

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Universität Würzburg
Lehrstuhl für Anatomie II
Vorstand: Prof. Dr. med. D. Drenckhahn

zum Thema

Bedeutung der Rho-GTPasen für desmosomale Adhäsion
und Pemphigus-Pathogenese

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Volker Bernd Spindler
aus Würzburg

Würzburg, Oktober 2008

Referent: Prof. Dr. med. Detlev Drenckhahn
Koreferent: Prof. Dr. med. Eva-Bettina Bröcker
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 18.09.2009

Der Promovend ist Arzt

für

Dani

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Epidermis	1
1.2	Interzellularkontakte	1
1.3	Desmosom	2
1.4	Desmocadherine	4
1.5	Pemphigus	7
1.5.1	Pathogenese des Pemphigus	10
1.6	Rho (Ras homologe)-GTPasen	14
1.6.1	Aufbau und Funktionsprinzip	14
1.6.2	Regulation	15
1.6.2.1	GEFs	15
1.6.2.2	GAPs	16
1.6.2.3	GDIs	16
1.6.3	Funktionen der Rho-GTPasen	17
1.7	Fragestellung	18
2	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1	Zellkultur	20
2.2	Bakterielle Toxine	21
2.3	Antikörper und Testreagenzien	23
2.3.1	Primärantikörper	23
2.3.2	Sekundärantikörper	24
2.3.3	Testreagenzien	24
2.4	Desmoglein-Fc-Proteinaufreinigung	24
2.5	Aufreinigung der Patienten- und Kontroll-Antikörper	25
2.6	Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie	26
2.7	Proteinkonzentrationsbestimmung	27
2.7.1	Bradford-Methode	27
2.7.2	Amidoschwarz-Methode	27
2.8	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	28
2.9	Westernblotting und Immundetektion von Proteinen	29

2.10	Messung der Aktivität von Rho-GTPasen mit Pulldown-Versuch	30
2.11	Proteinextraktion	31
2.12	Laserpinzette	32
2.12.1	Beschichtung der Protein-A-Mikroperlen mit den Dsg-Fc-Konstrukten	32
2.12.2	Prinzip der Laserpinzettentechnik	33
2.12.3	Durchführung der Versuche mit der Laserpinzette	34
2.13	ex vivo-Hautmodell	34
2.14	Auswertung des Bild- und Datenmaterials	37
3	ERGEBNISSE	38
3.1	Bedeutung der Rho-GTPasen für die Integrität der Epidermis	38
3.2	Einfluss der Rho-GTPasen auf die Zelladhäsion in kultivierten Keratinozyten	40
3.3	Rolle der Rho-GTPasen in der Regulation der durch Desmogleine vermittelten Adhäsion	43
3.4	Wirkung von Pemphigus-IgG auf humane Epidermis ex vivo	44
3.5	Effekte der Aktivierung von Rho-GTPasen auf die durch Pemphigus- IgG vermittelte Akantholyse in humaner Epidermis ex vivo	49
3.6	Einfluss einer Aktivierung von Rho-GTPasen auf die durch Pemphigus-IgG vermittelte Zelldissoziation in kultivierten Keratinozyten	52
3.7	Wirkung von Pemphigus-IgG auf die durch Desmogleine vermittelte Adhäsion in kultivierten Keratinozyten	55
3.8	Einfluss von Pemphigus-IgG auf die Aktivität von Rho A	57
3.9	Bedeutung von p38MAPK für die durch Pemphigus-IgG vermittelte Inaktivierung von Rho A	59
3.10	Mechanismen der Rho A-vermittelten Regulation der desmosomalen Adhäsion bei Pemphigus	60
4	DISKUSSION	63
4.1	Rho-GTPasen sind an der Regulation der desmosomal vermittelten Haftung beteiligt	63
4.1.1	Rho-GTPasen beeinflussen die zelluläre Adhäsion und die Lokalisation von Desmogleinen	63

4.1.2	Rho GTPasen modulieren die Desmoglein-vermittelte Haftung	64
4.2	Rho A ist an der Pemphigus-Pathogenese beteiligt	66
4.2.1	Pemphigus-IgG vermindern die Aktivität von Rho A	66
4.2.2	Die Desmoglein-Kompensationstheorie erklärt die Pemphigus-Pathogenese nicht vollständig	68
4.2.3	Die Entstehung von Hautblasen kann als ein mehrstufiger Prozess verstanden werden	70
4.3	Ausblick	73
5	ZUSAMMENFASSUNG	75
6	LITERATUR	77
7	ANHANG	88
7.1	Abkürzungsverzeichnis	88
7.2	Danksagungen	91
7.3	Lebenslauf	92

1 Einleitung

1.1 Epidermis

Als Epidermis bezeichnet man die oberhalb der Dermis gelegene äußerste Schicht der Hautdecke mit einer Dicke von ca. 0,05-0,1 mm (Drenckhahn, 2008). Die Keratinozyten sind die Hauptbestandteile der Epidermis und wandern im Laufe ihres Lebenszyklus von der tiefsten Epidermisschicht nach außen, bis sie schließlich durch mechanische Beanspruchung abgelöst werden. Die Epidermis lässt sich in vier Schichten einteilen (siehe auch Abb. 2). Das Stratum basale besteht aus einer einzelnen Lage an Zellen, die alle der Basalmembran aufsitzen. Diese Schicht ist Sitz der dermalen Stammzellen und Ausgangspunkt für Regeneration und Erneuerung der Epidermis. Oberhalb des Stratum basale liegt das Stratum spinosum, gefolgt von einem nur wenige Zellschichten dicken Stratum granulosum. In dieser Schicht beginnt der Verhornungsprozess. Die äußersten Zellreihen bestehen nur noch aus toten, zellkern- und organellenlosen Hornzellen und werden Stratum corneum genannt. Die Epidermis besitzt zusammen mit Dermis und Unterhaut lebenswichtige Funktionen. So muss sie einen mechanischen Schutz vor schädigenden Einwirkungen vielfältigster Art von außen bieten und dabei einen Wasserverlust nach außen verhindern. Trotzdem ermöglicht sie unter bestimmten Voraussetzungen einen Stofftransport nach innen, was beispielsweise für die topische Applikation von Medikamenten relevant ist. Weiterhin reguliert sie den Wärmehaushalt des Körpers und ist Sitz von Rezeptoren, die Schmerz-, Temperatur- und Empfindungsreize vermitteln.

