegossen und zur Polymerisation gebracht, in einem weiteren Schritt wurde dann das Sammelgel darüber aufgetragen

und mit einem Kunststoffkamm versehen, sodass die Proben an definierten Stellen des Gels zugegeben werden konnten.

Nach dem Abschluss auch dieser zweiten Gelpolymerisation wurden die Gele mit Halterung in die oben genannten Kammern verbracht, die Proben in die durch die Kämmen entstandenen Taschen gefüllt und eine elektrische Spannung angelegt, die für die Zeit durch das Sammelgel 80mV, im Trenngel 130mV betrug. Die Proteingemische wurden so elektrophoretisch getrennt. Zur Laufzeitbestimmung von Proteinen gewisser Größe wurde zusätzlich ein Marker mit Proteinen bekannter Größe mitlaufen gelassen (PPL-Marker: engl.: *prestained protein ladder*; Fermentas, St. Leon-Rot).

Nach der Auftrennung wurden die Proteine mittels Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran überführt. (Hybond-C extra, Amersham, Braunschweig); ein Verfahren das erstmals 1979 beschrieben wurde (Renart et al., 1979). Hierzu wurden das Gel und die Nitrozellulosemembran zusammen mit je 3 angefeuchteten Filterpapieren auf jeder Seite zwischen 2 Graphitelektroden in eine Mini-Transblot-Kammer verbracht. Die Filterpapiere wurden mit Transferpuffer (25mM Tris, 192mM Glycin und 20% (v/v) Methanol) angefeuchtet. Über die Elektroden wurde nun ein Stromfluss von $0,8\text{mA}/\text{cm}^2$ über 90min angelegt, sodass die Proteine vom Gel auf die Membran übertragen wurden.

Die hydrophoben Bindungsstellen wurden nun durch 30min Waschen in 5% Magermilch in PBS mit 0,05% (w/v) Tween 20 abgesättigt. Dann erfolgte für 16h bei 4°C die Inkubation mit dem Erstantikörper. Nach einem weiteren Waschvorgang (3malig in PBS+ 0,05% (w/v) Tween 20 für jeweils 5min) wurde der Sekundärantikörper für 1h bei Raumtemperatur zugegeben. Überschüssige Antikörper wurden mit der oben beschriebenen Waschlösung erneut durch 3maliges Waschen für je 5min abgespült.

Durch die Kopplung des Sekundärantikörpers an eine Peroxidase kann dessen Bindung auf der Membran sichtbar gemacht werden. Dazu wurde die ECL (engl: *enhanced chemiluminescence*)-Methode verwendet (Whitehead et al., 1979). Die mit Antikörpern vorbehandelte Membran wird zunächst in 1:1 Verhältnis gemischten ECL-

Lösungen I und II zur Initiierung der Peroxidasereaktion geschwenkt. Dabei katalysiert die Peroxidase die Umwandlung von Luminol (aus der ECL-Lösung I) zu Carbonyl unter Anwesenheit von H_2O_2 (aus der ECL-Lösung II). Carbonyl emittiert nun Licht, das in einer Dunkelkammer auf einem Röntgen-Detektionsfilm sichtbar gemacht werden kann. Die Röntgenfilme wurden dann nacheinander für je 1min in Entwicklerlösung und in Fixierlösung inkubiert. Danach erfolgte die Trocknung der Filme und digitale Auswertung der Proteindarstellung.

2.7. Indirekte Immunfluoreszenzdarstellung

Zur spezifischen morphologischen Darstellung von Proteinen in HaCaT-Zellen und dünn geschnittener Maushaut wurde das Verfahren der indirekten Immunfluoreszenzdarstellung verwendet. Die Zellen wurden dazu im Verhältnis 1:3 auf Deckgläschen ($\varnothing 12\text{mm}$) aufgeteilt und bis zur Konfluenz in DMEM gehalten. Danach wurden die Zellschichten nach den entsprechenden Versuchsbedingungen für eine beschriebene Zeit inkubiert. Folgend wurden diese mit eisgekühltem Aceton für 2min fixiert und mit PBS mehrmals gewaschen. Es erfolgte ein weiterer Schritt mit PBS, das 10% BSA und 3% normales Ziegen Serum (NGS) enthält. Damit wurden die Zellen für weitere 30min behandelt, um zu erreichen, dass unspezifische Antikörperbindungsstellen abgesättigt werden und somit nicht durch den Primärantikörper zu erreichen sind. Anschließend wurde das Gemisch mittels Sog entfernt. Die Maushaut wurde wie unten beschrieben gewonnen.

Nun erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper. Hierzu wurde eine Verdünnung im Verhältnis 1:100 hergestellt und davon $20\mu\text{l}$ auf die Deckgläschen oder Schnitte gegeben. Es wurde eine Inkubation in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht durchgeführt. Danach wurden ungebundene Primärantikörper in drei aufeinanderfolgenden Waschgängen für 5min mit PBS entfernt und der Sekundärantikörper hinzugegeben. Die Präparate wurden nun für weitere 60min

inkubiert. Danach erfolgten weitere drei Waschgänge für 5min mit PBS und die Deckgläschen wurden mit der Zellseite nach unten auf einen Tropfen NPG (1% (w/v) n-propyl-Gallat mit 60% (v/v) Glycerin in PBS) auf einen Objektträger aufgebracht. NPG verzögert, dass das Präparat in kurzweiligem Licht ausbleicht (Giloh und Sedat, 1982).

In den in vivo-Versuchen kam außerdem das Verfahren der direkten Immunfärbung zum Einsatz, um die Bindung der PV-IgGs in der Maushaut darzustellen. Dazu wurde lediglich eine Inkubation mit einem gegen humanes Fc gerichtete Cy3-gekoppelten Antikörper durchgeführt. Dieser wurde für 1h bei Raumtemperatur auf die Schnitte gegeben. Dann wurden ungebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Schnitte ebenfalls mit NPG eingedeckt.

Die so präparierte Zellschicht oder dünn geschnittene Maushaut wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop begutachtet.

2.8. Keratinozytendissoziationsversuch

Beim Keratinozytendissoziationsversuch wird ein definierter mechanischer Scherstress ausgenutzt, um die Haftung zwischen Zellen in einer Einzelzellschicht und damit indirekt die Desmosomenhaftfunktion zu überprüfen. Das Verfahren ist im Feld der Pemphigusforschung etabliert (Ishii et al., 2005).

HaCaT-Zellen wurden dazu in einem Teilungsverhältnis von 1:3 auf 12-Lochplatten aufgeteilt und dort bis zur Konfluenz für insgesamt fünf Tage in DMEM gehalten. Es erfolgte eine Inkubation mit den jeweiligen Versuchsbedingungen für weitere 24h. Danach wurden die Zellen zweimalig mit HBSS (engl.: *Hank's Balanced Salt Solution*, Sigma-Aldrich; München) gewaschen und für 30min mit 250µl Dispase II (>2,4Einheiten/ml, Sigma-Aldrich; München) bei 37°C inkubiert. Dispase II ist eine aus *Bacillus polymyxa* isolierte Protease, welche Fibronectin und Kollagen IV spaltet. Sie

trennt dadurch Zell-Matrix-Kontakte und löst den Zellrasen vom Boden der Lochplatte ab, ohne die Desmosomenhaftung zu beeinträchtigen (Stenn et al., 1989).

Nach dieser Inkubationszeit wurde die Dispersionslösung gegen 500µl HBSS ausgetauscht und die Zellen mittels fünfmaligem vorsichtigem Pipettieren in konstanter Geschwindigkeit mittels einer 1ml Pipette einem mechanischen Scherstress ausgesetzt. Anschließend wurde die Anzahl der Fragmente der Einzelzellschicht unter einem Auflichtmikroskop ausgezählt. Die Anzahl der Fragmente wurde mit ebenso vorbehandelten Kontrollen verglichen.

2.9. In vivo Pemphigus-Maus-Modell

2.9.1. Mauslinie BALB/c und Durchführung

Bei den Versuchen wurden neugeborene Mäuse der Linie BALB/c verwendet. Dabei handelt es sich um eine klassisch zu Experimenten verwendete Albino-Mauslinie, die gut charakterisiert und im Pemphigusfeld etabliert ist (Anhalt et al., 1982; Takahashi et al., 1985).

Für die hier durchgeführten Experimente wurden die Mäuse in normalen 12h-Tag-12h-Nacht-Rhythmus unter Beachtung der Tierhaltungsgesetze gehalten. Sie wurden 12-24h nach der Geburt vom Muttertier getrennt und für die Versuchsdauer von 24h in einem beheizten Käfig gehalten. Die neugeborenen Tiere sind noch unbehaart und stellen daher eine gute Möglichkeit für die Untersuchung ihrer Haut dar.

Den neugeborenen Mäusen wurde am Rücken subkutan 50µl der jeweiligen Versuchslösung injiziert. Entsprechend erhielt die Kontrollgruppe lediglich 50µl Kontroll-IgG (5mg/g Körpergewicht) von gesunden Freiwilligen, während in den Versuchsgruppen Pemphigusantikörper in einer Konzentration von 3 (PV1-IgG) beziehungsweise 6 (PV4-IgG)mg/g Körpergewicht alleinig oder in Kombination mit

Isoproterenol bzw. Propranolol eingesetzt wurden. Die Tiere in der Isoproterenol-/Propranololgruppe erhielten eine weitere Injektion mit Isoproterenol bzw. Propranolol 1h vor Inkubationsbeginn. Allen anderen Tieren wurde zu diesem Zeitpunkt Kochsalzlösung injiziert. Nach 16-20h wurde zunächst ein definierter mechanischer Stress auf die infiltrierte Maushaut ausgeübt und mittels Fotografie ein makroskopisches Bild des betroffenen Hautareals angefertigt. Nachfolgend wurden die Mäuse getötet und Hautproben entnommen.

Ein Teil der Maushaut wurde in „cryo mounting medium“ (Reichert-Jung, Nussloch, Germany) eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um sie für Kryoschnitte und nachfolgend Hämatoxylin-Eosin-(H.E.-) bzw. Immunfärbungen zu verwenden.

Ein weiterer Teil wurde durch 10 Stöße in einem Dounce-Homogenisator in Lämmli-Puffer lysiert und für Western-Blot-Experimente verwendet, die ausgenommen vom Schritt der Lysatgewinnung gleich der in vitro-Versuche durchgeführt wurden.

2.9.2. Aufarbeitung der Maushaut

Die eingebettete und gefrorene Maushaut wurde mit einem Mikrotom (Frigo-Cut 2800, Reichert-Jung) in 5-7µm dünne Schichten geschnitten. Um alle Stellen innerhalb des Maushautbiopsats mit möglicher Blasenbildung zu finden, wurde alle 400µm ein Schnitt mit Toluidinblau eingefärbt und unter dem Mikroskop auf intraepidermale Blasenbildung untersucht. Anschließend wurde das Procedere wie oben beschrieben fortgesetzt, bis schließlich die gesamte Hautprobe untersucht war. Repräsentative Kryoschnitte wurden mittels indirekter und direkter Immunfluoreszenzdarstellung untersucht, wie bereits zuvor beschrieben.

Die H.E.-Färbung als histologisches Standard-Färbeverfahren dient zur Übersichtsdarstellung möglichst vieler zellulärer Strukturen. Dabei wurden besonders

stark kontrastierende Farbstoffe, in diesem Fall Hämatoxylin und Eosin verwendet. Zur Durchführung wurden die Schnitte für zirka 30min bei 60°C auf Objektträger eingebrannt und danach für 2min in destilliertem Wasser hydriert. Danach erfolgte eine Fixierung in 2,5% (w/v) Formalin für 20min mit anschließendem dreimaligem Auswaschen mit destilliertem Wasser. Nachfolgend wurde eine Kernfärbung mit Hämatoxylin für 10min durchgeführt. Das sogenannte „Bläuen“ erfolgte im lauwarmen Leitungswasser für 10min. Anschließend erfolgte die Plasmafärbung in 0,1% wässrigem EosinY und 1 Tropfen Eisessig für 2min und ein weiterer Waschschrift mit Leitungswasser. Abschließend erfolgte eine Entwässerung mittels aufsteigender Alkoholreihe, ein klären in Xylol und schließlich das Eindecken der Schnitte in DPX (Sigma, St. Louis, USA).

2.10. Aufnahme und Auswertung des Daten- und Bildmaterials

Alle gezeigten Immunfärbungen wurden an einem Laserkonfokalmikroskop (MRC-1024; Bio-Rad; München) mittels eines 63x NA 1.4 oil plan-Apochromat-Objektives das an ein Axiovert 135 TV Mikroskop angeschlossen war, aufgenommen (beides: Carl Zeiss Microimaging, Göttingen). Die initiale Bildbearbeitung und Auswahl erfolgte mit dem Programm Zeiss LSM Image Browser 2.80.1123; danach wurde zur Bildbearbeitung Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems, San Jose, USA) verwendet, mit welchem auch die Schemazeichnungen erstellt wurden. Weiterhin wurde das Programm für die Auswertung der entwickelten Western Blots mittels Grauwertanalyse genutzt, um Banden unterschiedlicher Intensität miteinander vergleichen und auswerten zu können.

Die angefärbten Maushautschnitte wurden mittels Digitalkamera (HRP-100, Diagnostic Instruments, Sterling Heights, USA) angeschlossen an ein Axiomot 2 plus Mikroskop inklusive eines Plan Neofluar 20x/0.50 Objektives (beides: Carl Zeiss Microimaging; Jena) digitalisiert und zur Auswertung aufgenommen.

Die Datenauswertung erfolgte mit der Software SigmaStat (Systat Software, Erkrath). Die Datenwerte wurden bei mehr als zwei Vergleichsgruppen mittels einfaktorieller ANOVA, gefolgt von einer Bonferroni-Korrektur bzw. für nicht normalverteilte Werte von einem Student-Newman-Keuls Post-hoc-Test verglichen. Bei zwei zu vergleichenden Gruppen wurde der zweiseitige, ungepaarte Student's t-Tests durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde ab einem Wert von $p < 0,05$ angenommen. Die Fehlerbalken stellen jeweils den Standardfehler dar.

3. ERGEBNISSE

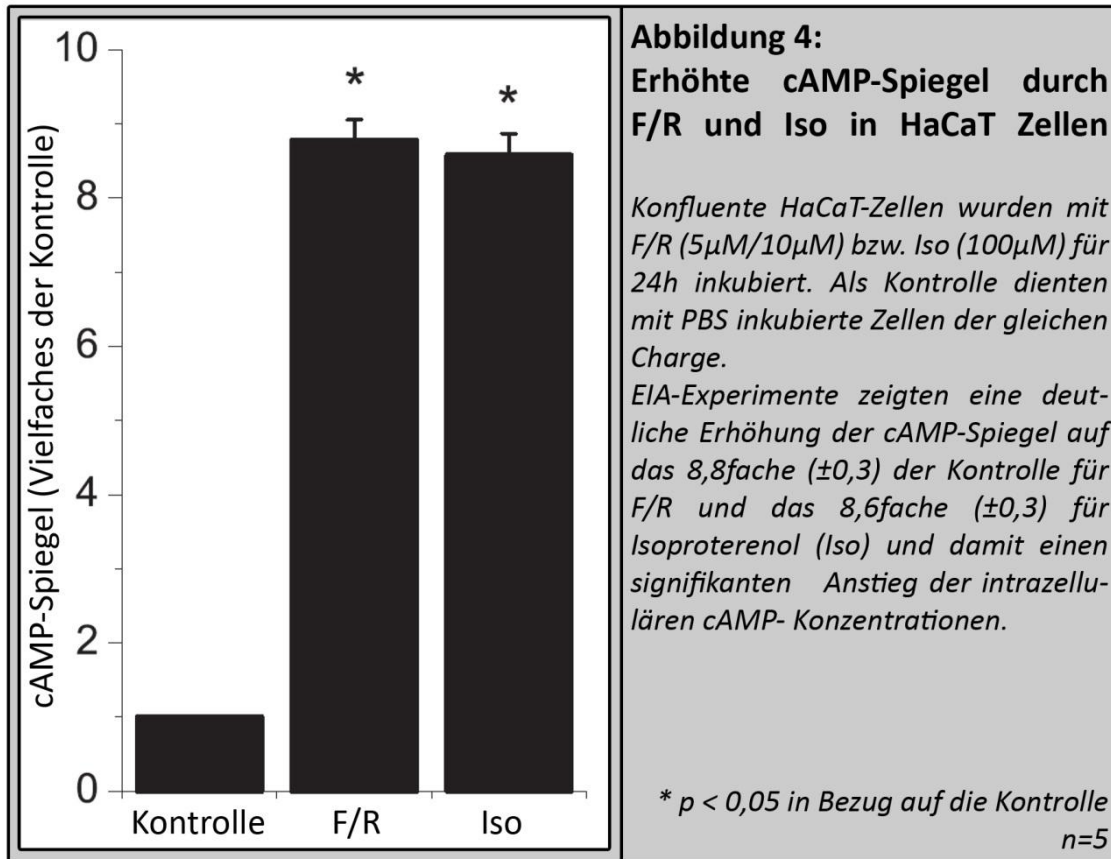
3.1. Protektiver Effekt von cAMP bei *Pemphigus vulgaris* in vitro

Zunächst wurde der Effekt einer cAMP-Erhöhung bei PV in vitro untersucht. In der Endothelforschung sind einige Mediatoren gut etabliert. So konnte beispielsweise für den β -Rezeptoragonisten Isoproterenol (Schlegel und Waschke, 2009b), den Adenylatcyclaseaktivator Forskolin und den Phosphodiesterase-4-hemmer Rolipram (Baumer et al., 2008; Baumer et al., 2009; Schlegel und Waschke, 2009a) gezeigt werden, dass sie durch eine cAMP-Erhöhung barriestabilisierend am Endothel wirken. Daher wurden zunächst diese Mediatoren getestet und verwendet. Für alle Versuche wurden HaCaT-Zellen bis zur Konfluenz gehalten und dann den entsprechenden Versuchsbedingungen zugeführt.

3.1.1. Forskolin/Rolipram und Isoproterenol erhöhen die cAMP-Spiegel von HaCaT-Zellen.

Als Grundlage der folgenden Versuche, wurden zunächst cAMP-erhöhende Mediatoren darauf getestet, ob sie in der Lage sind, die cAMP-Spiegel in HaCaT-Zellen zu erhöhen. Für die Versuche wurden zwei Mediatoren gewählt: Zum einen eine Mischung aus Forskolin und Rolipram (F/R), zum anderen Isoproterenol. Um zu untersuchen wie die cAMP-Spiegel durch diese Mediatoren in HaCaT-Zellkulturen beeinflusst werden, wurde ein cAMP-EIA durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass beide Mediatoren nach 24h-Inkubation die intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen und zwar in etwa gleichem Umfang auf das 8,8fache (± 0.3) für F/R und das 8.6fache

(± 0.3) für Iso der Kontrolle; daher wurden beide für die weiteren Versuche als äquivalent angesehen und verwendet.



3.1.2. Eine cAMP-Erhöhung vermindert die Dsg3-Reorganisation in vitro.

Um den Effekt einer cAMP-Erhöhung bei Pemphigus vulgaris zu untersuchen, wurden HaCaT-Zellen bis zur Konfluenz gehalten und dann mit PV1-IgG alleine oder in Kombination mit den cAMP-erhöhenden Mediatoren für 24h behandelt. Als Kontrolle wurden Zellen über den gleichen Zeitraum mit PBS bzw. alleinig mit den Mediatoren inkubiert. Danach wurde eine Immunfärbung gegen Dsg3 durchgeführt, um morphologische Veränderungen darzustellen.

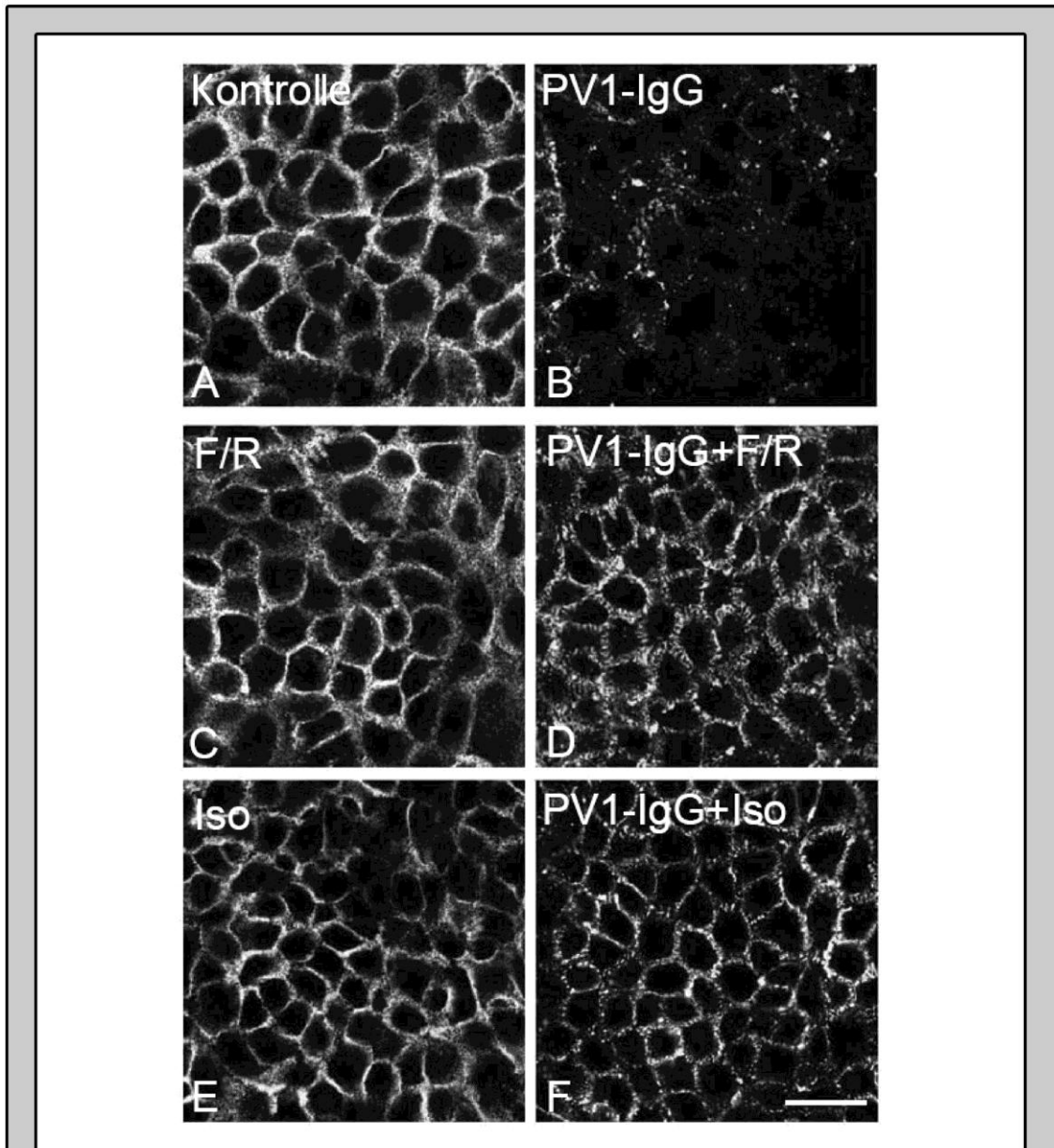


Abb. 5: Effekte von cAMP-Erhöhung auf die Dsg3-Reorganisation als Antwort auf eine PV-IgG-Inkubation

Gezeigt sind Immunfärbungen in HaCaT-Zellen gegen Dsg3. Während unter Kontrollbedingungen eine nahezu lineare Verteilung von Dsg3 entlang der Zellgrenzen zu sehen ist (A), kann nach 24h Inkubation mit PV1-IgG eine deutliche Verminderung der Färbeintensität sowie eine Fragmentierung der Dsg3-Färbung beobachtet werden (B). Beide Effekte der PV1-IgG-Inkubation konnten durch F/R und Iso jeweils deutlich reduziert werden (D,F). Die Mediatoren lösten keine Veränderungen der Dsg3-Färbung aus (C,E).

Maßstab=20µm
n=5

Unter Kontrollbedingungen war Dsg3 linear an den Zellgrenzen verteilt (Abb.5A). Die Inkubation mit PV1-IgG führte zu einem deutlichen Verlust und starker Fragmentierung der Dsg3-Färbung (Abb.5B), was die typische Reaktion auf die Inkubation mit PV-IgG darstellt. Diese morphologischen Korrelate des Haftungsverlustes durch PV-IgG konnten durch eine simultane Erhöhung des cAMP-Spiegels mit beiden Mediatoren deutlich reduziert werden (Abb.5D,F). Die Mediatoren alleine hatten keinen Einfluss auf die Dsg3-Färbung.

Somit wirkte die cAMP-Erhöhung protektiv auf die durch PV-IgG hervorgerufenen morphologischen Veränderungen in kultivierten HaCaT-Zellen.

3.1.3. Durch cAMP-Erhöhung kann eine Reduktion des PV-IgG-induzierten Adhäsionsverlusts erreicht werden.

Da die durch Immunfärbung gewonnenen morphologischen Daten eindeutige Hinweise darauf lieferten, dass eine cAMP-Erhöhung einen protektiven Effekt bei Pemphigus vulgaris hat, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob dadurch auch der PV-IgG-vermittelte Haftungsverlust positiv beeinflusst werden kann. Dazu wurden Keratinozytendissoziationsversuche durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine etablierte Methode, um die Zellhaftung von Keratinozyten zu untersuchen. HaCaT-Zellen wurden hierzu bis zur Konfluenz gehalten und für 24h unter den gleichen Bedingungen wie für die Immunfärbung inkubiert. Anschließend wurden die Einzelzellschichten mit Dispase II zur Ablösung vom Boden der Kulturschale behandelt, einem definierten mechanischen Scherstress ausgesetzt und die Anzahl der resultierenden Zellschichtfragmente ausgezählt. Kontrollzellverbände wurden in ihrer Integrität durch den mechanischen Stress kaum beeinträchtigt und zeigten nur wenige Fragmente ($2,2 \pm 0,8$ Fragmente) (Abb.6A). Dagegen führte eine Inkubation mit PV2-IgG zu einem deutlichen Haftungsverlust, also zu einer stark erhöhten Fragmentzahl ($165 \pm 30,5$ Fragmente) im Vergleich zur Kontrolle (Abb.6B). Gleichzeitige Inkubation

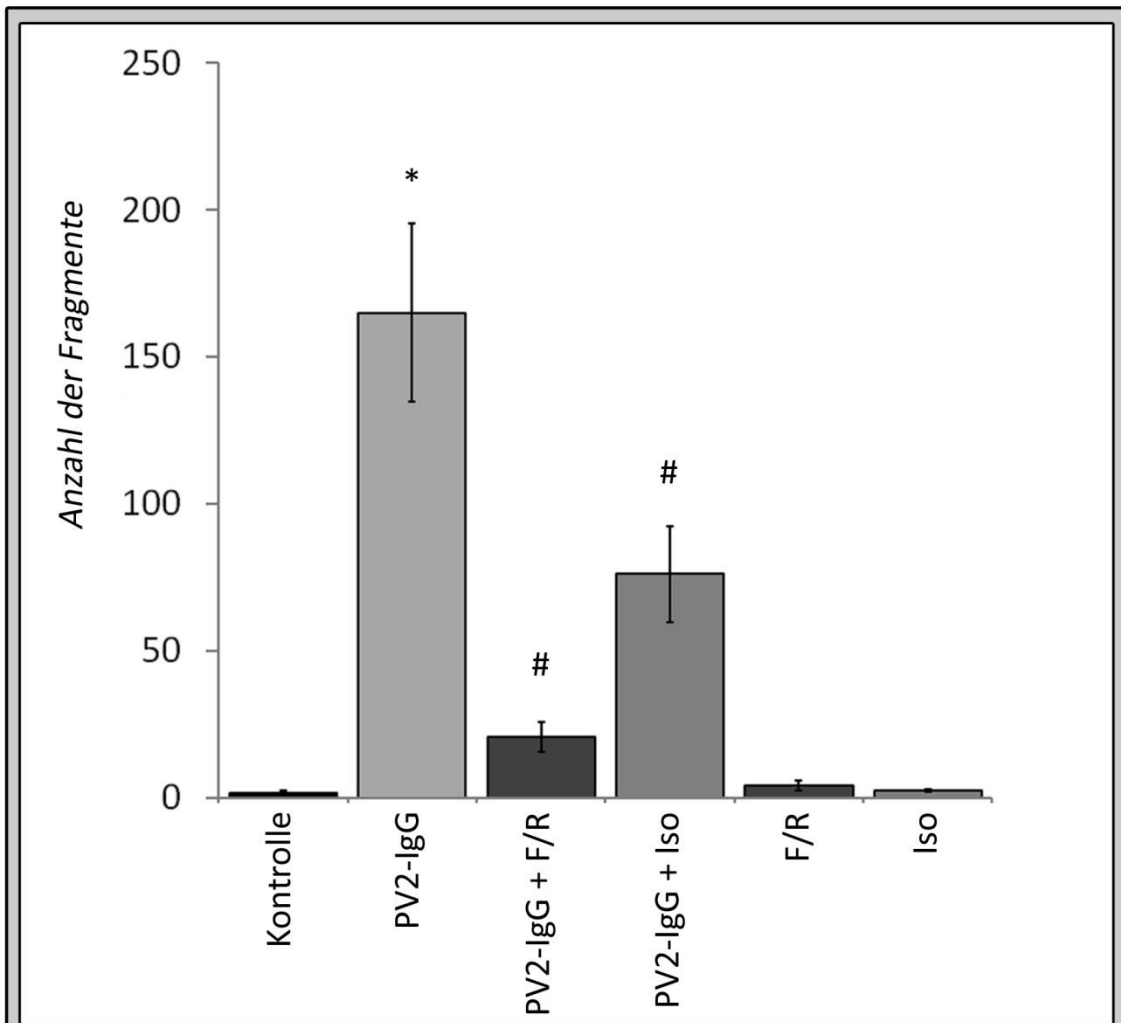


Abb. 6: cAMP-Erhöhung verhindert den PV-IgG induzierten Haftungsverlust im Keratinozytendissoziationsversuch

Verglichen mit der Kontrolle ($2,2 \pm 0,8$) und der alleinigen Inkubation mit den Mediatoren (F/R $3,8 \pm 1,2$ bzw. Iso $2,3 \pm 0,2$) zeigt sich unter PV2-IgG-Inkubation eine deutliche Erhöhung der Fragmentzahl auf $165,1 \pm 30,5$. Diese konnte durch simultane Inkubation mit F/R bzw. Iso signifikant vermindert werden (PV2-IgG+F/R $20,5 \pm 5,1$ bzw. PV2-IgG+Iso $76,0 \pm 16,4$).

* $p < 0,05$ in Bezug auf die Kontrolle

$p < 0,05$ in Bezug auf PV2-IgG

n=9

mit F/R und Iso konnte die Fragmentzahl stark reduzieren (PV2-IgG+F/R: $20,5 \pm 5,1$; PV2-IgG+Iso: $76 \pm 16,4$ Fragmente) und damit den interzellulären Haftungsverlust deutlich blockieren (Abb.6C). Die Mediatoren alleine hatten keinen Einfluss auf die interzelluläre Haftung; die hier beobachtete Fragmentzahl (F/R: $3,8 \pm 1,2$; Iso: $2,3 \pm 0,2$

Fragmente) blieb unverändert zu Kontrollbedingungen. Damit wird deutlich, dass die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels nicht nur die morphologischen Effekte der PV-IgG-Behandlung vermindert, sondern auch den Haftungsverlust deutlich reduziert und damit funktionell ebenfalls protektiv wirkt.

3.1.4. cAMP-Erhöhung blockiert die PV-IgG-induzierte Dsg3-Depletion.

Als typischer Effekt von PV-IgGs auf Proteinebene ist die Depletion von Dsg3 in der Literatur beschrieben. Diese ist 20-60min nach Inkubation mit PV-IgGs nachweisbar und trägt zum Haftungsverlust bei (Aoyama und Kitajima, 1999; Yamamoto et al., 2007). Der Prozess ist mit Endozytose von Dsg3 verknüpft (Calkins et al., 2006) und ein wichtiger Hinweis darauf, dass die Bindung von PV-IgGs zur Modulation von Signalwegen führt und damit der Haftungsverlust nicht allein durch Inhibition der Bindung erklärt werden kann (Kitajima, 2013). Weiterhin ist die Dsg3-Depletion auch in der Maushaut als Reaktion auf intraperitoneale Injektion von PV-IgGs nachgewiesen worden (Shu et al., 2007). Daher haben wir im Folgenden den Einfluss einer cAMP-Erhöhung auf die PV-IgG induzierten Dsg3-Depletion untersucht.

Dazu wurden erneut konfluente HaCaT-Zellen verwendet und über 24h mit PV-IgG inkubiert. Die Mediatoren F/R und Isoproterenol wurden zusammen mit den Antikörpern über den gleichen Zeitraum eingesetzt. Danach wurden Zelllysate angefertigt und Western-Blot-Experimente zur Darstellung der Dsg3-Menge durchgeführt. Als Ladekontrolle, zur Sicherstellung, dass in allen Proben die gleiche Menge Gesamtprotein verwendet wurde, wurde ein GAPDH-Antikörper eingesetzt. Ein repräsentativer Immunoblot ist in Abb.7A dargestellt. Daneben wurden alle durchgeführten Blots densitometrisch quantifiziert (Abb.7B). Unter PV3-IgG-Behandlung konnte eine deutliche Dsg3-Depletion auf $72\pm 0,5\%$ der Kontrolle beobachtet werden. Eine simultane Inkubation mit F/R verhinderte den Dsg3-Verlust vollständig ($97\pm 10\%$ der Kontrolle). Ein ähnliches Ergebnis konnte durch Inkubation mit

Isoproterenol erreicht werden (nicht gezeigt). Damit konnte die Hemmung der PV-IgG induzierten Dsg3-Depletion durch cAMP-Erhöpfung nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass cAMP an der Regulation von Signalwegen beteiligt ist, in die PV-IgGs durch ihre Bindung an der Zelloberfläche direkt oder indirekt eingreifen.