1.2 Interzellularkontakte

In einem Zellverbund sind die Kontakte zwischen den Zellen von elementarer Bedeutung für Stabilität, Integrität und die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion. Die Interzellularkontakte lassen sich einteilen in Adhäsionskontakte mit überwiegend mechanischer Funktion wie Adhärenskontakte und Desmosomen, solchen mit metabolischer und elektrisch koppelnder Funktion wie die Nexus und schließlich solchen, die die Abdichtung

des Interzellularraumes zur Aufgabe haben, wie die Zonulae occludentes (Drenckhahn, 2008). Die Ausstattung der Zellen mit den jeweiligen Interzellularkontakten ist abhängig von den Aufgaben des entsprechenden Zellverbundes. In der Epidermis herrschen daher die vor allem mechanischen Zusammenhalt vermittelnden Desmosomen zusammen mit den Adhärenskontakten vor. Im Stratum granulosum lassen sich zusätzlich Zonulae occludentes nachweisen, die der Abdichtung des Epithels nach außen dienen. Desweiteren besitzt die Basalzellschicht Hemidesmosomen, die die Haftung der Zellen an die Basallamina vermitteln.

Adhärenskontakte lassen sich in Adhärenspunkte (*Punctum adherens*), -gürtel (*Zonula adherens*) und -platten (*Fascia adherens*) unterteilen. Die im Interzellularspalt die Haftung vermittelnden Proteine sind die klassischen Cadherine. Deren Verteilung ist abhängig vom jeweiligen Zelltyp. So finden sich N-Cadherine vorwiegend in Neuronen und Muskelzellen, VE-Cadherin wird nur im Endothel exprimiert und E-Cadherin dominiert in Epithelien. Die Cadherine sind über Proteine der Cateninfamilie (α -, β -, γ -, δ -Catenin) mit dem Aktinzytoskelett verbunden. Neben ihrer Rolle bei der zellulären Adhäsion agieren Adhärensjunktionen auch als Rezeptoren, die Signale aus dem Umfeld der Zelle durch Beeinflussung verschiedener Signalkaskaden nach innen weiterleiten. Insbesondere β -Catenin und das meist als Plakoglobin bezeichnete γ -Catenin können auch in den Zellkern translozieren und dort als Transkriptionsregulator wirken. So sind Adhärensjunktionen wichtige Regulatoren von Proliferation, Überleben, Migration und Morphogenese von Zellen und Geweben (Erez et al., 2005).

1.3 Desmosom

Der Begriff Desmosom entstammt einer Kombination der griechischen Wörter „desmos“ (Bindung) und „soma“ (Körper). Der Name wurde erstmals 1920 von Josef Schaffer in seinem Histologiebuch eingeführt, wobei die Struktur an sich schon seit dem 19. Jahrhundert bekannt ist (Waschke, 2008). Desmosomen sind fleckförmige Haftkontakte mit einer Größe von durchschnittlich 0,1-0,5 μm . Sie vermitteln extrazellulär die Haftung an benachbarte Zellen und sind intrazellulär mit dem Intermediärfilamentgerüst der Zelle verbunden. Sie werden

in großer Zahl in Bereichen mit starker mechanischer Belastung wie der Epidermis, dem mehrschichtig unverhornten Plattenepithel von Mundhöhle, Speiseröhre und Vagina sowie dem Myokard gefunden, aber auch zwischen Neurothelzellen der harten Hirnhaut und follikulär dentritischen Zellen des Lymphknotens (Drenckhahn, 2008). Elektronenmikroskopisch lassen sich folgende Strukturelemente darstellen: Ein interzellulärer Anteil, die Desmoglea, mit einer elektronendichten Linie in der Mitte des Interzellularspalt (Mesophragma) sowie eine intrazelluläre plasmamembran-nahe Verdichtung, die desmosomale Plaque (Abb. 1).

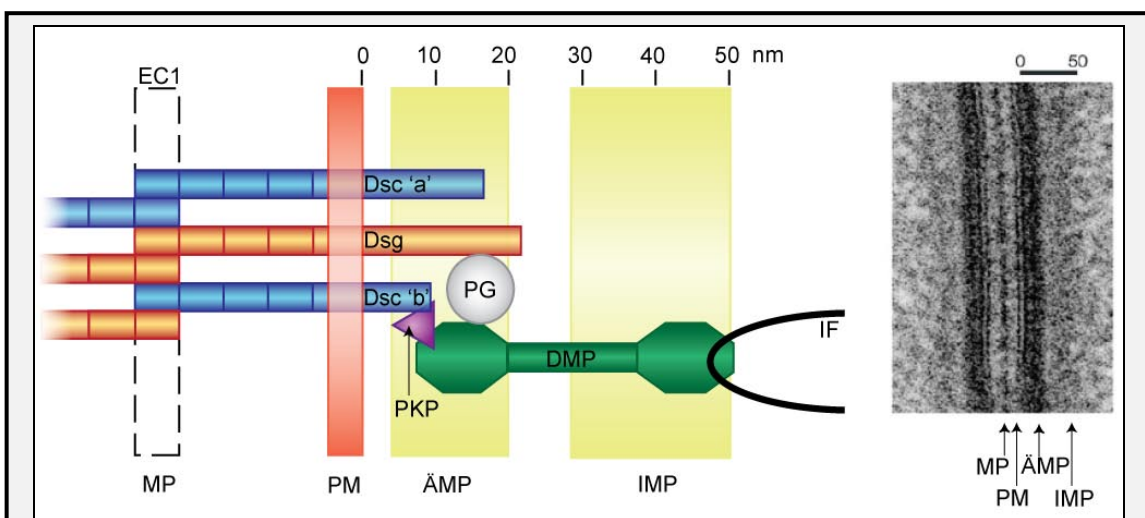


Abb 1: Schema eines Desmosoms

Links das Schema einer Desmosomenhälfte, rechts eine korrespondierende elektronenmikroskopische Aufnahme. Dsg und Dsc durchspannen die Plasmamembran (PM). Mit der N-terminal gelegenen EC-1 Domäne interagieren sie mit gegenüber liegenden Desmocadherinen und bilden das elektronenoptisch sichtbare Mesophragma (MP). C-terminal binden Dsg und Dsc ,a' über Plakoglobin (PG) an Desmoplakin (DMP) im Bereich der äußeren Membranplaque (ÄMP). Dsc ,b' ist in der Lage, mit Plakophilinen (PKP) zu assoziieren. In die innere Membranplaque (IMP) strahlen Intermediärfilamente (IF) ein und binden dort an Desmoplakin. Modifiziert nach Getsios et al. 2004.

Diese lässt sich unterteilen in eine äußere und innere Membranplaque. Im Interzellularspalt befinden sich die Desmocadherine Desmoglein (Dsg) 1-4 und Desmocollin (Dsc) 1-3. Diese durchspannen die Plasmamembran und strahlen mit ihrem Carboxy-terminalen Ende in die äußere Membranplaque ein. Hier binden sie an Plakoglobin, einem Protein der Armadillo-Familie, das auch in Adhärensjunktionen zu finden ist (siehe auch 1.2). Die ebenfalls aus der

Armadillo-Familie stammenden Plakophiline (1-3) zeigen ein gewebespezifisches Verteilungsmuster und interagieren mit verschiedenen desmosomalen Proteinen wie Dsgs und Dscs, Plakoglobin, Desmoplakin sowie Intermediärfilamenten. Es scheint möglich zu sein, dass Plakophilin 1 bei Plakoglobin-Defizienz die fehlende Verknüpfungsfunktion kompensiert (Ruiz et al., 1996). Das aus der Plakinfamilie stammende Desmoplakin durchzieht sowohl die äußere wie auch die innere Membranplaque und bindet in ersterer an Plakoglobin und in letzterer an in Bündeln einstrahlende Intermediärfilamente. Diesen Elementen des Zytoskeletts wird eine vorwiegend passive Stützfunktion zugeschrieben, zusammen mit einer Mitwirkung bei der Positionierung von Zellkompartimenten wie dem Nukleus, den Mitochondrien und dem Golgi-Komplex (Godsel et al., 2008). Im Epithel sind die Intermediärfilamente aus Zytokeratinen aufgebaut. In basalen Zellen der Epidermis dominieren die Zytokeratine 5 und 14, während in oberen Schichten vor allem Zytokeratin 1 und 10 exprimiert werden (Uitto et al., 2007). Relativ wenig bekannt ist über das kürzlich entdeckte Perp, ein Protein, das in komplexen Epithelien in den Desmosomen lokalisiert ist (Ihrle et al., 2005). Interessant hierbei ist jedoch die Tatsache, dass neugeborene Perp-defiziente Mäuse Blasenbildung in der Epidermis entwickeln und rasch versterben (Marques et al., 2006).

Desmosomen wurden lange Zeit vornehmlich als Strukturen angesehen, die extrazellulär das Anhaften an die Nachbarzelle vermitteln sowie intrazellulär der Verankerung des Intermediärfilamentsystems an der Plasmamembran dienen. In den letzten Jahren häufen sich Erkenntnisse, dass Desmosomen bzw. deren Strukturproteine auch wichtige Aufgaben bei Entwicklung und Differenzierung der Epidermis übernehmen (Rickman et al., 1999; Zhurinsky et al., 2000; Caldelari et al., 2001; Getsios et al., 2004a; Yin et al., 2005).

1.4 *Desmocadherine*

Cadherine sind Calcium-bindende Proteine, die unter Anwesenheit dieses Ions untereinander Bindungen eingehen können (Volberg et al., 1986). Die desmosomalen Vertreter der Cadherin-Familie sind die Desmocadherine genannten Dsg 1-4 und Dsc 1-3. Diese sind, wie auch die klassischen