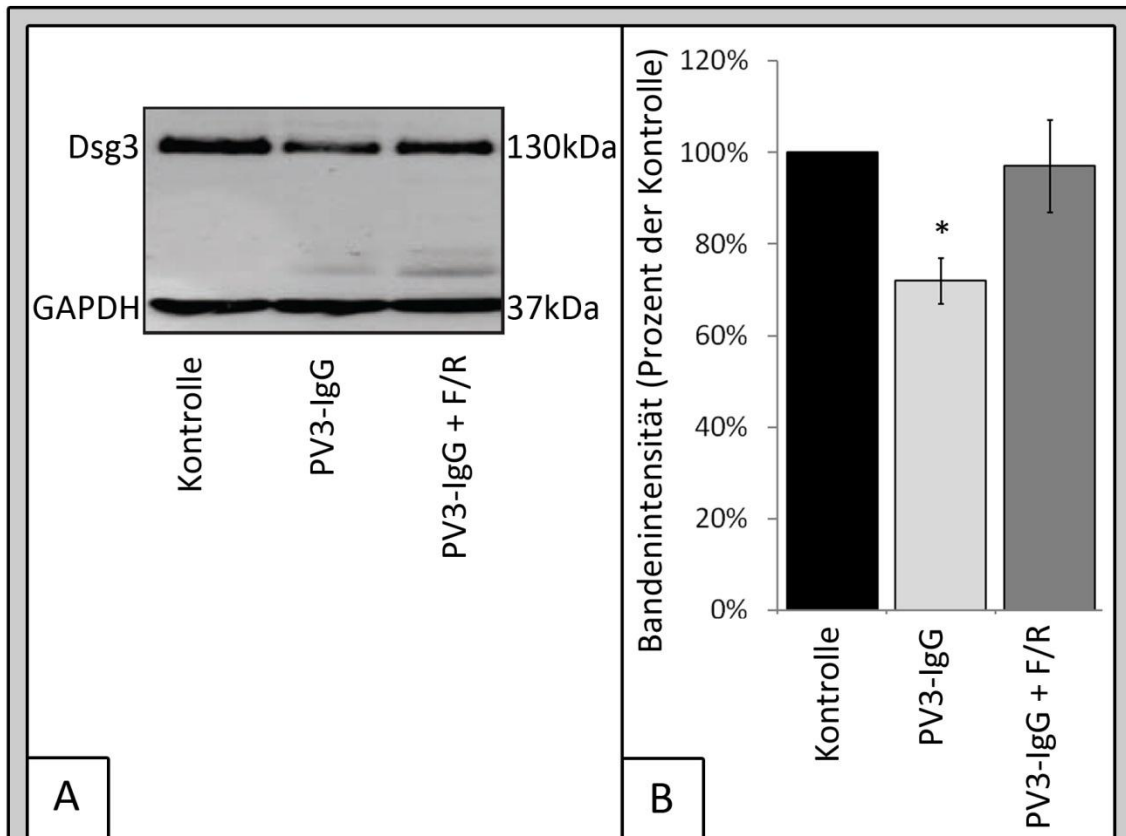


Abb. 7: cAMP-Erhöpfung verhindert die PV-IgG induzierte Dsg3-Depletion

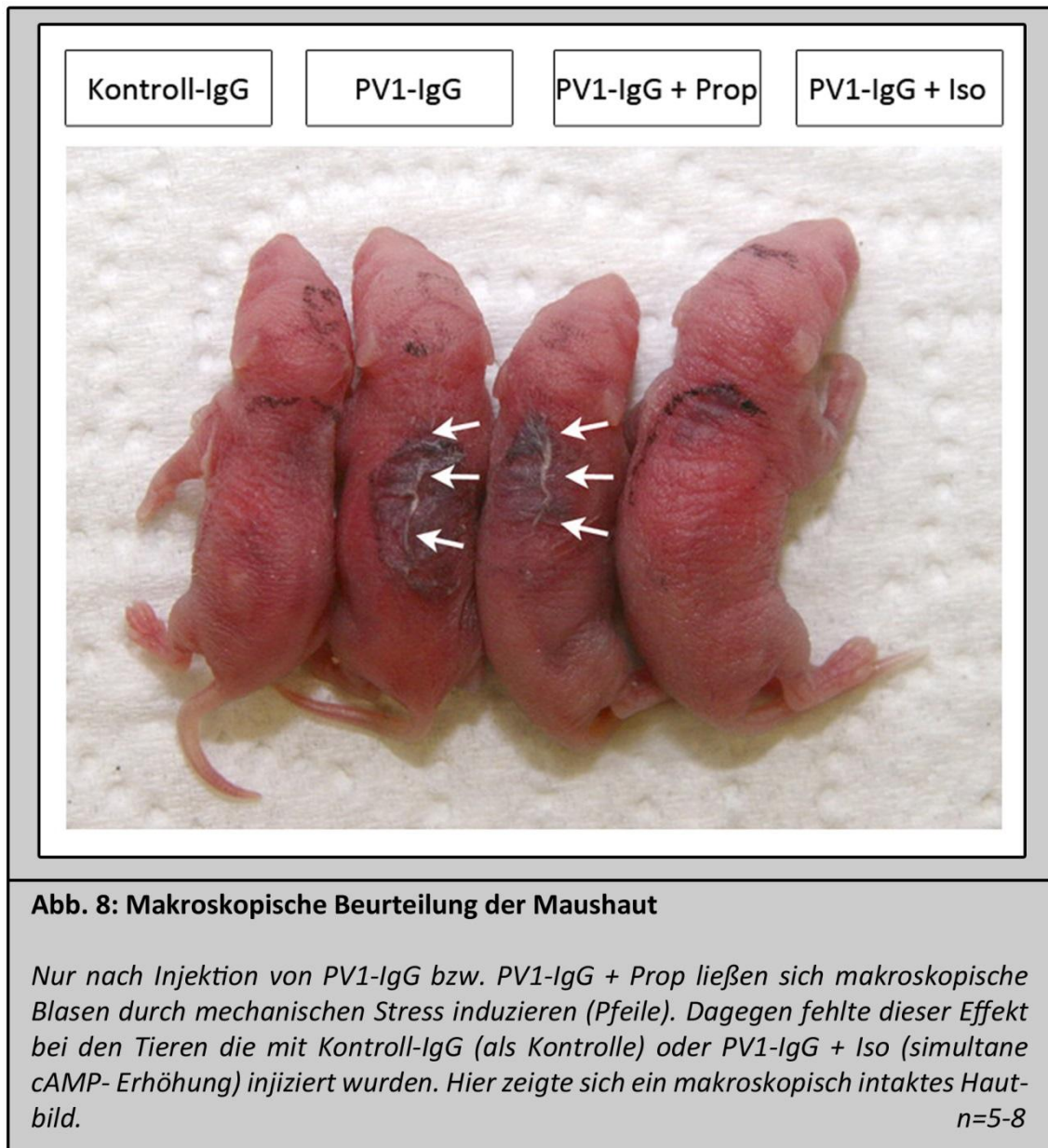
A: Repräsentativer Western Blot; B: Densitometrische Auswertung aller Experimente. Unter Kontrollbedingungen zeigt sich eine spezifische Dsg3-Bande auf Höhe von 130kDa. Unter PV3-IgG-Inkubation ist eine deutliche Depletion zu erkennen. Diese konnte durch gleichzeitige cAMP-Erhöpfung mittels F/R vollständig blockiert werden. Die GAPDH als Ladekontrolle zeigt überall eine gleich starke Bande.

* $p < 0,05$ in Bezug auf die Kontrolle
n=9

3.2. cAMP-Erhöpfung verhindert die Blasenbildung im Pemphigus-Maus-Modell.

Um zu untersuchen inwieweit der protektive Effekt von cAMP auch in vivo reproduzierbar ist, wurde das zuvor beschriebene und gut etablierte neonatale Pemphigus-Maus-Modell verwendet (Anhalt et al., 1982). Zunächst erhielten die Mäuse 50µl eines physiologischen Puffers je nach Bedingung zusätzlich versetzt mit Isoproterenol (Endkonzentration 10µM) oder Propranolol (Endkonzentration 10µM) für 2h. Danach wurde den Mäusen eine weitere Injektion mit IgG-Fractionen von gesunden Freiwilligen (Kontroll-IgG; Endkonzentration: 5mg/g Körpergewicht) oder IgG-Fractionen von Pemphigus-Patienten (PV-IgG1; Endkonzentration: 3mg/g Körpergewicht / PV-IgG4; Endkonzentration: 6mg/g Körpergewicht) zusammen mit den oben genannten Puffern (PBS/ PBS+Isoproterenol/ PBS+Propranolol) verabreicht. Nach 20h wurde die Haut der Versuchstiere einem definierten mechanischen Stress ausgesetzt und zunächst makroskopisch evaluiert (Abb. 8). Dabei zeigten sich bei den Kontrolltieren keine sichtbaren Veränderungen der Haut. Dagegen konnte bei den Mäusen, welchen Patientenantikörper appliziert wurden, gezeigt werden, dass sie, wie in der Literatur vorbeschrieben, den typischen Phänotyp von Pemphigus vulgaris mit schlaffen Blasen der Epidermis entwickelten (Abb.8: Pfeile). Der β-Rezeptoragonist Isoproterenol konnte diese makroskopisch sichtbare Blasenbildung verhindern. Als Kontrollreagenz wurde auch eine Gruppe an Mäusen mit Propranolol, also einem β-Rezeptorantagonisten behandelt. Dieser war im Gegensatz zu Isoproterenol aber nicht in der Lage die Blasenbildung zu verhindern (Abb. 8: Pfeile). Damit gab es auch in vivo einen Hinweis darauf, dass cAMP-Erhöpfung einen protektiven Effekt bei Pemphigus vulgaris hat.

Tabelle 5: Zusammenfassung der makroskopischen Beurteilung der Maushaut		
Injektion von	Anzahl der Mäuse mit Blasenbildung	Anzahl der Mäuse ohne Blasenbildung
Normal-IgG	0	8
PV1-IgG	8	0
PV1-IgG + Isoproterenol	0	8
PV1-IgG + Propranolol	5	0



Um die morphologischen Veränderungen genauer zu untersuchen, wurde die Maushaut nach der makroskopischen Beurteilung auf verschiedene Arten

weiterverarbeitet. Zum einen wurde die Maushaut kryokonserviert, geschnitten und H.E.-gefärbt sowie Immunfärbungen durchgeführt. Zum anderen wurden aus den betroffenen Bereichen der Haut Lysate für Western-Blot-Experimente gewonnen, um auf Proteinebene nach einem Wirkmechanismus zu suchen.

In der H.E.-Färbung stellt sich die Epidermis der Kontrolltiere als intaktes mehrschichtiges Plattenepithel dar (Abb.9A). In Kontrast dazu ist die suprabasale Spaltbildung in der Epidermis unter PV1-IgG alleine und in Kombination mit Propranolol deutlich sichtbar (Abb.9D,G). Dagegen ist unter PV1-IgG in Kombination mit Isoproterenol keine Blasenbildung zu erkennen (Abb.9J).

Die Verteilung von Dsg3 in der Epidermis wurde durch indirekte Immunfluoreszenzdarstellung untersucht. Auch in der Haut der neonatalen Mäuse konnte die zu erwartende Verteilung in den basalen Epidermisschichten mit einem Gefälle der Konzentration hin zu höheren Hautschichten nachvollzogen werden. Da die Basalzellschicht über viel Dsg3 verfügt, konnte hier des Weiteren gezeigt werden, dass die Spaltbildung tatsächlich suprabasal in der Epidermis zu finden ist und dass unter cAMP-Erhöhung mittels Isoproterenol-Inkubation auch mikroskopisch keine Blasenbildung mehr nachweisbar war.

Um zu überprüfen, ob durch cAMP-Erhöhung die Bindung der Antikörper an der Zelloberfläche unter den Bedingungen verändert wurde, wurde eine direkte Immunfluoreszenzdarstellung gegen den Fc-Teil von humanen IgG durchgeführt (Abb. 9C,F,I,L). In der Haut, die mit Kontroll-IgG injiziert wurden, waren keine Bindungen von IgG-Molekülen in der Epidermis sichtbar (Abb.9C; Epidermis mit * gekennzeichnet). Dagegen ist eine lineare Verteilung der Autoantikörper entlang der Keratinozytenzellmembran in den basalen Schichten der Epidermis unter allen mit PV1-IgG-behandelten Versuchsbedingungen zu sehen (Abb.9F,I,L). Eine Veränderung der Verteilung der IgG-Fractionen unter der Einwirkung von Propranolol oder Isoproterenol konnte nicht beobachtet werden, sodass der protektive Effekt der cAMP-Erhöhung nicht durch die reduzierte Bindung an die desmosomalen Haftmoleküle zu erklären ist.

In Zusammenschau konnte also gezeigt werden, dass eine Erhöhung des cAMP-Spiegels in vivo in der Lage ist, die durch PV-IgG induzierte Blasenbildung vollständig zu blockieren.

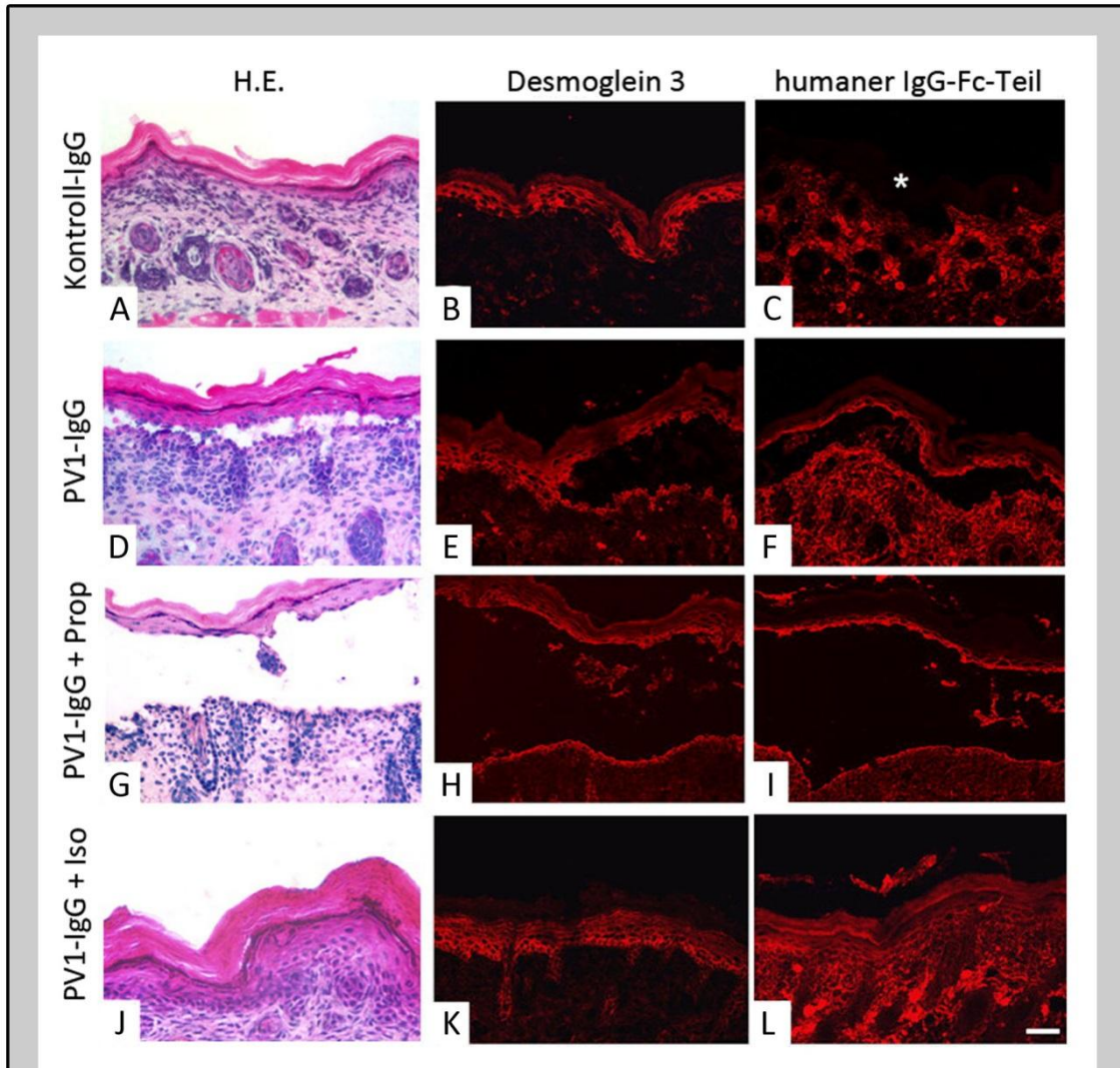


Abb. 9: H.E.-Färbung und immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung der Maushaut

A,D,G,I: Darstellung der gesamten Maushaut im H.E.-gefärbten Schnitt

B,E,H,K: Immunfärbung gegen Dsg3;

C,F,I,L: Immunfärbung gegen den Fc-Teil humaner IgG.

Es tritt eine deutliche suprabasale Spaltbildung in der Epidermis unter PV1-IgG (D-F) sowie unter PV1-IgG + Prop (G-I) auf. Dagegen zeigt sich unter Kontrollbedingungen (A-C) sowie unter PV1-IgG + Isoproterenol (J-L) ein intaktes Hautbild.

Maßstab = 50µm

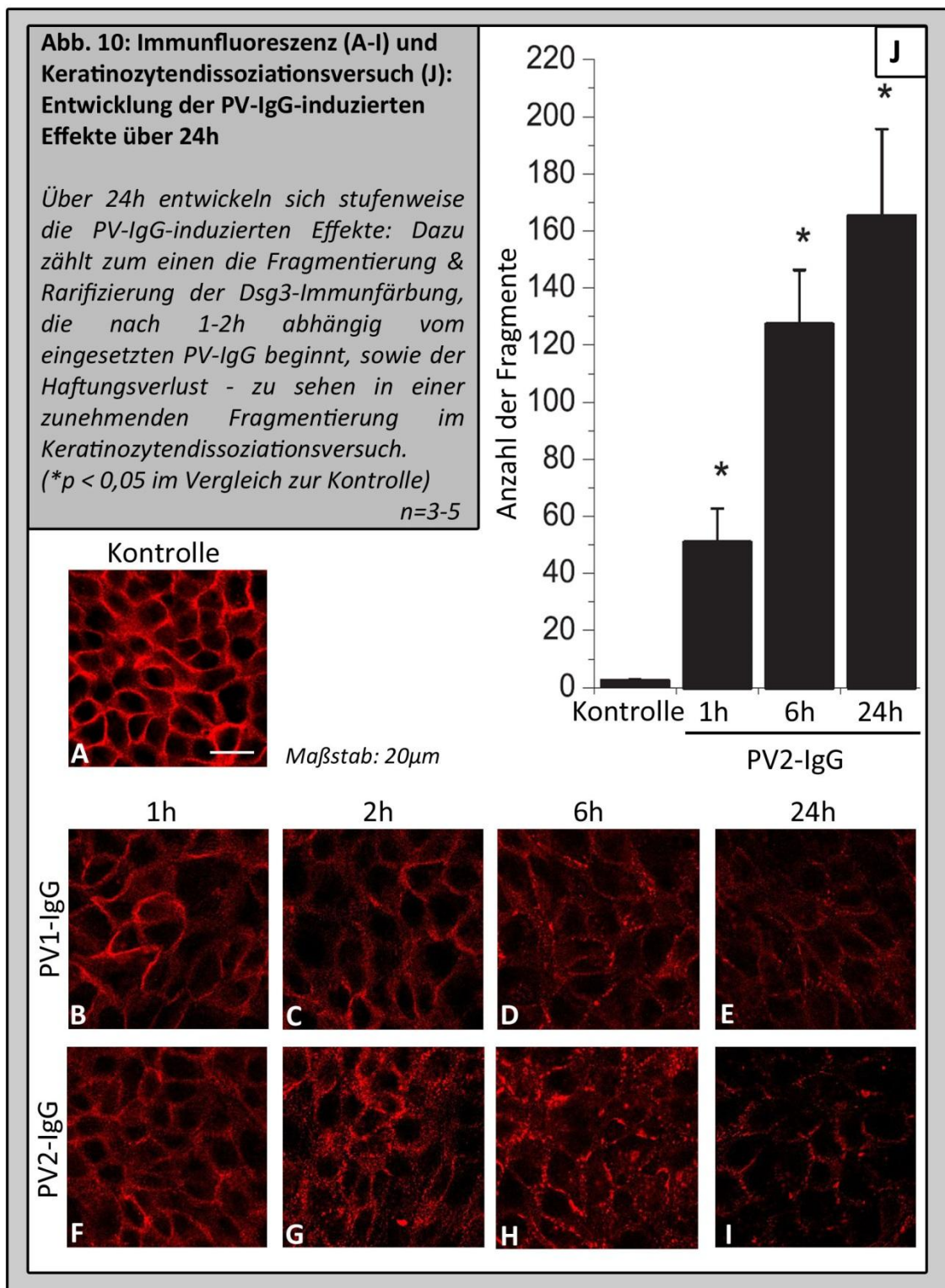
n= 5-8

3.3. Zellregeneration nach PV-IgG

3.3.1. PV-IgG erhöhen die intrazellulären cAMP-Spiegel in HaCaT-Zellen.

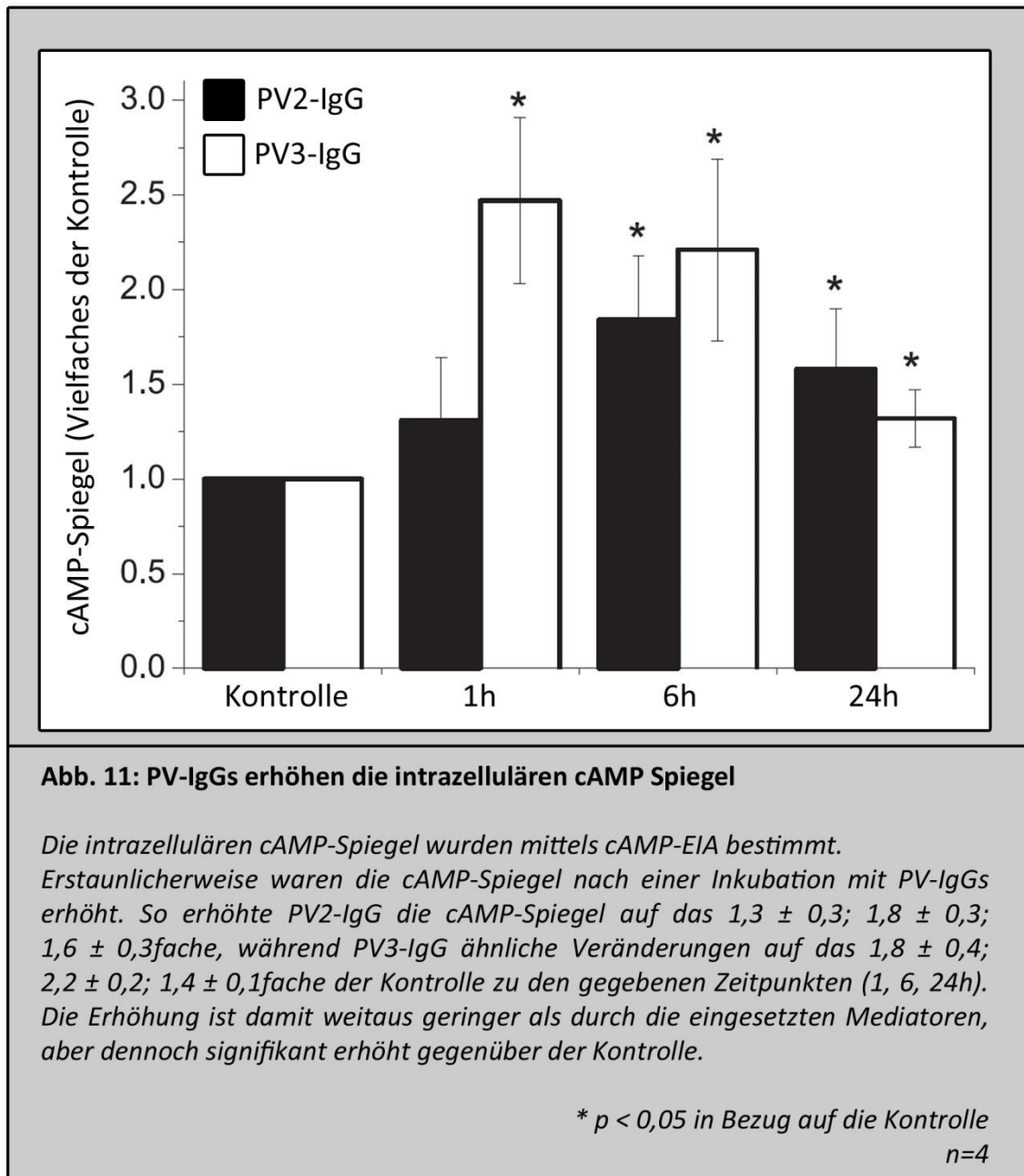
Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine cAMP-Erhöhung in vitro und in vivo einen protektiven Effekt auf den durch PV-IgG vermittelten Haftungsverlust vorweist, stellte sich nun die Frage, ob PV-IgGs selbst mit den intrazellulären cAMP-Spiegeln und damit mit cAMP-Signalwegen interferieren, etwa in dem sie selbst die intrazelluläre cAMP-Konzentration senken und darüber eine Verminderung der interzellulären Haftung vermitteln.