Cadherine, integrale Membranglykoproteine vom Typ 1. Dsg wie Dsc bestehen aus vier hoch konservierten extrazellulären Domänen (EC1-4), einem variableren extrazellulären Anker (auch EC5 genannt), einer Transmembran-Domäne, einem intrazellulärem Anker sowie verschiedenen intrazellulären Unterdomänen am C-terminalen Ende (Dusek et al., 2007). Die extrazellulären Domänen der Desmocadherine besitzen untereinander und mit den klassischen Cadherinen eine Sequenzhomologie von etwa 30%. (Garrod et al., 2002). Für die klassischen Cadherine gilt, dass die Domänen EC1-4 durch flexible Verbindungsstücke miteinander verknüpft sind. Für E-Cadherin wurde postuliert, dass durch Bindung von jeweils bis zu drei Ca^{2+} -Ionen diese Verknüpfungen stabilisiert werden (Nagar et al., 1996). Dadurch bildet sich eine stabförmige Konformation, die eine Cis-Interaktion mit einem Nachbar-Cadherin zu einem Dimer ermöglicht. Erst dann ist eine Trans-Bindung an ein Cadherin-Dimer einer gegenüberliegenden Zelle möglich (Pertz et al., 1999). Dieses Modell des Reißverschlussartigen Aufbaus gilt wohl leicht eingeschränkt ebenfalls für die desmosomalen Cadherine (Al-Amoudi et al., 2007). Für eine Bindung beispielsweise zwischen zwei Dsg 1-Dimeren sind extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen von mindestens 0,8 mM nötig (Waschke et al., 2007).

Dsc existieren in zwei Isoformen a und b, wobei letztere durch das Fehlen der ICS (intracytoplasmatische Cadherinsequenz) nicht in der Lage ist, an Plakoglobin zu binden. Die durch alternatives Spleißen entstandene b-Form ist stattdessen mit Plakophilin 3 assoziiert (Bonne et al., 2003).

Die N-terminal gelegene EC1 ist wohl der wichtigste Bereich für die Bindung an andere Desmocadherine. Dort befindet sich die CAR (Zelladhäsions-erkennungsstelle) genannte recht kurze Aminosäuresequenz, über die die Bindung an ein gegenüberliegendes Desmocadherin vermittelt wird (Blaschuk et al., 1990). So sind Peptide, die spezifisch an die CAR von Dsg 1 und Dsc 1 binden, in der Lage, desmosomale Haftung *in vitro* zu blockieren (Tselepis et al., 1998). Die Bedeutung der EC1 für die Zelladhäsion wird auch deutlich, da AK23, ein monoklonaler, gegen die EC1 von Dsg 3 gerichteter Antikörper, zur Bildung von Hautblasen mit Verlust der desmosomalen Haftung in neonatalen Mäusen und zur direkten Hemmung der Dsg 3-Transinteraktion führt (Tsunoda et al., 2003; Heupel et al., 2008).

Im Gegensatz zu klassischen Cadherinen, denen überwiegend eine homophile Interaktion zugeschrieben wird, können Desmocadherine sowohl homophil als auch heterophil binden. Homophile Bindung bedeutet, dass ein Desmocadherin an ein anderes gleichen Typs bindet (beispielsweise Dsg 3 an Dsg 3), während bei heterophiler Bindung zwei Desmocadherine unterschiedlichen Typs miteinander interagieren. Homophile Dsg 3-Interaktion wurde in Mausfibroblasten gezeigt, in denen exprimiertes Dsg 3 zu Aggregation führte (Amagai et al., 1994b). Auch eine homophile Dsc 2-Bindung konnte mittels EC1-2-Fragmenten *in vitro* gezeigt werden (Syed et al., 2002). Eine heterophile Dsg 2/Dsc 2-Interaktion wurde in der gleichen Publikation dargelegt. Co-Immunopräzipitationsexperimente zeigten weiterhin eine Bindung zwischen Dsc 1 und Dsg 2 (Chitaeu und Troyanovsky, 1997).

Die Verteilung der verschiedenen Desmocadherine in Haut und Schleimhaut ist unterschiedlich. In der oralen Mukosa sind Dsg 1, Dsg 2 und Dsg 3 recht homogen über alle Schichten verteilt, während Dsg 4 im Stratum basale fehlt. (Mahoney et al., 2006). Dsc 1 kann in der gesamten Mukosa nicht nachgewiesen werden (Donetti et al., 2005).

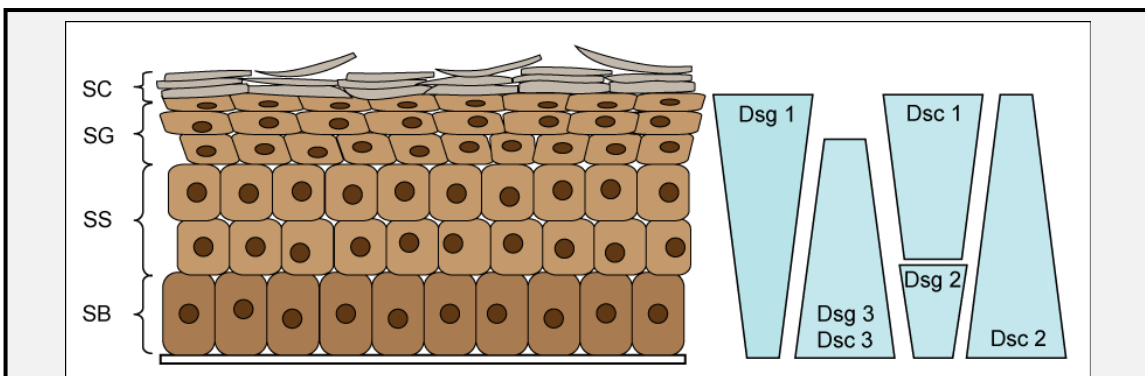


Abb. 2: Schema humaner Epidermis mit Desmocadherin-Verteilung

Die Epidermis ist von tief nach oberflächlich aus den Schichten Stratum basale (SB), Stratum spinosum (SS), Stratum granulosum (SG) und dem vollständig verhornten Stratum corneum (SC) aufgebaut. Die Expression von Dsg 1 und Dsc 1 nimmt vom SG zum SB hin ab, während sie bei Dsg 3/Dsc 3 vom unteren SG bis zum SB hin zunimmt. Dsc 2 nimmt vom SB hin zum SG ab, während sich Dsg 2 in adulter Epidermis nur in geringen Mengen im SB nachweisen lässt. Modifiziert nach Waschke, 2008.