Dazu wurde zunächst untersucht, in welchem Zeitraum sich die durch PV-IgG induzierten Effekte in den HaCaT-Zellen entwickeln, um einen geeigneten Zeitpunkt für die Untersuchung der cAMP-Spiegel in Reaktion auf PV-IgGs auszuwählen. Es wurden Immunfärbungen gegen Dsg3 und Keratinozytendissoziationsversuche durchgeführt, in welchen die Zellen für 1, 2, 6 oder 24 Stunden mit PV-IgGs inkubiert wurden. Bereits nach wenigen Stunden zeigen sich erste Effekte der Inkubation, die über den Zeitverlauf zunahmten. Die Wirkung der PV-IgGs ist also nicht auf die ersten Inkubationsstunden beschränkt, sondern verstärkt sich über die Zeit. In der Immunfärbung konnte abhängig vom eingesetzten PV-IgG nach spätestens 2h eine beginnende Fragmentierung der Dsg3-Färbung (Abb.10A-I) nachvollzogen werden. Im Keratinozytendissoziationsversuch war bereits nach 60min eine deutliche Fragmentierung als Korrelat des desmosomalen Haftungsverlustes zu verzeichnen. Auch hier kam es im weiteren Zeitverlauf zu einer zunehmenden Fragmentierung (Abb. 10J).



Im nächsten Schritt sollte nun untersucht werden, ob auch die PV-IgGs selbst einen Einfluss auf die cAMP-Spiegel in HaCaT-Zellen haben. Dazu wurden konfluente HaCaT-Zellen im Verlauf für 1h sowie für 6 und 24h mit PV-IgGs inkubiert und nachfolgend

jeweils Messungen der cAMP-Spiegel mittels cAMP-EIA durchgeführt. Interessanterweise zeigte sich, dass PV-IgGs den intrazellulären cAMP-Spiegel nicht senken, sondern sogar erhöhen (Abb.11). Es ist also nicht davon auszugehen, dass eine Verminderung des cAMP-Spiegels zu den durch PV-IgG vermittelten Veränderungen in HaCaT Zellen beiträgt.



Entscheidend ist auch, dass diese Steigerung nur in einem geringeren Ausmaß als unter Zugabe von cAMP-erhöhenden Mediatoren stattfindet. In unseren Versuchen konnte

durch die PV-IgGs eine Erhöhung der cAMP-Spiegeln um das 1,6fache (PV2-IgG) bzw. das 1,4fache (PV3-IgG) nach 24h gezeigt werden (Abb. 11), während die Mediatoren die Spiegel auf das knapp 9fache (Abb. 4) der Kontrolle steigerten.

Die Zusammenschau der bis dato gewonnenen Ergebnisse, dass auf der einen Seite eine cAMP-Erhöhung einen protektiven Effekt aufweist und andererseits die cAMP-Spiegel intrazellulär durch PV-IgGs selbst erhöht werden, ließen uns vermuten, dass es einen zellulären Rettungsmechanismus geben könnte, in den cAMP involviert ist. Daher untersuchten wir nachfolgend die Regeneration von HaCaT-Zellen nach einer Inkubation mit PV-IgGs.

3.3.2. HaCaT-Zellen regenerieren innerhalb von 12 Stunden nach PV-IgG Inkubation.

Um zunächst festzustellen, wie sich HaCaT-Zellen spontan, also ohne Zugabe von Mediatoren von den PV-IgG-vermittelten Effekten erholen, wurden Keratinozytendissoziationsversuche durchgeführt. Die konfluenten Zellen wurden dazu für 24h mit PV-IgGs inkubiert, dann wurde der Zellverbund mehrmals mit PBS gewaschen, um alle nicht gebundenen Antikörper abzuwaschen und nachfolgend für die gegebenen Zeiten mit DMEM weiter inkubiert.

Wie in den Versuchen zuvor zeigt sich nach 24h eine deutliche Fragmentierung des Zellverbunds unter Inkubation mit PV2-IgG (Abb.12). Die Regeneration der Zellen beginnt bereits nach einer Stunde und ist nach 12-24h vollständig abgelaufen, sodass kein gesteigerter Haftungsverlust nach dieser Zeit mehr nachzuweisen ist. Im Zeitraum von 1-6h nach dem Wechseln des Mediums hat die Regeneration bereits begonnen, ist allerdings noch nicht abgeschlossen. Daher wurden die nun folgenden Versuche zwei Stunden nach dem Mediumswechsel durchgeführt, um eine mögliche Beeinflussung der Regeneration genauer untersuchen zu können.

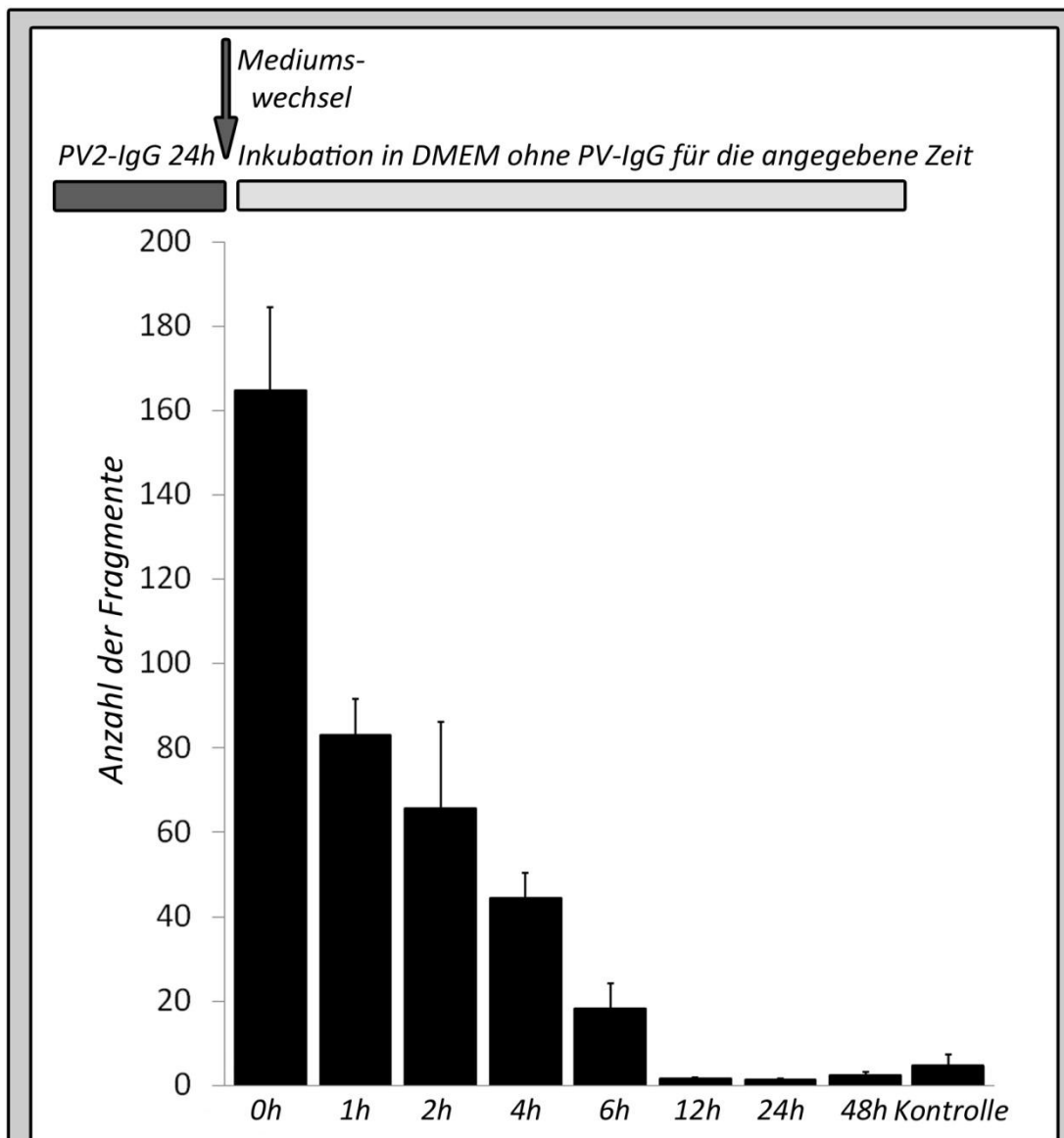


Abb. 12: HaCaT Zellen regenerieren in einem Zeitraum von 12h nach 24h PV-IgG-Inkubation

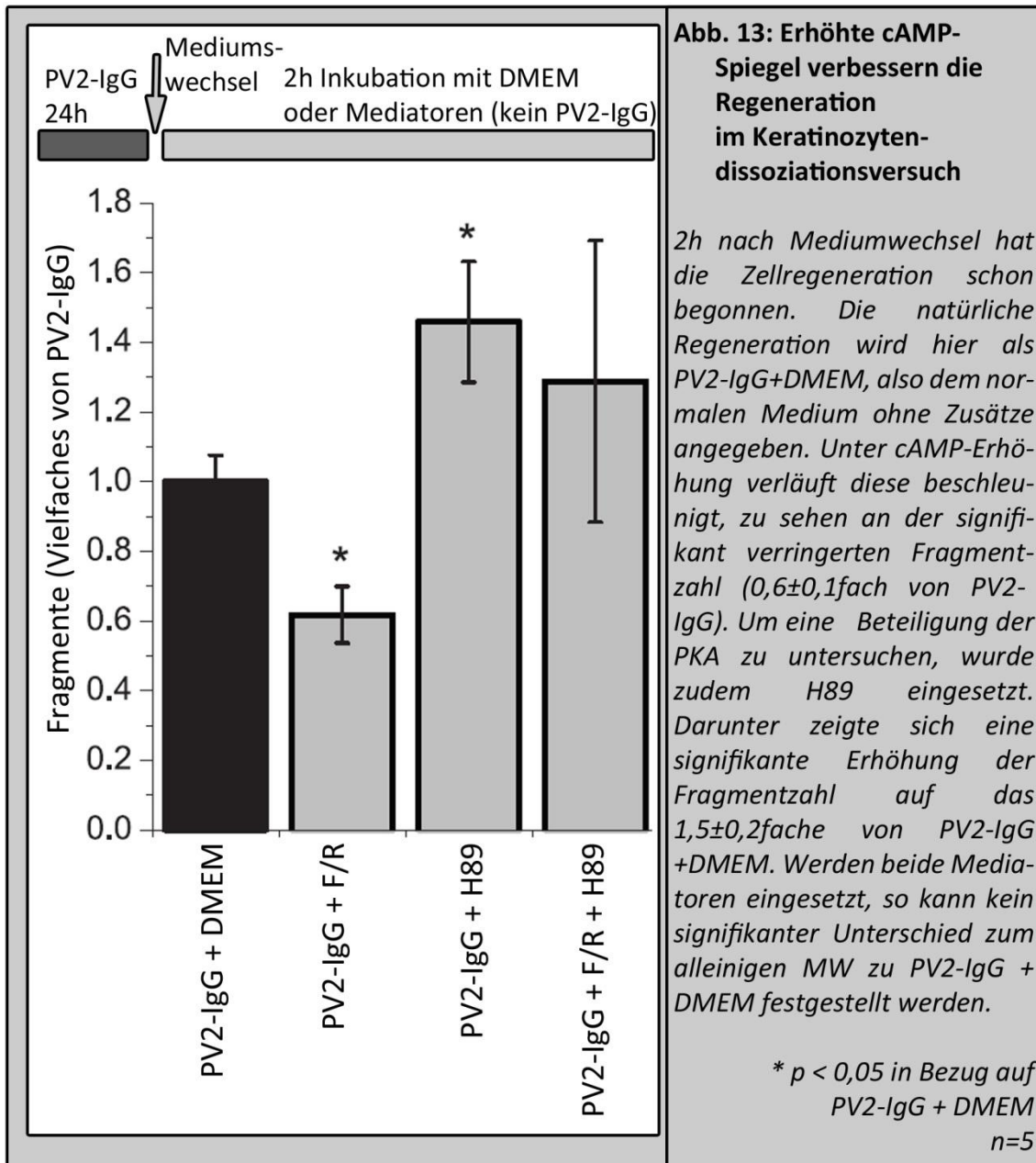
Zur Untersuchung des Regenerationsverhaltens wurden Keratinozytendissoziationsversuche durchgeführt. Dazu wurden konfluente HaCaT-Zellen für 24h mit PV2-IgG inkubiert, danach wurden sie mehrmals mit PBS gewaschen und in normalem Medium für unterschiedliche Zeiten (wie angegeben) weiter gehalten. Nach 24h PV2-IgG Inkubation zeigte sich eine deutliche Fragmentierung im Bereich von 165 ± 20 Fragmenten; bereits 1h nach dem Mediumswechsel (MW) war die Fragmentenzahl auf 83 ± 9 Fragmente reduziert. Im weiteren Verlauf nahmen die Fragmente weiter ab (66 ± 21 Fragmente 2h; 44 ± 6 Fragmente 4h; 18 ± 6 6h nach MW). 12h nach MW war die Fragmentenzahl wieder auf Kontrollniveau zurückgegangen (Kontrolle: $2 \pm 0,3$; 12h nach MW: 5 ± 3 Fragmente). Dies blieb auch nach 24 und 48h genauso.

$n=3$

3.3.3. Erhöhung des cAMP-Spiegels beschleunigt die Regeneration der Zelladhäsion *in vitro*.

Um nun zu untersuchen, ob cAMP einen Einfluss auf die Regeneration von Keratinozyten nach PV-IgG hat, wurden weitere Versuche mit den bekannten cAMP-erhöhenden Mediatoren F/R und Isoprotenerol durchgeführt. Die Zellen wurden für 24h mit PV-IgG inkubiert; anschließend wurden sie mit PBS gewaschen und weitere 2h mit den unten angegebenen Versuchsbedingungen behandelt. Da die Zellen aber auch eine Erhöhung des cAMP-Spiegels auf die Inkubation mit PV-IgGs zeigten, war es zudem von Interesse, über welchen Signalweg diese Erhöhung zustande kommt und ob eine Blockade dieses Signalweges die Regenerationsfähigkeit der Zellen beeinträchtigt. Daher wurde für den folgenden Versuch auch H89 eingesetzt. Dabei handelt es sich um einen Inhibitor der Proteinkinase A (PKA). Dieses wichtige Enzym des Zellstoffwechsels ist wie bereits beschrieben an einer Vielzahl von Signalwegen beteiligt, darunter auch der Modulation der Cadherin-Haftung unter verschiedenen Bedingungen im Endothel (Schlegel und Waschke, 2013), und stellt daher einen interessanten Ansatzpunkt in Bezug auf diese Studie dar. Die Untersuchung dieses Signalweges war auch deswegen naheliegend, da PKA bereits in Zusammenhang mit Wundheilung und Migration von Keratinozyten gebracht wurde (Pullar et al., 2001).

Es zeigte sich, dass die Regeneration durch die Erhöhung des cAMP-Spiegels beschleunigt werden konnte. 2h nach Mediumswechsel zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen spontaner Erholung der Zellen (Abb.13) und jener, die mit cAMP-erhöhenden Mediatoren unterstützt wurde. Diese Zellen zeigten eine deutlich stärkere Abnahme der Fragmentierung (Abb.13: Fragmente: PV2-IgG+F/R $0,6 \pm 0,1$ fache der Kontrolle) als Hinweis, dass hier die Zellregeneration verbessert wurde. Umgekehrt lief in den Zellen, die mit H89 behandelt wurden, die Zellregeneration scheinbar schlechter ab, da hier noch eine signifikant erhöhte Fragmentzahl zu verzeichnen war (Abb. 13: Fragmente: PV2-IgG+H89: $1,5 \pm 0,2$ fache der Kontrolle).



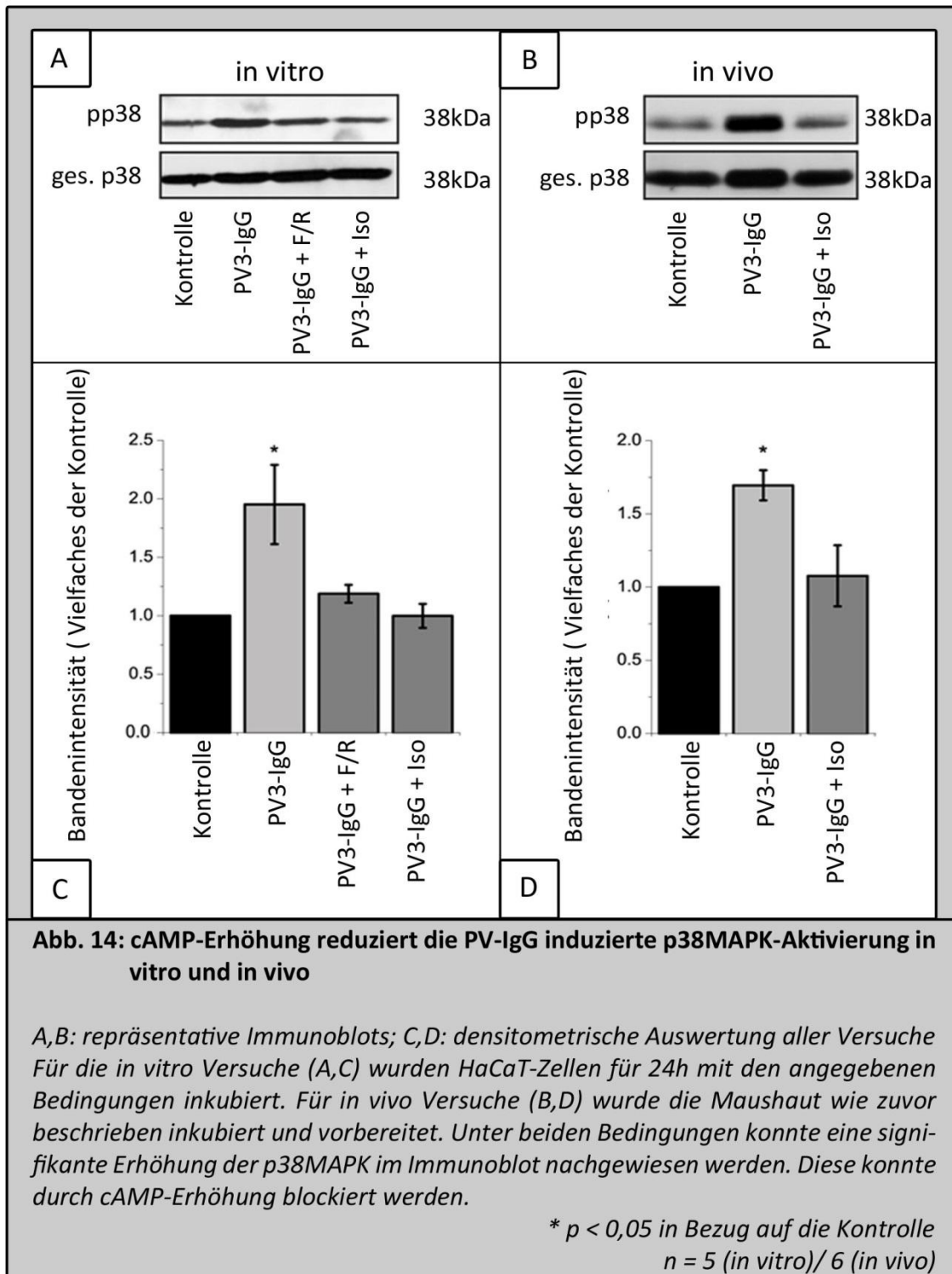
Damit ist eine Beteiligung der PKA an der Regeneration der Zellen wahrscheinlich. Bei gleichzeitiger Inkubation von F/R und H89 war der protektive Effekt von F/R partiell aufgehoben; es war keine signifikante Veränderung der Zellregeneration im Vergleich zur spontanen Regeneration zu verzeichnen. Damit lässt sich spekulieren, dass F/R seine Wirkung hier nicht alleinig über die Aktivierung der PKA entfaltet, sondern vielmehr auch in andere Signalwege z.B. jenen über Epac 1 eingreift und damit die Verzögerung der Regeneration, die durch PKA-Inhibition auftrat zumindest teilweise aufheben kann. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass unter H89 die Blockade

der PKA nicht vollständig ist. Zusammenfassend zeigt sich also, dass die Regeneration von PV-IgGs cAMP abhängig geschieht und das in dem zugrunde-legendem Signalweg wahrscheinlich PKA involviert ist.

3.4. cAMP-Erhöpfung vermindert die durch PV-IgG induzierte p38MAPK-Aktivierung.

Nachdem beobachtet wurde, dass die zelluläre cAMP-Erhöpfung einen möglichen Regenerationsmechanismus in Antwort auf die PV-IgGs darstellt und die Verstärkung dieses Mechanismus in vitro und in vivo protektiv ist, konnte eine Beteiligung von PKA in vitro gezeigt werden. Als potentiell ihr nachgeschaltetes Signalmolekül ist die p38MAPK in dieser Studie von besonderem Interesse, weil sie mehrfach als ein zentrales Signalmolekül in der Pemphiguspathogenese herausgestellt wurde (Waschke, 2008). Sie wird als Antwort auf PV-IgGs phosphoryliert und damit aktiviert, was sowohl in vitro als auch in vivo nachgewiesen werden konnte (Berkowitz et al., 2005; Berkowitz et al., 2006). Daher wurde in dieser Studie ebenso in vitro und in vivo Western Blot Experimente gegen die phosphorylierte Form der p38MAPK durchgeführt. Als Ladekontrolle diente der Gesamtgehalt der p38MAPK im jeweiligen Lysat. Die Lysate wurden für die in vitro- Versuche aus HaCaT-Zellen gewonnen, die für 24h mit PV3-IgG alleine oder simultan mit F/R bzw. Iso inkubiert wurden. Die Maushaut wurde wie oben beschrieben aus den gleichen Versuchstieren gewonnen, die zuvor gezeigt wurde.

Es zeigte sich eine deutliche Aktivierung der p38MAPK sowohl in der Keratinozytenkultur als auch läsional in der Maushaut. Ebenso konnte die Aktivierung der p38MAPK in beiden Fällen durch simultane Zugabe der cAMP-erhöhenden Mediatoren blockiert werden. Dies deutet an, dass die cAMP-Erhöpfung protektiv ist, da sie einen zentralen Mechanismus bei der Pemphigus-Pathogenese, nämlich die Aktivierung der p38MAPK, inhibiert.



4. DISKUSSION

4.1. cAMP wirkt protektiv bei Pemphigus vulgaris

Die Daten dieser Studie zeigen die protektive Wirkung einer intrazellulären cAMP-Erhöhung auf PV-IgG-induzierte Effekte. Sowohl der typisch für Pemphigus vulgaris auftretende Haftungsverlust in Keratinozytenkulturen wie die Blasenbildung im Pemphigus-Maus-Modell konnten positiv beeinflusst werden. Zusätzlich wurde in vitro gezeigt, dass eine cAMP-Erhöhung PV-IgG-induzierte morphologische und funktionelle Veränderungen verbesserte und die Dsg3-Depletion dadurch aufgehoben wurde.

4.1.1. cAMP-Erhöhung verhindert den PV-IgG-induzierten Verlust der Zell-Zell-Adhäsion in Keratinozytenkultur und Blasenbildung im Pemphigus-Maus-Modell.

Zell-Zell-Kontakte sind essentiell für das Funktionieren von Geweben und ganzen Organismen (Brooke et al., 2012). Desmosomen als stärkste Zell-Zell-Verbindungen in der Haut sind für die Integrität und Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischem Stress unerlässlich (Kowalczyk und Green, 2013). Dabei vermitteln desmosomale Cadherine eine starke interzelluläre Haftung durch homo- und heterophile Bindung aneinander, während verschiedene Plaqueproteine eine Verbindung zum Intermediärfilamentnetz herstellen (Kitajima, 2013). Sie erfüllen damit wichtige Aufgaben unter physiologischen Bedingungen und sind darüber hinaus Zielstrukturen verschiedener Erkrankungen (Amagai und Stanley, 2012). Dennoch sind die genauen Mechanismen der Regulation der desmosomalen Haftung noch unvollständig verstanden (Spindler und Waschke, 2014). Eine weitere Aufklärung dieser Mechanismen ist in Anbetracht

weitgehend fehlender Ansatzpunkte für eine effiziente Therapie des PV auch von hohem klinischen Interesse.

Der Einfluss von cAMP auf die Haftung desmosomaler Cadherine wurde bisher nicht untersucht. Somit sind die Daten der vorliegenden Arbeit die ersten, die nahelegen, dass cAMP die desmosomale Haftung stärkt. Dies konnte in kultivierten Keratinozyten in Zelldissoziationsversuchen gezeigt werden. In jenen konnte beobachtet werden, dass die PV-IgG-induzierte Fragmentierung der Zellschichten durch simultane Inkubation mit cAMP-erhöhenden Mediatoren weitgehend verhindert werden konnte.

Mit dem gut etablierten neonatalen Pemphigus-Maus-Modell konnte weiterhin auch in vivo der protektive Effekt einer cAMP-Erhöhung nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit anderen Arbeitsgruppen konnte nach PV-IgG-Gabe zunächst die Bildung schlaffer Blasen und als histologisches Korrelat eine suprabasale Spaltbildung in der Epidermis nachvollzogen werden (Takahashi et al., 1985). Hier kam das β -Sympathomimetikum Isoproterenol zum Einsatz, welches die Blasenbildung nach PV-IgG-Injektion vollständig verhindern konnte.

In der Literatur existieren schon einige interessante Vorbefunde, die zum einen zeigen, dass cAMP mit der Haftung von klassischen Cadherinen interferiert und zum anderen an der Regulation verschiedener Keratinozytenfunktionen beteiligt ist. So konnte zum Beispiel herausgestellt werden, dass eine cAMP-Erniedrigung eine gerichtete Migration von Keratinozyten im elektrischen Feld begünstigt (Pullar und Isseroff, 2005) sowie darüber hinaus die epidermale Barriewiederherstellung fördert und damit einen wichtigen Beitrag zur Homöostase der Epithelbarriere leistet (Denda et al., 2003). In weiteren Studien wurde der Einfluss von cAMP auf das Proliferationsverhalten von Keratinozyten untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Produktion des Keratinozytenwachstumsfaktors in Fibroblasten durch cAMP-Erhöhung gesteigert werden kann und damit die Haut so über eine Dickenzunahme vor UV-induzierter Schädigung geschützt wird (Scott et al., 2012). In diesem Zusammenhang wurde bewiesen, dass cAMP in konfluenten Keratinozyten zu einer verminderten Phosphorylierung von ERK (engl.: „extracellular regulated kinase“) und einer

verlangsamten Zellproliferation führt, dagegen war sowohl der Effekt auf die ERK-Phosphorylierung als auch auf die Zellproliferation in subkonfluenten Keratinozytenkulturen gegensinnig (Takahashi et al., 2004). Weiterhin blockierte eine cAMP-Erhöhung eine TGF- β -induzierte Zellmigration und invasives Wachstum, indem es PKA-abhängig die Spaltung von E-Cadherin-Bindungen verhinderte (Santibanez et al., 2003). In logischer Konsequenz dazu stehen Beobachtungen bei Tumorerkrankungen, die zeigen, dass invasiv wachsende Zellen Zelladhäsionsmoleküle herunterregulieren (Jeanes et al., 2008). Ein positiver Einfluss von cAMP auf die VE-Cadherin-vermittelte Haftung konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Noda et al., 2010). Ebenso gibt es Daten aus der Endothelforschung, die verdeutlichen, dass cAMP die Blut-Gewebe-Schranke stabilisiert und dies teilweise über die Verbesserung der VE-Cadherin Adhäsion geschieht (Fukuhara et al., 2005; Kooistra et al., 2005).

Die Vielzahl der Daten zur Modulation der Eigenschaften von Adhäsionsmolekülen durch cAMP, machen die Ergebnisse dieser Arbeit gut nachvollziehbar. Dazu passend wurde gezeigt, dass β -Rezeptoragonisten, wie sie auch hier verwendet wurden, die intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen und darüber die Endothelbarriere stärken (Borges et al., 1994; Spindler et al., 2011b; Wegener et al., 1999). Interessanterweise konnte eine cAMP-Erhöhung mittels β -Rezeptoragonisten ebenso wie F/R effektiv die PV-IgG-Wirkung auf die Zelladhäsion abmildern. Diese Ergebnisse fügen sich gut in die in der Literatur beschriebenen Erkenntnisse ein, dass auch Keratinozyten β 2-adrenerge Rezeptoren sowie Enzyme für die Katecholaminsynthese exprimieren und darüber hinaus Epinephrin produzieren, um das zelluläre Verhalten über para- und autokrine Signalwege zu beeinflussen (Grando et al., 2006). Dadurch wird wahrscheinlich, dass Zelladhäsion in der Epidermis auch teilweise adrenerg beeinflusst werden kann und β -Rezeptor-vermittelte Signalwege dazu einen Beitrag leisten. β -Rezeptoren scheinen auch deswegen bei den protektiven Effekten eine Rolle zu spielen, da Propranolol, ein β -Rezeptorantagonist, im Gegensatz zu Isoproterenol keine Verbesserung der PV-IgG-induzierten Veränderungen erzielen konnte.

Mittels direkter Immunfluoreszenzdarstellung konnte außerdem gezeigt werden, dass die cAMP-Erhöpfung keinen Einfluss auf das Bindungsprofil der Antikörper in der Epidermis hat. Daher ist wahrscheinlich, dass auch in vivo die oben genannten protektiven Signalwege eine Rolle spielen. Die Aktivierung der p38MAPK ist hier ein als zentral beschriebener Pathomechanismus, dessen Blockade unter anderem in dem in dieser Arbeit verwendeten Maus-Modell protektiv ist (Berkowitz et al., 2006).

4.1.2. cAMP-Erhöpfung vermindert die Dsg3-Reorganisation und Depletion in der Keratinozytenkultur.

Auch unter morphologischen Gesichtspunkten und auf Proteinebene ließ sich eine deutliche Verbesserung der PV-IgG-induzierten Effekte erzielen. So konnte in der Immunfluoreszenzdarstellung gegen Dsg3 gezeigt werden, dass die Fragmentierung und der Verlust der Färbung durch cAMP-Erhöpfung deutlich verringert werden konnte. Beides sind typische Effekte einer PV-IgG-Inkubation, die unter anderem dadurch entstehen, dass Dsg3 von der Zellmembran verschwindet und Desmosomen abgebaut werden, was zumindest teilweise ein Endozytose-vermittelter Prozess ist (Calkins et al., 2006). Die Internalisierung von Haftproteinen als Reaktion auf Autoantikörper wurde auch im Hinblick auf andere desmosomale Cadherine, wie auf Dsg1 in Zusammenhang mit Pemphigus foliaceus, beschrieben (Lanza et al., 2007; van der Wier et al., 2012). Generell stellt die Depletion von desmosomalen Haftmolekülen einen wichtigen Pathomechanismus in der Pemphigus-Pathogenese dar (Waschke, 2008). In Western-Blot-Experimenten konnte in der vorliegenden Arbeit die Depletion von Dsg3 unter PV-IgG-Inkubation nachgewiesen und durch simultane cAMP-Erhöpfung fast vollständig blockiert werden. Die Depletion scheint dabei das Korrelat des oben erwähnten Verlusts der Dsg3-Färbung auf Proteinebene darzustellen (Saito et al., 2012).

Es konnten bereits verschiedene Signalwege gezeigt werden, die die Depletion von Dsg3 verhindern und auch funktionell protektiv bei Pemphigus vulgaris sind, darunter

die Inhibition der Proteinkinase C (Cirillo et al., 2010; Kitajima et al., 1999; Spindler et al., 2011a) und die Blockade der bereits zuvor erwähnten p38MAPK-Aktivierung (Bektas et al., 2013; Jolly et al., 2010). Letztere ist deswegen in Zusammenhang mit den in dieser Arbeit gewonnenen Daten besonders interessant, weil die p38MAPK ein bekanntes Zielmolekül von cAMP-vermittelten Signalwegen darstellt (Teramoto, 2013) und wurde daher in dieser Arbeit auch noch genauer untersucht.

4.2. Der protektive Effekt von cAMP könnte durch die Hemmung der p38MAPK-Aktivierung zustande kommen.

Der p38MAPK-Signalweg nimmt, wie bereits ausgeführt, einen zentralen Platz in der Pemphigus-Pathogenese ein. Seine Blockade ist *in vitro* und *in vivo* in der Lage den Haftungsverlust zu blockieren (Berkowitz et al., 2008a; Berkowitz et al., 2005; Spindler et al., 2009). Es wurde weiterhin gezeigt, dass die Inaktivierung der p38MAPK die Dsg3-Depletion sowie die Zytokeratinretraktion als Folge einer Inkubation mit PV-IgGs hemmt (Spindler und Waschke, 2014). Neuere Arbeiten zeigen zudem, dass die p38MAPK mit Dsg3 kolokalisiert und gerade dort als Antwort auf AK23, einem monoklonalen Antikörper aus einem Pemphigus vulgaris-Maus-Modell, aktiviert wird. Dabei wird angenommen, dass beide Proteine Teile eines Signalkomplexes sind, der das Intermediärfilamentnetz reguliert (Spindler et al., 2013). Außerdem konnte eine p38MAPK-abhängige Reduktion der RhoA-Aktivität durch Pemphigus-Autoantikörper herausgestellt werden (Waschke et al., 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob eine cAMP-Erhöhung über die Blockade der p38MAPK-Aktivierung wirkt. Die Western-Blot-Experimente dieser Arbeit zeigen eine deutliche Verminderung der PV-IgG-vermittelten Aktivierung der p38MAPK, was auf eine Verbindung dieser beiden Signalwege schließen lässt. Diese Daten werden durch Ergebnisse unterstützt, die anzeigen, dass Keratinozyten eine verminderte Chemokinproduktion über cAMP/PKA-vermittelte Reduktion der p38MAPK-Aktivität in einem Modell für

atopische Dermatitis aufweisen (Qi et al., 2009). Die Beteiligung von PKA konnte auch im Rahmen dieser Arbeit nachvollzogen werden. In Keratinozytendissoziationsversuchen zeigte sich, dass die cAMP-Erhöhung Einfluss auf PKA-abhängige Signalwege hat und möglicherweise darüber die p38MAPK-Aktivierung sowohl in vitro als auch in vivo zu blockieren vermag. Weiterhin konnte herausgestellt werden, dass eine Blockade der PKA durch H89 im Keratinozytendissoziationsversuch zu einer verlangsamten Zellregeneration führt. Es wurde also über PKA und p38MAPK ein Mechanismus dargestellt, über den cAMP protektiv wirken kann. Durch die Beeinflussung von p38MAPK als zentrales Molekül der Pemphigus-Pathogenese scheint cAMP in der Lage zu sein, die beiden wichtigsten zellulären Antworten auf die PV-IgG-Bindung, die Dsg3-Depletion und die Zytokeratinretraktion (Spindler und Waschke, 2014), zu vermindern. Obgleich die Zytokeratinretraktion in dieser Studie nicht untersucht wurde, ist es durch den Zusammenhang zwischen cAMP-Erhöhung und Blockade der Aktivierung der p38MAPK nicht unwahrscheinlich, dass auch dieses Phänomen durch eine cAMP-Erhöhung positiv beeinflusst werden könnte, da p38MAPK auch zentral an der Zytokeratinretraktion beteiligt ist (Bektas et al., 2013).