In der Epidermis hingegen ist die Expression der Desmocadherine differenzierter (siehe Abb. 2). Dsg 1 und Dsc 1 sowie Dsg 3 und Dsc 3 sind jeweils relativ gleichartig verteilt (Getsios et al., 2004b). Das erste Paar lässt sich in der Epidermis von den oberen Schichten des Stratum granulosum abnehmend bis zum Stratum basale nachweisen. Dsg 3 und Dsc 3 lassen sich vom unteren Stratum granulosum bis zur Basalmembran darstellen, allerdings liegt hier die Betonung im Bereich der tiefen epidermalen Schichten. Jedoch zeigen beide Paare eine breite Überlappungszone im Stratum spinosum (Mahoney et al., 2006; Waschke, 2008). Eine ähnliche Verteilung wie Dsg 3 zeigt Dsc 2, allerdings reicht die Expression bis hinauf in das obere Stratum granulosum. Dsg 2 wird in der adulten Haut nur in sehr geringem Ausmaß gefunden, hier ist es hauptsächlich auf die tiefen Schichten der Epidermis beschränkt. Dsg 4 wird vor allem im Stratum granulosum exprimiert (Mahoney et al., 2006).

1.5 Pemphigus

Pemphigus ist eine lebensgefährliche, durch intraepidermale Blasenbildung gekennzeichnete Autoimmunerkrankung (Stanley und Amagai, 2006). Der vom griechischen Pemphix (=Blase) abgeleitete Begriff wurde erstmals 1791 erwähnt (Schmidt et al., 2000). Die Abgrenzung von den ebenfalls blasenbildenden Pemphigoid-Erkrankungen wurde 1953 eingeführt (Lever, 1953). Pemphigus ist nicht auf den Menschen beschränkt, sondern tritt auch bei Pferden, Hunden und Katzen auf. Beim Menschen beträgt die Inzidenz 0,75-5 Fälle pro einer Million mit einem Gipfel zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr (Bystryn und Rudolph, 2005). Die Krankheit bevorzugt kein Geschlecht, allerdings ist die Prävalenz bei bestimmten Bevölkerungsgruppen wie den Ashkenazi-Juden oder regional z. B. bei Bewohnern des Mittelmeerraumes, Nordindiens oder Persiens erhöht (Prajapati und Mydlarski, 2008). Pemphigus vulgaris (PV) sowie Pemphigus foliaceus (PF) sind die beiden Hauptvarianten dieser Erkrankung. Beim Menschen macht PV ca. 80% aller Pemphiguserkrankungen aus, bei Tieren dominiert dagegen PF.

In Brasilien existiert eine endemische Variante von PF, auch Fogo selvagem genannt. Diese ist gekennzeichnet durch ihre familiäre Häufung und ihr

Auftreten entlang von Flussläufen, sodass Vektoren wie eine bestimmte Stechmückenart als Auslöser diskutiert werden (Diaz et al., 1989).

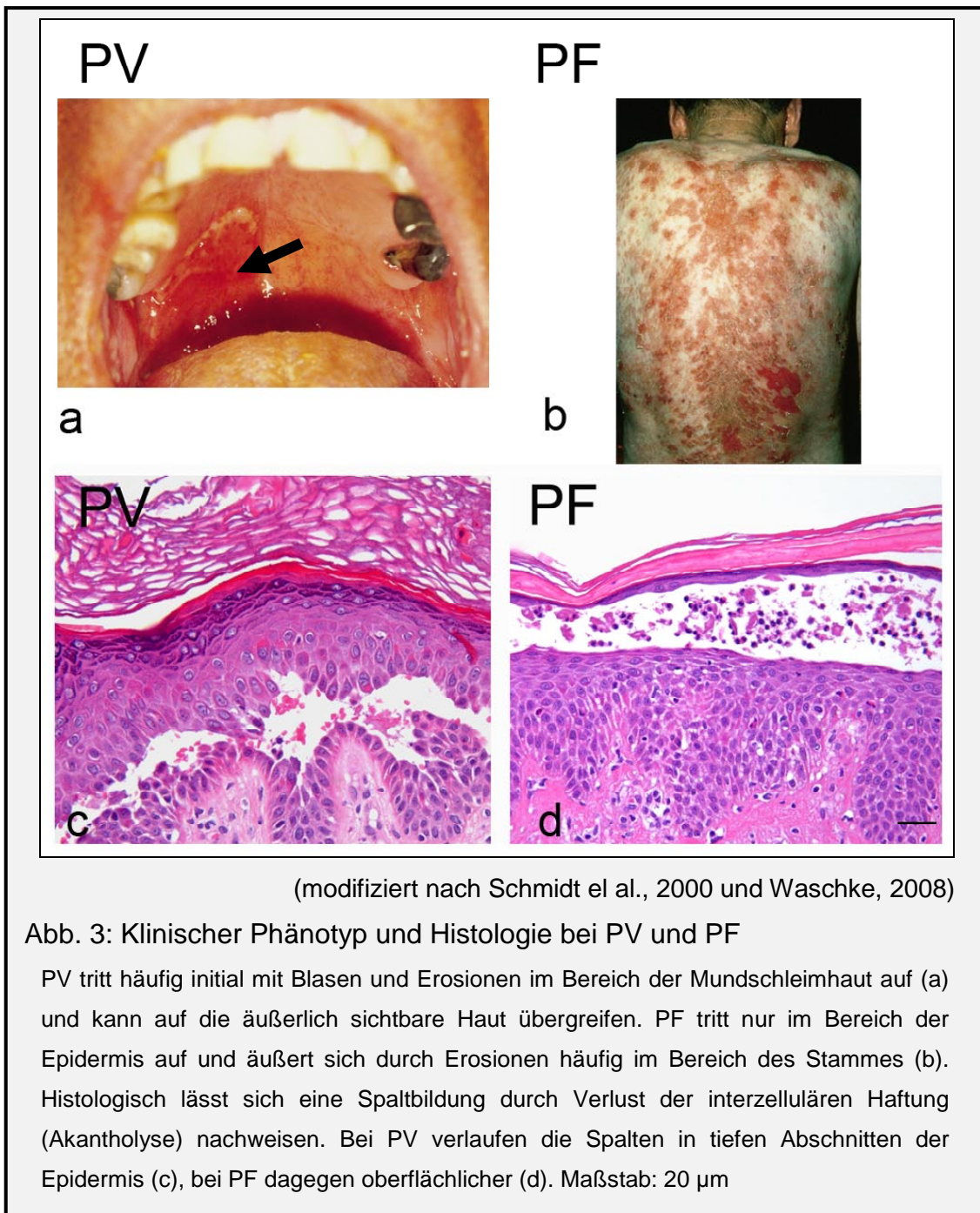
Weiterhin kann Pemphigus medikamentös induziert werden. Medikamente mit einer Sulfhydryl (SH)-Gruppe wie Penicillamin oder Captopril lösen meist PF aus, während bestimmte Medikamente ohne diese SH-Gruppe wie Penicillin oder Cephalosporine PV induzieren können (Wolf et al., 1991). Hierbei kann es, wie bei den klassischen Pemphigus-Erkrankungen, zum Auftreten von Autoantikörpern gegen Dsg 1 und/oder Dsg 3 kommen (Schmidt et al., 2000).