4.3. Die cAMP-Erhöhung könnte einen zellulärer Rettungsmechanismus darstellen.

Durch cAMP-EIA-Experimente nach PV-IgG-Inkubation konnte eine cAMP-Erhöhung als zelluläre Reaktion auf PV-IgGs gezeigt werden. Passend dazu war auch die Zellerholung nach PV-IgG-Inkubation bei pharmakologisch erhöhten cAMP-Spiegeln beschleunigt. Pemphigus-IgG-Inkubation verändert eine Vielzahl verschiedener zellulärer Signalwege (Kitajima, 2013; Kitajima et al., 1999; Spindler und Waschke, 2014). Typischerweise scheinen die Veränderungen deswegen in einem kausalen Zusammenhang mit Pemphigus vulgaris zu stehen, weil die Modulation der Signalwege die PV-IgG induzierten Veränderungen blockieren kann. Eine solche Beziehung konnte, wie bereits

ausgeführt, für p38MAPK, aber auch für RhoA, Plakoglobin und verschiedene andere Signalwege nachgewiesen werden (Caldelari et al., 2001; Chernyavsky et al., 2007; Tucker et al., 2013; Waschke et al., 2006). Im Fall von cAMP scheint es aber so zu sein, dass PV-IgGs selbst einen protektiven Signalweg anwerfen, indem die Zelle den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöht. PV-IgGs induzierten einen 1,5fachen Anstieg des cAMP-Spiegels im 24h Zeitverlauf. Auch wenn eine pharmakologische Erhöhung des cAMP-Spiegels auf etwa das 9fache den PV-IgG-vermittelten Haftungsverlust größtenteils verhindern konnten, sollte dem durch PV-IgG hervorgerufenen Effekt besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden, denn auch schon eine kleine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels mag eine große Veränderung in Antwort auf ein Agens darstellen, wenn man sich vor Augen führt, dass cAMP-Signalwege streng reguliert ablaufen und auf bestimmte Zellkompartimente beschränkt werden können (Fischmeister, 2006). Der verglichen mit den Mediatoren geringe Umfang der cAMP-Erhöhung kann eine Erklärung für unsere Daten sein, dass Keratinozyten zwar in der Lage sind, einen Rettungsmechanismus als Antwort auf PV-IgGs zu induzieren, der aber letztlich in der gegebenen Intensität nicht stark genug ist, die Effekte der PV-IgGs zu blockieren. Dennoch lässt sich spekulieren, dass die PV-IgG-induzierten Effekte dadurch abgeschwächt werden können. Dazu passt, dass die Zellregeneration bei Inhibition der PKA und damit des cAMP-vermittelten protektiven Signalwegs verzögert abläuft.

Zelluläre Rettungsmechanismen als Antwort auf schädigende Umwelteinflüsse sind gut etabliert, etwa als Adaption und Überlebensmechanismus von Zellen unter Einfluss von Hypoxie-induzierenden Faktoren bei verringertem Sauerstoffangebot (Lendahl et al., 2009; Wang et al., 1995). Auch Adhäsionsverlust von epithelialen Zellen kann in verschiedenen protektiven Signalwegen resultieren. In intestinalen und Brustepithelzellen sind Kinasen der Src-Familie aktiviert, wenn die Zellen von der Basalmembran losgelöst werden. Sie verzögern die Anoikose in Enterozyten, die letztlich einen Verlust der Zelladhäsion nach sich ziehen würde (Lin et al., 2004; Loza-Coll et al., 2005). Es ist also wohl nicht selten, dass als Antwort auf Zelladhäsionsverlust protektive Signalwege initiiert werden. Der direkte Auslöser für die protektive cAMP-

Erhöhung konnte bisher nicht festgestellt werden. Eine Erklärung könnte sein, dass der Verlust der zellulären Adhäsion direkt einen Stimulus zur cAMP-Erhöhung darstellt. Das kann möglicherweise durch Desmogleine ausgelöst werden, für die es mittlerweile mehr und mehr Evidenz gibt, dass sie als Signalrezeptoren fungieren (Kitajima, 2013; Mavropoulos et al., 2013; Spindler et al., 2013). Daneben könnten aber auch noch andere Moleküle beteiligt sein, die sowohl Adhäsions- als auch Rezeptormoleküle sind, wie etwa E-Cadherin und Integrine (Epifano und Perez-Moreno, 2012).

Die cAMP-Erhöhung könnte auch eine spezifische Reaktion auf nicht desmosomale Antikörper sein. Bei Pemphigus vulgaris sind neben den klassischen Autoantikörpern gegen Dsg1 und 3 auch weitere gegen verschiedene andere Proteine nachweisbar (Nguyen et al., 2000; Vu et al., 1998). Hierbei sind besonders Antikörper gegen den Acetylcholin-Rezeptor zu erwähnen, die bei Pemphigus vulgaris gezeigt wurden (Grando, 2000). Es ist möglich, dass die Antikörper nach Bindung an die G-Protein-gekoppelten muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren die intrazellulären cAMP-Spiegel verändern.

In Zusammenschau der Ergebnisse scheint der Rettungsmechanismus also cAMP-abhängig zu einer verminderten Aktivierung der p38MAPK zu führen. Weil dieser Signalweg aber schon in geringem Umfang durch PV-IgG internal aktiviert wird, kann eine pharmakologische Erhöhung des cAMP-Spiegels ein interessanter Ansatz für eine spezifische Therapie bei Pemphigus sein, der zudem mit geringen Nebenwirkungen verbunden sein könnte. Da Keratinozyten vor allem β 2-Rezeptoren exprimieren (Schallreuter et al., 1993), könnten diese selektiv therapeutisch angegangen werden. Eine Vielzahl von β 2-Rezeptor-spezifischen Agonisten sind verfügbar und werden beispielsweise in der Asthmatherapie routinemäßig eingesetzt (Prenner, 2008).

4.4. Ausblick

Pemphigus vulgaris stellt, als Krankheitsmodell für Autoimmunerkrankungen auf der einen und über die Nutzung der Autoantikörper zur Modulation der desmosomalen Haftung auf der anderen Seite, ein wichtiges klinisches wie grundlagenorientiertes Forschungsthema dar. Dies gilt insbesondere deswegen, weil die Pathogenese weiterhin nur unvollständig verstanden ist, die Behandlungsmöglichkeiten aufgrund dessen noch keinen kausalen Ansatz bieten und wegen ihres Nebenwirkungsspektrums weiterhin als unbefriedigend bezeichnet werden müssen. Als Fortführung dieser Arbeit wären daher verschiedene Ansatzpunkte interessant.

So zum Beispiel im Hinblick darauf, dass nicht abschließend beurteilt werden konnte, ob der zelluläre cAMP-Anstieg durch Autoantikörper gegen Desmoglein 1 bzw. 3 ausgelöst wurde. Stattdessen kommen auch andere Antikörper in Frage, da für PV-IgGs herausgestellt wurde, dass sie auch Autoantikörper gegen viele weitere Antigene enthalten (Vu et al., 1998). Es wäre also eine genauere Identifizierung des cAMP-erhöhenden Antikörpers von Interesse. Dies könnte etwa durch Studien mit monoklonalen Pemphigus-Autoantikörpern untersucht werden.

Für die in vivo-Experimente wurden den Mäusen die cAMP-erhöhenden Mediatoren subkutan injiziert. Im Hinblick auf die mögliche therapeutische Anwendung über einen längeren Zeitraum wäre es daher interessant, eine Möglichkeit zu entwickeln, die Mediatoren auch topisch anwenden zu können. So konnte zuletzt für ein speziell entwickeltes Peptid nachgewiesen werden, dass es auch bei topischer Anwendung protektiv wirkt (Spindler et al., 2013).

Schlussendlich wäre die genaue Aufklärung des Signalwegs, über den cAMP die desmosomale Haftung stärkt, interessant, um für therapeutische Belange ein noch genaueres Zielmolekül herausstellen zu können.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Desmosomen sind Zell-Zell-Kontakte, die eine starke interzelluläre Haftung vermitteln. Sie sind daher besonders wichtig für die Integrität von Geweben wie der Haut, die laufend einer starken mechanischen Beanspruchung ausgesetzt sind. Pemphigus vulgaris ist eine Autoimmundermatose, die zur Ausbildung schlaffer Blasen durch Spaltbildung in der Epidermis führt. Als ursächlich dafür wurden Autoantikörper gegen die desmosomalen Cadherine Dsg1 und 3 herausgestellt, die in Desmosomen vorkommen. cAMP ist ein wichtiger Botenstoff des Zellstoffwechsels und an der Regulierung und Modulation einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt, darunter auch die Stabilisierung der Endothelbarriere über Stärkung der Haftung eines klassischen Cadherins, nämlich VE-Cadherin.

In Anknüpfung an die vorliegenden Daten aus Pemphigus- und Endothelforschung beschäftigt sich diese Arbeit mit der Rolle von cAMP bei Pemphigus vulgaris. Es wurde in Keratinozytenkultur sowie im neonatalen Pemphigus-Mausmodell untersucht, ob die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel einen Einfluss auf PV-IgG-induzierte morphologische und funktionelle Veränderungen hat.

Eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als protektiv herausgestellt werden. In Keratinozytenkultur konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels durch Forskolin/Rolipram oder Isoproterenol in der Lage war, die PV-IgG-induzierten morphologischen Veränderungen, die Dsg3-Depletion, sowie den Adhäsionsverlust zu blockieren. Weiterhin konnte die Blasenbildung *in vivo* durch cAMP-Erhöhung vollständig verhindert werden.

Im Anschluss wurde untersucht, ob die Inkubation mit PV-IgGs einen Einfluss auf die intrazellulären cAMP-Spiegel *in vitro* hat. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Zellen mit einer Erhöhung der cAMP-Spiegel reagieren, wenn auch in einem geringeren Ausmaß als durch die eingesetzten Mediatoren. Somit kann cAMP als

Rettungsmechanismus der Zellen angesehen werden und es wurde daraufhin der Einfluss von cAMP auf die Regeneration von Keratinozyten nach PV-IgG-Inkubation untersucht. Dieser Prozess konnte durch eine cAMP-Erhöhung verbessert werden und erwies sich als partiell abhängig von PKA. Schlussendlich konnte nachgewiesen werden, dass cAMP in vitro wie in vivo über die Blockade der p38MAPK-Aktivierung protektiv wirkt.

Zusammenfassend konnte so ein neuer Einblick in die zelluläre Antwort von Keratinozyten auf Pemphigus-Autoantikörperbindung gewonnen werden. Dieser könnte auch im Hinblick auf die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien bei Pemphigus vulgaris wichtig sein.

6. LITERATUR

- Abreu-Velez, A.M., M.S. Howard, Z. Jiao, W. Gao, H. Yi, H.E. Grossniklaus, M. Duque-Ramirez, and S.C. Dudley, Jr. 2011. Cardiac autoantibodies from patients affected by a new variant of endemic pemphigus foliaceus in Colombia, South America. *J Clin Immunol.* 31:985-997.
- Adamson, R.H., B. Liu, G.N. Fry, L.L. Rubin, and F.E. Curry. 1998. Microvascular permeability and number of tight junctions are modulated by cAMP. *Am J Physiol.* 274:H1885-1894.
- Ahmad, F., E. Degerman, and V.C. Manganiello. 2012. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3 signaling complexes. *Horm Metab Res.* 44:776-785.
- Amagai, M. 2009. The molecular logic of pemphigus and impetigo: the desmoglein story. *Vet Dermatol.* 20:308-312.
- Amagai, M. 2010. Autoimmune and infectious skin diseases that target desmogleins. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 86:524-537.
- Amagai, M., V. Klaus-Kovtun, and J.R. Stanley. 1991. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell.* 67:869-877.
- Amagai, M., N. Matsuyoshi, Z.H. Wang, C. Andl, and J.R. Stanley. 2000. Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1. *Nat Med.* 6:1275-1277.
- Amagai, M., and J.R. Stanley. 2012. Desmoglein as a target in skin disease and beyond. *J Invest Dermatol.* 132:776-784.
- Anhalt, G.J., R.S. Labib, J.J. Voorhees, T.F. Beals, and L.A. Diaz. 1982. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. *N Engl J Med.* 306:1189-1196.
- Aoyama, Y., and Y. Kitajima. 1999. Pemphigus vulgaris-IgG causes a rapid depletion of desmoglein 3 (Dsg3) from the Triton X-100 soluble pools, leading to the formation of Dsg3-depleted desmosomes in a human squamous carcinoma cell line, DJM-1 cells. *J Invest Dermatol.* 112:67-71.
- Awad, M.M., H. Calkins, and D.P. Judge. 2008. Mechanisms of disease: molecular genetics of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 5:258-267.
- Azaouagh, A., S. Churzidse, T. Konorza, and R. Erbel. 2011. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: a review and update. *Clin Res Cardiol.* 100:383-394.
- Bass-Zubek, A.E., L.M. Godsel, M. Delmar, and K.J. Green. 2009. Plakophilins: multifunctional scaffolds for adhesion and signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 21:708-716.
- Baumer, Y., D. Drenckhahn, and J. Waschke. 2008. cAMP induced Rac 1-mediated cytoskeletal reorganization in microvascular endothelium. *Histochem Cell Biol.* 129:765-778.

- Baumer, Y., V. Spindler, R.C. Werthmann, M. Bunemann, and J. Waschke. 2009. Role of Rac 1 and cAMP in endothelial barrier stabilization and thrombin-induced barrier breakdown. *J Cell Physiol.* 220:716-726.
- Bektas, M., P.S. Jolly, P. Berkowitz, M. Amagai, and D.S. Rubenstein. 2013. A pathophysiologic role for epidermal growth factor receptor in pemphigus acantholysis. *J Biol Chem.* 288:9447-9456.
- Berkowitz, P., M. Chua, Z. Liu, L.A. Diaz, and D.S. Rubenstein. 2008a. Autoantibodies in the autoimmune disease pemphigus foliaceus induce blistering via p38 mitogen-activated protein kinase-dependent signaling in the skin. *Am J Pathol.* 173:1628-1636.
- Berkowitz, P., L.A. Diaz, R.P. Hall, and D.S. Rubenstein. 2008b. Induction of p38MAPK and HSP27 phosphorylation in pemphigus patient skin. *J Invest Dermatol.* 128:738-740.
- Berkowitz, P., P. Hu, Z. Liu, L.A. Diaz, J.J. Enghild, M.P. Chua, and D.S. Rubenstein. 2005. Desmosome signaling. Inhibition of p38MAPK prevents pemphigus vulgaris IgG-induced cytoskeleton reorganization. *J Biol Chem.* 280:23778-23784.
- Berkowitz, P., P. Hu, S. Warren, Z. Liu, L.A. Diaz, and D.S. Rubenstein. 2006. p38MAPK inhibition prevents disease in pemphigus vulgaris mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:12855-12860.
- Beutner, E.H., and R.E. Jordon. 1964. Demonstration of Skin Antibodies in Sera of Pemphigus Vulgaris Patients by Indirect Immunofluorescent Staining. *Proc Soc Exp Biol Med.* 117:505-510.
- Blanpain, C., and E. Fuchs. 2009. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:207-217.
- Borges, N., F. Shi, I. Azevedo, and K.L. Audus. 1994. Changes in brain microvessel endothelial cell monolayer permeability induced by adrenergic drugs. *Eur J Pharmacol.* 269:243-248.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
- Braga, V.M., and A.S. Yap. 2005. The challenges of abundance: epithelial junctions and small GTPase signalling. *Curr Opin Cell Biol.* 17:466-474.
- Brooke, M.A., D. Nitoiu, and D.P. Kelsell. 2012. Cell-cell connectivity: desmosomes and disease. *J Pathol.* 226:158-171.
- Bystryrn, J.C., and J.L. Rudolph. 2005. Pemphigus. *Lancet.* 366:61-73.
- Caldelari, R., A. de Bruin, D. Baumann, M.M. Suter, C. Bierkamp, V. Balmer, and E. Muller. 2001. A central role for the armadillo protein plakoglobin in the autoimmune disease pemphigus vulgaris. *J Cell Biol.* 153:823-834.
- Calkins, C.C., S.V. Setzer, J.M. Jennings, S. Summers, K. Tsunoda, M. Amagai, and A.P. Kowalczyk. 2006. Desmoglein endocytosis and desmosome disassembly are coordinated responses to pemphigus autoantibodies. *J Biol Chem.* 281:7623-7634.
- Chernyavsky, A.I., J. Arredondo, Y. Kitajima, M. Sato-Nagai, and S.A. Grando. 2007. Desmoglein versus non-desmoglein signaling in pemphigus acantholysis:

- characterization of novel signaling pathways downstream of pemphigus vulgaris antigens. *J Biol Chem.* 282:13804-13812.
- Chu, P.G., and L.M. Weiss. 2002. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology.* 40:403-439.
- Cirillo, N., E. Cozzani, M. Carrozzo, and S.A. Grandi. 2012. Urban legends: pemphigus vulgaris. *Oral Dis.* 18:442-458.
- Cirillo, N., A. Lanza, and S.S. Prime. 2010. Induction of hyper-adhesion attenuates autoimmune-induced keratinocyte cell-cell detachment and processing of adhesion molecules via mechanisms that involve PKC. *Exp Cell Res.* 316:580-592.
- Cowin, P., H.P. Kapprell, W.W. Franke, J. Tamkun, and R.O. Hynes. 1986. Plakoglobin: a protein common to different kinds of intercellular adhering junctions. *Cell.* 46:1063-1073.
- Culton, D.A., Y. Qian, N. Li, D. Rubenstein, V. Aoki, G.H. Filho, E.A. Rivitti, and L.A. Diaz. 2008. Advances in pemphigus and its endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) phenotype: a paradigm of human autoimmunity. *J Autoimmun.* 31:311-324.
- Daniel, B.S., M. Hertl, V.P. Werth, R. Eming, and D.F. Murrell. 2012. Severity score indexes for blistering diseases. *Clin Dermatol.* 30:108-113.
- Dasher, D., D. Rubenstein, and L.A. Diaz. 2008. Pemphigus foliaceus. *Curr Dir Autoimmun.* 10:182-194.
- de Bruin, A., R. Caldelari, L. Williamson, M.M. Suter, T. Hunziker, M. Wyder, and E.J. Muller. 2007. Plakoglobin-dependent disruption of the desmosomal plaque in pemphigus vulgaris. *Exp Dermatol.* 16:468-475.
- de Rooij, J., F.J. Zwartkruis, M.H. Verheijen, R.H. Cool, S.M. Nijman, A. Wittinghofer, and J.L. Bos. 1998. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature.* 396:474-477.
- Dejana, E., E. Tournier-Lasserre, and B.M. Weinstein. 2009. The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Dev Cell.* 16:209-221.
- Delva, E., D.K. Tucker, and A.P. Kowalczyk. 2009. The desmosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1:a002543.
- Denda, M., S. Fuziwara, and K. Inoue. 2003. Beta2-adrenergic receptor antagonist accelerates skin barrier recovery and reduces epidermal hyperplasia induced by barrier disruption. *J Invest Dermatol.* 121:142-148.
- Dmochowski, M., T. Hashimoto, M.A. Chidgey, K.K. Yue, R.W. Wilkinson, T. Nishikawa, and D.R. Garrod. 1995. Demonstration of antibodies to bovine desmocollin isoforms in certain pemphigus sera. *Br J Dermatol.* 133:519-525.
- Drenckhahn, D. 2008. Benninghoff, A: Anatomie 1: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Band 1: Zelle, Gewebe, Entwicklung, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem. Elsevier, Urban & Fischer; 17.Auflage, 2008, S.24-33; S.94-100
- Dusek, R.L., L.M. Godsel, and K.J. Green. 2007. Discriminating roles of desmosomal cadherins: beyond desmosomal adhesion. *J Dermatol Sci.* 45:7-21.

- Eaton, D.P., L.A. Diaz, G. Hans-Filho, V.D. Santos, V. Aoki, H. Friedman, E.A. Rivitti, S.A. Sampaio, M.S. Gottlieb, G.J. Giudice, A. Lopez, and E.W. Cupp. 1998. Comparison of black fly species (Diptera: Simuliidae) on an Amerindian reservation with a high prevalence of fogo selvagem to neighboring disease-free sites in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. The Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. *J Med Entomol.* 35:120-131.
- Enk, A., G. Fierlbeck, L. French, M. Hertl, G. Messer, M. Meurer, K. Steinbrink, G. Stingl, B. Volc-Platzer, and D. Zillikens. 2009. Use of high-dose immunoglobulins in dermatology. *J Dtsch Dermatol Ges.* 7:806-812.
- Epifano, C., and M. Perez-Moreno. 2012. Crossroads of integrins and cadherins in epithelia and stroma remodeling. *Cell Adh Migr.* 6:261-273.
- Evangelista, F., D.A. Dasher, L.A. Diaz, P.S. Prisanh, and N. Li. 2008. E-cadherin is an additional immunological target for pemphigus autoantibodies. *J Invest Dermatol.* 128:1710-1718.
- Fischmeister, R. 2006. Is cAMP good or bad? Depends on where it's made. *Circ Res.* 98:582-584.
- Freissmuth, M., S. Böhm, and S. Offermanns. 2012. Pharmakologie und Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie. Springer; S.390-391; S.478-480;
- Fritsch, P. 2003. Dermatologie Venerologie: Grundlagen. Klinik. Atlas. 2. Auflage:461-471.
- Fukuhara, S., A. Sakurai, H. Sano, A. Yamagishi, S. Somekawa, N. Takakura, Y. Saito, K. Kangawa, and N. Mochizuki. 2005. Cyclic AMP potentiates vascular endothelial cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through an Epac-Rap1 signaling pathway. *Mol Cell Biol.* 25:136-146.
- Galichet, A., L. Borradori, and E.J. Muller. 2014. A new light on an old disease: adhesion signaling in pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol.* 134:8-10.
- Giloh, H., and J.W. Sedat. 1982. Fluorescence microscopy: reduced photobleaching of rhodamine and fluorescein protein conjugates by n-propyl gallate. *Science.* 217:1252-1255.
- Goulding, E.H., J. Ngai, R.H. Kramer, S. Colicos, R. Axel, S.A. Siegelbaum, and A. Chess. 1992. Molecular cloning and single-channel properties of the cyclic nucleotide-gated channel from catfish olfactory neurons. *Neuron.* 8:45-58.
- Grando, S.A. 2000. Autoimmunity to keratinocyte acetylcholine receptors in pemphigus. *Dermatology.* 201:290-295.
- Grando, S.A. 2012. Pemphigus autoimmunity: hypotheses and realities. *Autoimmunity.* 45:7-35.
- Grando, S.A., M.R. Pittelkow, and K.U. Schallreuter. 2006. Adrenergic and cholinergic control in the biology of epidermis: physiological and clinical significance. *J Invest Dermatol.* 126:1948-1965.
- Green, K.J., S. Getsios, S. Troyanovsky, and L.M. Godsel. 2010. Intercellular junction assembly, dynamics, and homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2:a000125.
- Gumbiner, B.M. 2005. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:622-634.

- Hanoune, J., and N. Defer. 2001. Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 41:145-174.
- Hartlieb, E., B. Kempf, M. Partilla, B. Vigh, V. Spindler, and J. Waschke. 2013. Desmoglein 2 is less important than desmoglein 3 for keratinocyte cohesion. *PLoS One.* 8:e53739.
- Hatzfeld, M. 2007. Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion? *Biochim Biophys Acta.* 1773:69-77.
- Hertl, M., D. Zillikens, L. Borradori, L. Bruckner-Tuderman, H. Burckhard, R. Eming, A. Engert, M. Goebeler, S. Hofmann, N. Hunzelmann, F. Karlhofer, O. Kautz, U. Lippert, A. Niedermeier, M. Nitschke, M. Pfütze, M. Reiser, C. Rose, E. Schmidt, I. Shimanovich, M. Sticherling, and S. Wolff-Franke. 2008. Recommendations for the use of rituximab (anti-CD20 antibody) in the treatment of autoimmune bullous skin diseases. *J Dtsch Dermatol Ges.* 6:366-373.
- Heupel, W.M., D. Zillikens, D. Drenckhahn, and J. Waschke. 2008. Pemphigus vulgaris IgG directly inhibit desmoglein 3-mediated transinteraction. *J Immunol.* 181:1825-1834.
- Hofmann, I., C. Mertens, M. Brettel, V. Nimmrich, M. Schnolzer, and H. Herrmann. 2000. Interaction of plakophilins with desmoplakin and intermediate filament proteins: an in vitro analysis. *J Cell Sci.* 113 (Pt 13):2471-2483.
- Ishii, K., M. Amagai, R.P. Hall, T. Hashimoto, A. Takayanagi, S. Gamou, N. Shimizu, and T. Nishikawa. 1997. Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assays with baculovirus-expressed recombinant desmogleins. *J Immunol.* 159:2010-2017.
- Ishii, K., R. Harada, I. Matsuo, Y. Shirakata, K. Hashimoto, and M. Amagai. 2005. In vitro keratinocyte dissociation assay for evaluation of the pathogenicity of anti-desmoglein 3 IgG autoantibodies in pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol.* 124:939-946.
- Jeanes, A., C.J. Gottardi, and A.S. Yap. 2008. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene.* 27:6920-6929.
- Jolly, P.S., P. Berkowitz, M. Bektas, H.E. Lee, M. Chua, L.A. Diaz, and D.S. Rubenstein. 2010. p38MAPK signaling and desmoglein-3 internalization are linked events in pemphigus acantholysis. *J Biol Chem.* 285:8936-8941.
- Kalantari-Dehaghi, M., G.J. Anhalt, M.J. Camilleri, A.I. Chernyavsky, S. Chun, P.L. Felgner, A. Jasinskas, K.M. Leiferman, L. Liang, S. Marchenko, R. Nakajima-Sasaki, M.R. Pittelkow, J.J. Zone, and S.A. Grando. 2013. Pemphigus vulgaris autoantibody profiling by proteomic technique. *PLoS One.* 8:e57587.
- Kasperkiewicz, M., E. Schmidt, and D. Zillikens. 2012. Current therapy of the pemphigus group. *Clin Dermatol.* 30:84-94.
- Kaupp, U.B., T. Niidome, T. Tanabe, S. Terada, W. Bonigk, W. Stuhmer, N.J. Cook, K. Kangawa, H. Matsuo, T. Hirose, and et al. 1989. Primary structure and functional expression from complementary DNA of the rod photoreceptor cyclic GMP-gated channel. *Nature.* 342:762-766.
- Kawasaki, H., G.M. Springett, N. Mochizuki, S. Toki, M. Nakaya, M. Matsuda, D.E. Housman, and A.M. Graybiel. 1998. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science.* 282:2275-2279.

- Kitajima, Y. 2013. New insights into desmosome regulation and pemphigus blistering as a desmosome-remodeling disease. *Kaohsiung J Med Sci.* 29:1-13.
- Kitajima, Y., Y. Aoyama, and M. Seishima. 1999. Transmembrane signaling for adhesive regulation of desmosomes and hemidesmosomes, and for cell-cell attachment induced by pemphigus IgG in cultured keratinocytes: involvement of protein kinase C. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 4:137-144.
- Kneisel, A., and M. Hertl. 2011a. Autoimmune bullous skin diseases. Part 1: Clinical manifestations. *J Dtsch Dermatol Ges.* 9:844-856; quiz 857.
- Kneisel, A., and M. Hertl. 2011b. Autoimmune bullous skin diseases. Part 2: diagnosis and therapy. *J Dtsch Dermatol Ges.* 9:927-947.
- Knudson, R.M., A.N. Kalaaji, and A.J. Bruce. 2010. The management of mucous membrane pemphigoid and pemphigus. *Dermatol Ther.* 23:268-280.
- Koch, P.J., M.G. Mahoney, H. Ishikawa, L. Pulkkinen, J. Uitto, L. Shultz, G.F. Murphy, D. Whitaker-Menezes, and J.R. Stanley. 1997. Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris. *J Cell Biol.* 137:1091-1102.
- Kooistra, M.R., M. Corada, E. Dejana, and J.L. Bos. 2005. Epc1 regulates integrity of endothelial cell junctions through VE-cadherin. *FEBS Lett.* 579:4966-4972.
- Kopperud, R., C. Krakstad, F. Selheim, and S.O. Doskeland. 2003. cAMP effector mechanisms. Novel twists for an 'old' signaling system. *FEBS Lett.* 546:121-126.
- Kowalczyk, A.P., and K.J. Green. 2013. Structure, function, and regulation of desmosomes. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 116:95-118.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Lanza, A., A. De Rosa, F. Femiano, P. Annese, E. Ruocco, F. Gombos, M. Lanza, and N. Cirillo. 2007. Internalization of non-clustered desmoglein 1 without depletion of desmoglein 1 from adhesion complexes in an experimental model of the autoimmune disease pemphigus foliaceus. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 20:355-361.
- Lendahl, U., K.L. Lee, H. Yang, and L. Poellinger. 2009. Generating specificity and diversity in the transcriptional response to hypoxia. *Nat Rev Genet.* 10:821-832.
- Lever, W.F., and K. Hashimoto. 1969. The etiology and treatment of pemphigus and pemphigoid. *J Invest Dermatol.* 53:373-389.
- Li, N., M. Zhao, J. Wang, Z. Liu, and L.A. Diaz. 2009. Involvement of the apoptotic mechanism in pemphigus foliaceus autoimmune injury of the skin. *J Immunol.* 182:711-717.
- Lin, E.H., A.Y. Hui, J.A. Meens, E.A. Tremblay, E. Schaefer, and B.E. Elliott. 2004. Disruption of Ca²⁺-dependent cell-matrix adhesion enhances c-Src kinase activity, but causes dissociation of the c-Src/FAK complex and dephosphorylation of tyrosine-577 of FAK in carcinoma cells. *Exp Cell Res.* 293:1-13.
- Löffler, G.P., P.; Heinrich, P. 2007. Biochemie und Pathobiochemie. *Springer Verlag.* 9.Auflage, 2010; 1000 Seiten

- Loza-Coll, M.A., S. Perera, W. Shi, and J. Filmus. 2005. A transient increase in the activity of Src-family kinases induced by cell detachment delays anoikis of intestinal epithelial cells. *Oncogene*. 24:1727-1737.
- Lüllmann-Rauch, R. Paulsen, F., 2012. Histologie, völlig überarbeitete 4. Auflage, Thieme. 694 S., 703 Abb.; S. 100-119
- Lum, H., H.A. Jaffe, I.T. Schulz, A. Masood, A. RayChaudhury, and R.D. Green. 1999. Expression of PKA inhibitor (PKI) gene abolishes cAMP-mediated protection to endothelial barrier dysfunction. *Am J Physiol*. 277:C580-588.
- Mahoney, M.G., Y. Hu, D. Brennan, H. Bazzi, A.M. Christiano, and J.K. Wahl, 3rd. 2006. Delineation of diversified desmoglein distribution in stratified squamous epithelia: implications in diseases. *Exp Dermatol*. 15:101-109.
- Mahoney, M.G., Z. Wang, K. Rothenberger, P.J. Koch, M. Amagai, and J.R. Stanley. 1999. Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. *J Clin Invest*. 103:461-468.
- Mao, X., A.R. Nagler, S.A. Farber, E.J. Choi, L.H. Jackson, K.M. Leiferman, N. Ishii, T. Hashimoto, M. Amagai, J.J. Zone, and A.S. Payne. 2010. Autoimmunity to desmocollin 3 in pemphigus vulgaris. *Am J Pathol*. 177:2724-2730.
- Marchenko, S., A.I. Chernyavsky, J. Arredondo, V. Gindi, and S.A. Grando. 2010. Antimitochondrial autoantibodies in pemphigus vulgaris: a missing link in disease pathophysiology. *J Biol Chem*. 285:3695-3704.
- Mavropoulos, A., T. Orfanidou, C. Liaskos, D.S. Smyk, V. Spyrou, L.I. Sakkas, E.I. Rigopoulou, and D.P. Bogdanos. 2013. p38 MAPK Signaling in Pemphigus: Implications for Skin Autoimmunity. *Autoimmune Dis*. 2013:728529.
- Meurer, M. 2012. Immunosuppressive therapy for autoimmune bullous diseases. *Clin Dermatol*. 30:78-83.
- Michel, C.C., and F.E. Curry. 1999. Microvascular permeability. *Physiol Rev*. 79:703-761.
- Michel, J.J., and J.D. Scott. 2002. AKAP mediated signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 42:235-257.
- Mutasim, D.F. 2004. Management of autoimmune bullous diseases: pharmacology and therapeutics. *J Am Acad Dermatol*. 51:859-877; quiz 878-880.
- Nakamura, K., T. Tanaka, A. Kuwahara, and K. Takeo. 1985. Microassay for proteins on nitrocellulose filter using protein dye-staining procedure. *Anal Biochem*. 148:311-319.
- Nguyen, V.T., A. Ndoye, L.D. Shultz, M.R. Pittelkow, and S.A. Grando. 2000. Antibodies against keratinocyte antigens other than desmogleins 1 and 3 can induce pemphigus vulgaris-like lesions. *J Clin Invest*. 106:1467-1479.
- Niessen, C.M. 2007. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol*. 127:2525-2532.
- Niessen, C.M., and C.J. Gottardi. 2008. Molecular components of the adherens junction. *Biochim Biophys Acta*. 1778:562-571.
- Noda, K., J. Zhang, S. Fukuhara, S. Kunimoto, M. Yoshimura, and N. Mochizuki. 2010. Vascular endothelial-cadherin stabilizes at cell-cell junctions by anchoring to circumferential actin bundles through alpha- and beta-catenins in cyclic AMP-Epac-Rap1 signal-activated endothelial cells. *Mol Biol Cell*. 21:584-596.

- Nuber, U.A., S. Schafer, A. Schmidt, P.J. Koch, and W.W. Franke. 1995. The widespread human desmocollin Dsc2 and tissue-specific patterns of synthesis of various desmocollin subtypes. *Eur J Cell Biol.* 66:69-74.
- Oktarina, D.A., G. van der Wier, G.F. Diercks, M.F. Jonkman, and H.H. Pas. 2011. IgG-induced clustering of desmogleins 1 and 3 in skin of patients with pemphigus fits with the desmoglein nonassembly depletion hypothesis. *Br J Dermatol.* 165:552-562.
- Pan, M., X. Liu, and J. Zheng. 2011. The pathogenic role of autoantibodies in pemphigus vulgaris. *Clin Exp Dermatol.* 36:703-707.
- Pan, X., R.P. Hobbs, and P.A. Coulombe. 2013. The expanding significance of keratin intermediate filaments in normal and diseased epithelia. *Curr Opin Cell Biol.* 25:47-56.
- Pokutta, S., and W.I. Weis. 2007. Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 23:237-261.
- Potter, R.L., and S.S. Taylor. 1979. Relationships between structural domains and function in the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinases I and II from porcine skeletal muscle. *J Biol Chem.* 254:2413-2418.
- Prenner, B.M. 2008. Role of long-acting beta2-adrenergic agonists in asthma management based on updated asthma guidelines. *Curr Opin Pulm Med.* 14:57-63.
- Pullar, C.E., and R.R. Isseroff. 2005. Cyclic AMP mediates keratinocyte directional migration in an electric field. *J Cell Sci.* 118:2023-2034.
- Pullar, C.E., R.R. Isseroff, and R. Nuccitelli. 2001. Cyclic AMP-dependent protein kinase A plays a role in the directed migration of human keratinocytes in a DC electric field. *Cell Motil Cytoskeleton.* 50:207-217.
- Qi, X.F., D.H. Kim, Y.S. Yoon, J.H. Li, S.B. Song, D. Jin, X.Z. Huang, Y.C. Teng, and K.J. Lee. 2009. The adenylyl cyclase-cAMP system suppresses TARC/CCL17 and MDC/CCL22 production through p38 MAPK and NF-kappaB in HaCaT keratinocytes. *Mol Immunol.* 46:1925-1934.
- Qian, Y., J.S. Jeong, M. Maldonado, J.G. Valenzuela, R. Gomes, C. Teixeira, F. Evangelista, B. Qaqish, V. Aoki, G. Hans, Jr., E.A. Rivitti, D. Eaton, and L.A. Diaz. 2012. Cutting Edge: Brazilian pemphigus foliaceus anti-desmoglein 1 autoantibodies cross-react with sand fly salivary LJM11 antigen. *J Immunol.* 189:1535-1539.
- Rafei, D., R. Muller, N. Ishii, M. Llamazares, T. Hashimoto, M. Hertl, and R. Eming. 2011. IgG autoantibodies against desmocollin 3 in pemphigus sera induce loss of keratinocyte adhesion. *Am J Pathol.* 178:718-723.
- Rashid, R.M., and K.D. Candido. 2008. Pemphigus pain: a review on management. *Clin J Pain.* 24:734-735.
- Rassner, G. 2009. Dermatologie: Lehrbuch und Atlas. 9.Auflage. Urban & Fischer - Elsevier, 528 Seiten, 425 Abb., S.165-180
- Renart, J., J. Reiser, and G.R. Stark. 1979. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76:3116-3120.