Eine weitere Variante der Pemphiguserkrankung tritt paraneoplastisch auf, meist im Rahmen eines Castleman-Tumors, von Non-Hodgkin-Lymphomen, Thymomen oder chronisch lymphatischen Leukämien (Zhu und Zhang, 2007).

Klinisch äußert sich PV initial meist in schmerzhaften Blasen und Erosion im Oropharynx oder in der Genitalschleimhaut (Abb. 3a). Die Krankheit kann auf diese Bereiche beschränkt bleiben, oder auch auf Kopfhaut, Stamm, Axilla und Leiste übergreifen. Aufgrund der mechanischen Beanspruchung platzen die Blasen leicht, sodass häufig nur oberflächliche, im Verlauf narbenfrei abheilende Erosionen zu sehen sind.

Im Gegensatz zu PV betrifft PF ausschließlich die Epidermis und spart die Schleimhäute aus. Da die Blasen aufgrund der oberflächlicheren intraepidermalen Lokalisation (siehe unten) sehr fragil sind, imponiert die Erkrankung durch erythematöse, verkrustende Läsionen am gesamten Integument (Abb. 3b).

Die Diagnose wird immer anhand des klinischen Phänotyps, der Histologie und immunologischer Tests gestellt. Außer den offensichtlichen Effloreszenzen ist bei Pemphigus häufig das Nikolsky-Zeichen positiv, wobei sich durch festes Bestreichen einer gesunden Hautregion eine Blasenbildung induzieren lässt. Das histologische Korrelat der Pemphiguserkrankung wird als Akantholyse bezeichnet und zeigt die intraepidermale Spaltbildung als Folge des interzellulären Haftungsverlusts der Keratinozyten. Die Spaltbildung bei PV zeigt sich in tiefen Abschnitten der Epidermis meist direkt über dem Stratum basale (Abb. 3c). Die Blasen bei PF dagegen sind oberflächlicher häufig knapp unterhalb des Stratum corneum im Stratum granulosum lokalisiert (Abb. 3d).



Da akantholytische Zellen auch bei anderen Erkrankungen wie Morbus Hailey-Hailey oder Impetigo bullosa auftreten, ist zur Sicherung der Diagnose die Korrelation mit Antikörpertitern unerlässlich. Bei Pemphigus sind Autoantikörper gegen Dsg 1 und Dsg 3 ursächlich beteiligt. Von diesen zwei Antigenen lassen sich bei PF nur Autoantikörper gegen Dsg 1 nachweisen, während die Autoantikörper bei PV entweder nur gegen Dsg 3 alleine gerichtet sind, oder in Kombination mit Autoantikörpern gegen Dsg 1 auftreten. So ist der alleinige

Befall von Schleimhäuten nur mit Autoantikörpern gegen Dsg 3 vergesellschaftet, während bei mukokutanem Verlauf zusätzlich Autoantikörper gegen Dsg 1 nachgewiesen werden können. Dieser Nachweis wird entweder direkt, als immunfluoreszierende Darstellung gebundener Antikörper in Hautbiopsien oder als indirekte Immunfluoreszenz auf einem Substrat wie Affenösophagus durchgeführt. Eine weitere standardmäßig eingesetzte Methode ist die Detektion der Autoantikörper mittels ELISA mit rekombinant hergestellten Dsg als Antigen (Amagai et al., 1999). Diese Methode der Titerbestimmung ist hochspezifisch und meist sensitiver als der Nachweis durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie.

Pemphigus wird nur immunmodulatorisch behandelt, da eine spezifische oder kausale Therapie nicht bekannt ist (Prajapati und Mydlarski, 2008). Meist werden zur Initialtherapie hochdosiert Glucokortikoide verabreicht, gefolgt von dem Versuch des Ausschleichens nach einer Remissionsinduktion. Weitere Möglichkeiten sind Gabe von Zytostatika wie Azathioprin oder Cyclophosphamid zur Verringerung der Glucokortikoiddosis, die intravenöse Verabreichung von Immunglobulinen oder Plasmapherese zur Reduktion zirkulierender Autoantikörper. Auch oder der Einsatz von Rituximab, einem monoklonalen Antikörper gegen CD20 der B-Zellen ist in therapierefraktären Fällen sinnvoll. Vor der Entwicklung systemisch zu verabreichender Immunsuppressiva verlief die Krankheit durch Herabsetzung der Barrierefunktion der Haut mit Flüssigkeitsverlust und massiven Superinfektionen der Erosionen in bis zu 75% innerhalb eines Jahres tödlich (Lever und Schaumburg-Lever, 1984). Auch wenn Todesfälle inzwischen selten beschrieben werden, so führen doch Krankheit und Nebenwirkungen der Therapiemethoden zu hoher Morbidität und starken Einschränkungen in der Lebensqualität der Betroffenen.

1.5.1 Pathogenese des Pemphigus

Es besteht allgemeiner Konsens darüber, dass Autoantikörper der Immunglobulin-Klasse G (IgG) für die Entstehung der beiden Krankheitsentitäten ursächlich sind. So wurden 1964 bei PV zum ersten Mal

Antikörper an Stellen der intraepidermalen Blasenbildung nachgewiesen (Beutner und Jordon, 1964). Als der passive Transfer aufgereinigter IgG-Fractionen von Pemphiguspatienten auf neonatale Mäuse bei den Tieren zu epidermaler Blasenbildung führte, wurde die Pathogenität zirkulierender Antikörper bewiesen (Anhalt et al., 1982). Im weiteren Verlauf wurden Zielantigene von PF und PV als ein 160 kDa- sowie ein 130 kDa-Protein identifiziert (Stanley et al., 1982; Koulu et al., 1984). Über Isolation aus cDNA-Bibliotheken stellten sich das 160 kDa-Protein als Dsg 1 und das 130 kDa-Molekül als Dsg 3 dar (Koch et al., 1990; Amagai et al., 1991). Spezifische, aus Patientenserum isolierte bzw. mittels cDNA hergestellte Antikörper gegen Dsg 1 oder Dsg 3 waren ausreichend, um im Mausmodell Blasenbildung zu induzieren (Amagai et al., 1992; 1994a). In diesen Publikationen konnte eine Spaltbildung verhindert werden, wenn die Antikörper gegen Dsg 1 und 3 aus dem Serum eliminiert wurden. Aufgrund dieser Daten wurde die Theorie der Desmoglein-Kompensation propagiert (Mahoney et al., 1999a; Hanakawa et al., 2002). Diese besagt, dass sich Dsg 1 und Dsg 3 gegenseitig kompensieren und beruht auf der unterschiedlichen Verteilung der Desmogleine in der Epidermis bzw. Schleimhaut. Da in letzterer überwiegend Dsg 3 und nur wenig Dsg 1 exprimiert werden, kann bei mukösem PV mit Autoantikörpern gegen Dsg 3 die interzelluläre Haftung der Keratinozyten nicht von Dsg 1 übernommen werden. Bei mukokutanem PV tritt der Kompensationstheorie nach die Spaltbildung in der Epidermis suprabasal auf, weil dort durch Antikörperbindung an Dsg 1 und 3 sich diese nicht mehr gegenseitig kompensieren können. PF mit Antikörpern nur gegen Dsg 1 führt dagegen zu oberflächlicher epidermaler Spaltbildung, da in der Tiefe das stark exprimierte Dsg 3 die durch Blockade von Dsg 1 verringerte Keratinozytenhaftung ausgleicht.

Allerdings zeigte sich in den letzten Jahren, dass es neben Dsg 1 und Dsg 3 eine Fülle von Epitopen gibt, gegen die Antikörper bei PF und PV gerichtet sind. So können diese gegen Strukturen der Adhäsionskontakte gerichtet sein, wie Dsg 4, Dsc 1-3, Desmoplakin, Plakoglobin oder E-Cadherin (Amagai et al., 2006), oder auch gegen Antigene außerhalb von Haftkontakten wie Acetylcholinrezeptoren (Nguyen et al., 2000a). Auch wenn die Pathogenität

dieser Antikörper im Einzelnen nicht immer geklärt ist, so können IgG-Fraktionen von PV-Patienten, aus denen die Dsg 1- und Dsg 3-Antikörper entfernt wurden, noch zu Blasenbildung in Dsg 3-defizienten Mäusen führen (Nguyen et al., 2000b). Dies lässt Zweifel an der These aufkommen, dass Antikörper gegen Dsg 1 und Dsg 3 immer die alleinigen Auslöser von PF und PV sind.

Weitere Hinweise wurden gefunden, die darauf hindeuten, dass das rein mechanistische Modell der Desmoglein-Kompensationstheorie, beruhend auf einfacher Behinderung der wechselseitigen Desmocadherinhaltung durch gebundene Antikörper, nicht ausreichend ist, um die Pemphigus-Pathogenese vollständig zu erklären. So wurde schon früh die offenbar durch PV-IgG ausgelöste Aktivierung von Proteasen diskutiert, die zum Abbau von Desmocadherinen führen (Farb et al., 1978). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von Plasminogenaktivator (PA) sowie die Expression des Urokinase-Typ-Plasminogenaktivatorrezeptors (uPAR) erhöht ist (Hashimoto et al., 1983; Seishima et al., 1997; Xue et al., 1998). Antikörper gegen uPAR sowie PA-Inhibitor waren meist ausreichend, die PV-IgG vermittelte Spaltbildung zu inhibieren (Hashimoto et al., 1989). Da allerdings PA-defiziente Mäuse ebenfalls eine Blasenbildung nach passiver Pemphigus-IgG-Injektion entwickelten (Mahoney et al., 1999b), wird dem PA-System eher eine Rolle in der Verstärkung der durch Pemphigus-IgG induzierten Effekte zugeschrieben (Waschke, 2008).