- Ruocco, E., R. Wolf, V. Ruocco, G. Brunetti, F. Romano, and A. Lo Schiavo. 2013a. Pemphigus: associations and management guidelines: facts and controversies. *Clin Dermatol.* 31:382-390.
- Ruocco, V., E. Ruocco, A. Lo Schiavo, G. Brunetti, L.P. Guerrero, and R. Wolf. 2013b. Pemphigus: etiology, pathogenesis, and inducing or triggering factors: facts and controversies. *Clin Dermatol.* 31:374-381.
- Saito, M., S.N. Stahley, C.Y. Caughman, X. Mao, D.K. Tucker, A.S. Payne, M. Amagai, and A.P. Kowalczyk. 2012. Signaling dependent and independent mechanisms in pemphigus vulgaris blister formation. *PLoS One.* 7:e50696.
- Santibanez, J.F., D. Olivares, J. Guerrero, and J. Martinez. 2003. Cyclic AMP inhibits TGFbeta1-induced cell-scattering and invasiveness in murine-transformed keratinocytes. *Int J Cancer.* 107:715-720.
- Sardana, K., V.K. Garg, and P. Agarwal. 2013. Is there an emergent need to modify the desmoglein compensation theory in pemphigus on the basis of Dsg ELISA data and alternative pathogenic mechanisms? *Br J Dermatol.* 168:669-674.
- Sayner, S.L., M. Alexeyev, C.W. Dessauer, and T. Stevens. 2006. Soluble adenylyl cyclase reveals the significance of cAMP compartmentation on pulmonary microvascular endothelial cell barrier. *Circ Res.* 98:675-681.
- Schafer, S., P.J. Koch, and W.W. Franke. 1994. Identification of the ubiquitous human desmoglein, Dsg2, and the expression catalogue of the desmoglein subfamily of desmosomal cadherins. *Exp Cell Res.* 211:391-399.
- Schallreuter, K.U., J.M. Wood, M.R. Pittelkow, N.N. Swanson, and V. Steinkraus. 1993. Increased in vitro expression of beta 2-adrenoceptors in differentiating lesional keratinocytes of vitiligo patients. *Arch Dermatol Res.* 285:216-220.
- Schiltz, J.R., and B. Michel. 1976. Production of epidermal acantholysis in normal human skin in vitro by the IgG fraction from pemphigus serum. *J Invest Dermatol.* 67:254-260.
- Schlegel, N., and J. Waschke. 2009a. Impaired cAMP and Rac 1 signaling contribute to TNF-alpha-induced endothelial barrier breakdown in microvascular endothelium. *Microcirculation.* 16:521-533.
- Schlegel, N., and J. Waschke. 2009b. VASP is involved in cAMP-mediated Rac 1 activation in microvascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 296:C453-462.
- Schlegel, N., and J. Waschke. 2013. cAMP with other signaling cues converges on Rac1 to stabilize the endothelial barrier- a signaling pathway compromised in inflammation. *Cell Tissue Res.*
- Schmidt, E., C. Dahnrich, A. Rosemann, C. Probst, L. Komorowski, S. Saschenbrecker, W. Schlumberger, W. Stocker, T. Hashimoto, E.B. Brocker, A. Recke, C. Rose, and D. Zillikens. 2010. Novel ELISA systems for antibodies to desmoglein 1 and 3: correlation of disease activity with serum autoantibody levels in individual pemphigus patients. *Exp Dermatol.* 19:458-463.
- Schmidt, E., and J. Waschke. 2009. Apoptosis in pemphigus. *Autoimmun Rev.* 8:533-537.
- Schmidt, E., and D. Zillikens. 2010. Modern diagnosis of autoimmune blistering skin diseases. *Autoimmun Rev.* 10:84-89.

- Schmidt, M., F.J. Dekker, and H. Maarsingh. 2013. Exchange protein directly activated by cAMP (epac): a multidomain cAMP mediator in the regulation of diverse biological functions. *Pharmacol Rev.* 65:670-709.
- Scott, T.L., P.A. Christian, M.V. Kesler, K.M. Donohue, B. Shelton, K. Wakamatsu, S. Ito, and J. D'Orazio. 2012. Pigment-independent cAMP-mediated epidermal thickening protects against cutaneous UV injury by keratinocyte proliferation. *Exp Dermatol.* 21:771-777.
- Seishima, M., Y. Iwasaki-Bessho, Y. Itoh, Y. Nozawa, M. Amagai, and Y. Kitajima. 1999. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C, but not phospholipase D, is involved in pemphigus IgG-induced signal transduction. *Arch Dermatol Res.* 291:606-613.
- Shapiro, L., and W.I. Weis. 2009. Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1:a003053.
- Shimanovich, I., M. Nitschke, C. Rose, J. Grabbe, and D. Zillikens. 2008. Treatment of severe pemphigus with protein A immunoabsorption, rituximab and intravenous immunoglobulins. *Br J Dermatol.* 158:382-388.
- Shu, E., Y. Yamamoto, Y. Aoyama, and Y. Kitajima. 2007. Intraperitoneal injection of pemphigus vulgaris-IgG into mouse depletes epidermal keratinocytes of desmoglein 3 associated with generation of acantholysis. *Arch Dermatol Res.* 299:165-167.
- Sonnenberg, A., and R.K. Liem. 2007. Plakins in development and disease. *Exp Cell Res.* 313:2189-2203.
- Spindler, V., C. Dehner, S. Hubner, and J. Waschke. 2014. Plakoglobin but not Desmoplakin Regulates Keratinocyte Cohesion via Modulation of p38MAPK Signaling. *J Invest Dermatol.*
- Spindler, V., D. Drenckhahn, D. Zillikens, and J. Waschke. 2007. Pemphigus IgG causes skin splitting in the presence of both desmoglein 1 and desmoglein 3. *Am J Pathol.* 171:906-916.
- Spindler, V., A. Endlich, E. Hartlieb, F. Vielmuth, E. Schmidt, and J. Waschke. 2011a. The extent of desmoglein 3 depletion in pemphigus vulgaris is dependent on Ca(2+)-induced differentiation: a role in suprabasal epidermal skin splitting? *Am J Pathol.* 179:1905-1916.
- Spindler, V., W.M. Heupel, A. Efthymiadis, E. Schmidt, R. Eming, C. Rankl, P. Hinterdorfer, T. Muller, D. Drenckhahn, and J. Waschke. 2009. Desmocollin 3-mediated binding is crucial for keratinocyte cohesion and is impaired in pemphigus. *J Biol Chem.* 284:30556-30564.
- Spindler, V., D. Peter, G.S. Harms, E. Asan, and J. Waschke. 2011b. Ultrastructural analysis reveals cAMP-dependent enhancement of microvascular endothelial barrier functions via Rac1-mediated reorganization of intercellular junctions. *Am J Pathol.* 178:2424-2436.
- Spindler, V., V. Roetzer, C. Dehner, B. Kempf, M. Gliem, M. Radeva, E. Hartlieb, G.S. Harms, E. Schmidt, and J. Waschke. 2013. Peptide-mediated desmoglein 3 crosslinking prevents pemphigus vulgaris autoantibody-induced skin blistering. *J Clin Invest.* 123:800-811.

- Spindler, V., and J. Waschke. 2014. Desmosomal cadherins and signaling: lessons from autoimmune disease. *Cell Commun Adhes.* 21:77-84.
- Stanley, J.R., and M. Amagai. 2006. Pemphigus, bullous impetigo, and the staphylococcal scalded-skin syndrome. *N Engl J Med.* 355:1800-1810.
- Stenn, K.S., R. Link, G. Moellmann, J. Madri, and E. Kuklinska. 1989. Dispase, a neutral protease from *Bacillus polymyxa*, is a powerful fibronectinase and type IV collagenase. *J Invest Dermatol.* 93:287-290.
- Sutherland, E.W. 1972. Studies on the mechanism of hormone action. *Science.* 177:401-408.
- Sutherland, E.W., and T.W. Rall. 1957. The properties of an adenine ribonucleotide produced with cellular particles, ATP, Mg⁺⁺, and epinephrine or glucagon. *Journal of the American Chemical Society.* 79:3608-3608.
- Takahashi, H., M. Honma, Y. Miyauchi, S. Nakamura, A. Ishida-Yamamoto, and H. Iizuka. 2004. Cyclic AMP differentially regulates cell proliferation of normal human keratinocytes through ERK activation depending on the expression pattern of B-Raf. *Arch Dermatol Res.* 296:74-82.
- Takahashi, Y., H.P. Patel, R.S. Labib, L.A. Diaz, and G.J. Anhalt. 1985. Experimentally induced pemphigus vulgaris in neonatal BALB/c mice: a time-course study of clinical, immunologic, ultrastructural, and cytochemical changes. *J Invest Dermatol.* 84:41-46.
- Taylor, S.S., J.A. Buechler, and W. Yonemoto. 1990. cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem.* 59:971-1005.
- Teramoto, H.G., J.S. 2013. Mitogen-Activated Protein Kinase Family. *Encyclopedia of Biological Chemistry.* Second Edition:176-180.
- Thomason, H.A., A. Scothorn, S. McHarg, and D.R. Garrod. 2010. Desmosomes: adhesive strength and signalling in health and disease. *Biochem J.* 429:419-433.
- Tsunoda, K., T. Ota, M. Aoki, T. Yamada, T. Nagai, T. Nakagawa, S. Koyasu, T. Nishikawa, and M. Amagai. 2003. Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. *J Immunol.* 170:2170-2178.
- Tucker, D.K., S.N. Stahley, and A.P. Kowalczyk. 2013. Plakophilin-1 Protects Keratinocytes from Pemphigus Vulgaris IgG by Forming Calcium-Independent Desmosomes. *J Invest Dermatol.*
- van der Wier, G., M.F. Jonkman, H.H. Pas, and G.F. Diercks. 2012. Ultrastructure of acantholysis in pemphigus foliaceus re-examined from the current perspective. *Br J Dermatol.* 167:1265-1271.
- Vu, T.N., T.X. Lee, A. Ndoye, L.D. Shultz, M.R. Pittelkow, M.V. Dahl, P.J. Lynch, and S.A. Grando. 1998. The pathophysiological significance of nondesmoglein targets of pemphigus autoimmunity. Development of antibodies against keratinocyte cholinergic receptors in patients with pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *Arch Dermatol.* 134:971-980.
- Wang, G.L., B.H. Jiang, E.A. Rue, and G.L. Semenza. 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:5510-5514.

- Waschke, J. 2008. The desmosome and pemphigus. *Histochem Cell Biol.* 130:21-54.
- Waschke, J., P. Bruggeman, W. Baumgartner, D. Zillikens, and D. Drenckhahn. 2005. Pemphigus foliaceus IgG causes dissociation of desmoglein 1-containing junctions without blocking desmoglein 1 transinteraction. *J Clin Invest.* 115:3157-3165.
- Waschke, J., V. Spindler, P. Bruggeman, D. Zillikens, G. Schmidt, and D. Drenckhahn. 2006. Inhibition of Rho A activity causes pemphigus skin blistering. *J Cell Biol.* 175:721-727.
- Wegener, J., S. Zink, P. Rosen, and H. Galla. 1999. Use of electrochemical impedance measurements to monitor beta-adrenergic stimulation of bovine aortic endothelial cells. *Pflugers Arch.* 437:925-934.
- Whitehead, T.P., L.J. Kricka, T.J. Carter, and G.H. Thorpe. 1979. Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. *Clin Chem.* 25:1531-1546.
- Whittock, N.V., and C. Bower. 2003. Targetting of desmoglein 1 in inherited and acquired skin diseases. *Clin Exp Dermatol.* 28:410-415.
- Williamson, L., N.A. Raess, R. Caldelari, A. Zakher, A. de Bruin, H. Posthaus, R. Bolli, T. Hunziker, M.M. Suter, and E.J. Muller. 2006. Pemphigus vulgaris identifies plakoglobin as key suppressor of c-Myc in the skin. *EMBO J.* 25:3298-3309.
- Wu, H., Z.H. Wang, A. Yan, S. Lyle, S. Fakharzadeh, J.K. Wahl, M.J. Wheelock, H. Ishikawa, J. Uitto, M. Amagai, and J.R. Stanley. 2000. Protection against pemphigus foliaceus by desmoglein 3 in neonates. *N Engl J Med.* 343:31-35.
- Yamamoto, Y., Y. Aoyama, E. Shu, K. Tsunoda, M. Amagai, and Y. Kitajima. 2007. Anti-desmoglein 3 (Dsg3) monoclonal antibodies deplete desmosomes of Dsg3 and differ in their Dsg3-depleting activities related to pathogenicity. *J Biol Chem.* 282:17866-17876.
- Yin, T., and K.J. Green. 2004. Regulation of desmosome assembly and adhesion. *Semin Cell Dev Biol.* 15:665-677.
- Zillikens, D., K. Derfler, R. Eming, G. Fierlbeck, M. Goebeler, M. Hertl, S.C. Hofmann, F. Karlhofer, O. Kautz, M. Nitschke, A. Opitz, S. Quist, C. Rose, S. Schanz, E. Schmidt, I. Shimanovich, M. Michael, and F. Ziller. 2007. Recommendations for the use of immunopheresis in the treatment of autoimmune bullous diseases. *J Dtsch Dermatol Ges.* 5:881-887.

7. ANHANG

7.1. Abkürzungsverzeichnis

Verwendete Abkürzung	Bedeutung
&	und
µm	Mikrometer
µmol/l	Mikromol pro Liter
Abb.	Abbildung
AK23	Monoklonaler Antikörper aus einem Pemphigus vulgaris Mausmodell
AKAP	A-Kinase anchor protein
ÄMP	Äußerer Membranplaque
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ARVC	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cm ²	Quadratzentimeter
CNG-Kationenkanäle	Cyclic nucleotide gated-Kationenkanäle
CREB	cAMP response element binding protein
C-Untereinheit	Katalytische Untereinheit
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DP	Desmoplakin
Dsc 1	Desmocollin 1
Dsc 2	Desmocollin 2
Dsc 3	Desmocollin 3
Dsg1	Desmoglein 1
Dsg2	Desmoglein 2
Dsg3	Desmoglein 3
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Epac	Exchange protein activated by cAMP

ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
F/R	Forskolin/Rolipram
F-Aktin	Filamentäres Aktin
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
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
HSP27	Heat shock protein 27
IF	Intermediärfilament
IgG	Immunglobulin G Fraktion
IMP	Innerer Membranplaque
IP₃	Inositol - 1,4,5 – triphosphat
Iso	Isoproterenol
mol/l	Mol pro Liter
mA	Milliampere
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MP	Mesophragma
mV	Millivolt
MW	Mediumswechsel
NGS	Normales Ziegenserum ("normal goat serum")
nm	Nanometer
PA	Plasminogenaktivator
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. „phosphate buffered saline“)
PF	Pemphigus foliaceus
PG	Plakoglobin
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKP	Plakophilin
PLC	Phospholipase C
PM	Plasmamembran
PPL	Prestained Protein Ladder

PV	Pemphigus vulgaris
PF-IgG	aufgereinigte Immunglobulin G Fraktion von Seren von Pemphigus foliaceus Patienten
PV-IgG	aufgereinigte Immunglobulin G Fraktion von Seren von Pemphigus vulgaris Patienten
R-Untereinheit	Regulatorische Untereinheit
s	Sekunde
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Src	Zytosolische Tyrosinkinase
Tbl.	Tablette
TEMED	Tetramethylethyldiamin
v/v	Volume per Volume
w/v	Weight per Volume
xG	Vielfaches der Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel

7.2. Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Jens Waschke für die Überlassung des Themas bedanken. Er hat zusammen mit meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Volker Spindler mein Interesse an diesem Forschungsgebiet geweckt. Ohne Ihre fortwährende Motivation und ihre Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Arbeit, wäre diese nicht möglich gewesen.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern der Anatomie, vor allem bei Lisa Berberich, Nadja Niedermeier und Veronika Heimbach, die mir bereitwillig und geduldig die Methodik beigebracht haben und immer ein offenes Ohr sowie zumeist eine Lösung für die alltäglichen Laborprobleme hatten. Dank gilt auch den anderen Doktoranden darunter Alexander Endlich, Rhea Leweke, Dominik Peter, Bettina Kempf und Martin Gliem, die mir häufig mit Rat und Tat zur Seite standen. Ich werde die Unterstützung und die schöne Zeit mit Euch nicht vergessen.

Schließlich möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie bedanken, die mir während der Zeit des Studiums und dieser Promotion immer den Rücken gestärkt haben; die da waren, wenn ich verunsichert oder enttäuscht über nicht ausbleibende Misserfolge im Labor war und mich immer ermutigt haben meinen Weg motiviert fortzusetzen; die mich vor Prüfungen geduldig Stunde um Stunde den Stoff abgefragt haben, weil ich so am besten Lernen konnte und sich selbstlos für mich eingesetzt haben.

7.3. Lebenslauf

Franziska Vielmuth, geb. 01.01.1988, in Sonneberg/Thür.

Staatangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

- | | |
|-----------|---|
| 1994-1998 | Besuch der Grundschule Steinach, Thüringen |
| 1998-2006 | Besuch des Staatlichen Gymnasiums Sonneberg (Abschluss Abitur 2006) |

Studium:

- | | |
|----------------|---|
| 2006-2012 | Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians Universität Würzburg (Abschluss Staatsexamen Medizin) |
| - 2008: | 1. Staatsexamen abgelegt |
| - 2008-2010: | Famulaturen in den Fachgebieten:
Anästhesiologie/Intensivmedizin
Gynäkologie/Geburtshilfe
Innere Medizin |
| - 08/11-12/11: | Praktisches Jahr Chirurgie
Universitätsklinikum Würzburg |
| - 12/11-03/12: | Praktisches Jahr Innere Medizin
Universitätsklinikum Würzburg |
| - 03/12-07/12: | Praktisches Jahr Gynäkologie
Universitätsklinikum Würzburg |
| - 11/12: | 2. Staatsexamen abgelegt |
| - 11/12: | Approbation (Humanmedizin) |

Beruflicher Werdegang:

Seit 11/12 Wissenschaftliche Mitarbeiterin Anatomische Anstalt der
Ludwig-Maximilians-Universität München; Lehrstuhl
Anatomie 1 – vegetative Anatomie

Kongressteilnahmen:

09/09 Teilnahme Herbsttagung der Anatomischen Gesellschaft in
Würzburg

03/10 Teilnahme und Poster („Increased cAMP protects against
pemphigus-IgG-mediated loss of keratinocyte cohesion“)
Jahrestagung der Anatomischen Gesellschaft Hamburg

09/10 Teilnahme und Vortrag („Protective endogenous cAMP
signaling triggered by pemphigus autoantibodies“)
Herbsttagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg

09/13 Teilnahme und Vortrag („Functional imaging of desmoglein
molecules on human keratinocytes using atomic force
microscopy“) Herbsttagung der Anatomischen Gesellschaft
in Würzburg

Publikationen:

2010 Protective endogenous cyclic adenosine 5'-monophosphate
signaling triggered by pemphigus autoantibodies.

Spindler V*, **Vielmuth** F*, Schmidt E, Rubenstein DS,
Waschke J. (*=geteilte Erstautorenschaft)

J Immunol. 2010 Dec 1;185(11):6831-8. Epub 2010 Oct 29.

2011 The extent of desmoglein 3 depletion in pemphigus
vulgaris is dependent on Ca²⁺- induced differentiation: a
role in suprabasal epidermal skin splitting?

Spindler V, Endlich A, Hartlieb E, **Vielmuth** F, Schmidt E,
Waschke J.

Am J Pathol. 2011 Oct;179(4):1905-16. Epub 2011 Aug 22.

Sonstiges:

- seit 2007 Stipendiatin der Studienstiftung des Deutschen Volkes
- 2008-2011 Aktive Mitarbeit in der Fachschaft Medizin der Universität Würzburg, 2009-2011 als gewählte Studierendenvertretung