In den letzten Jahren konnte weiterhin eine Fülle von Signalwegen aufgezeigt werden, die durch Bindung von Pemphigus-Antikörpern in den Keratinozyten beeinflusst werden. So wurde beschrieben, dass PV-IgG via Phospholipase C (PLC) zu einem raschen Anstieg von intrazellulärem Ca^{2+} und Inositol-1,4,5-Triphosphat mit nachfolgender Aktivierung von Proteinkinase C (PKC) und PA führt (Kitajima et al., 1999). Konsequenterweise war eine Inhibition von PKC und PLC ausreichend, um *in vivo* eine Blasenbildung zu verhindern (Sánchez-Carpintero et al., 2004).

Ein weiteres Protein, das mit der Pemphigus-Pathogenese in Verbindung gebracht wird, ist die Tyrosinkinase Src. Diese wird durch PV-IgG aktiviert (Chernyavsky et al., 2007). Desweiteren führte eine pharmakologische

Inhibition von Src über eine reduzierte Phosphorylierung von p38MAPK (p38 Mitogen aktivierte Kinase) zur Verringerung der PV-IgG-Effekte *in vitro*. Eine andere Gruppe zeigte, dass sowohl PV- als auch PF-IgG *in vitro* wie *in vivo* zu Phosphorylierung von p38MAPK und einem der Zielproteine dieser Kinase, dem HSP27 (Hitzeschockprotein 27) führen (Berkowitz et al., 2005; 2006; 2007). Src phosphoryliert ebenfalls p120-Catenin, von dem ein stabilisierender Effekt auf Adhärensjunktionen bekannt ist (Chernyavsky et al., 2008) und das ebenfalls an nicht desmosomal lokalisierte Dsg 3-Moleküle bindet (Kanno et al., 2008).

Eine wichtige Rolle in der PV-Pathogenese wird auch Plakoglobin zugeschrieben. So sind Plakoglobin-defiziente Keratinozyten unempfindlich gegenüber PV-IgG-vermittelte Effekte wie Lückenbildung, Dsg-Depletion und der als Keratinfilamentretraktion bezeichneten desmosomalen Ablösung von Intermediärfilamenten und deren Verlagerung in das Zellinnere (Caldelari et al., 2001). In Wildtyp-Keratinozyten führte PV-IgG zu einer Unterdrückung der Translokation von Plakoglobin in den Zellkern (Williamson et al., 2006). Dort inhibiert Plakoglobin physiologischerweise die Expression des Protoonkogens c-Myc durch Interaktion mit seinem Promotor. Diese nur durch PV-IgG vermittelte Disinhibition resultierte in einer c-Myc-Überexpression mit Hyperproliferation und geschwächter Adhäsion. Somit führt PV auch zu Veränderungen der Genexpression und des Zellzyklus. Als weiteren Hinweis hierfür mag die Beeinflussung der Cdk2 (*cyclin dependent kinase 2*)-Expression durch Serum von PV-Patienten gelten (Lanza et al., 2008).

Es wird angenommen, dass durch Pemphigus-IgG vermehrt desmosomale Proteine abgebaut und endozytiert werden (Calkins et al., 2006; Yamamoto et al., 2007; Delva et al., 2008), möglicherweise nach vorangehender Phosphorylierung von Dsg 3 (Aoyama et al., 1999). Dies ist üblicherweise verbunden mit einer Retraktion von Keratinfilamenten (Wilgram et al., 1961; 1964). Weiterhin existieren Arbeiten, nach denen Pemphigus-IgG Apoptose auslösen soll (Puviani et al., 2003; Wang et al., 2004; Frusic-Zlotkin et al., 2006). Allerdings ist unklar, ob Apoptose ursächlich für die Akantholyse ist, oder aber erst als Folge dieser entsteht.

Letztendlich führen Pemphigus-IgG zu einem Verlust der interzellulären Haftung. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Akantholyse eine späte Folge von Pemphigus-IgG-Einwirkung ist, da sie frühestens 6-12 Stunden nach experimenteller Gabe von Pemphigus-IgG auftritt. Die Beeinflussung von Signalkaskaden hingegen stellen frühe Ereignisse dar, die in einem Zeitrahmen von Minuten bis Stunden auftreten können (Waschke, 2008).

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass die Pathogenese von PV und PF nicht über ein einfaches Modell zu erklären ist. Beim jetzigen Stand der Forschung lässt sich die Vielzahl der bisher entdeckten Wirkungen von Pemphigus-IgG leider nicht zu einem integrativen Gesamtkonzept der Pemphigus-Pathogenese verknüpfen.

1.6 Rho (Ras homologe)-GTPasen

Rho-GTPasen sind eine Gruppe der Ras-Superfamilie von kleinen GTP (Guanosintriphosphat)-Hydrolasen. Die Ras (Rat Sarcoma)-Familie besteht beim Menschen aus über 150 Mitgliedern, die in insgesamt fünf Gruppen eingeteilt werden können: Ras, Rab, Ran, Arf und Rho. Die Rho-Gruppe selbst wird wieder in sechs Untergruppen unterteilt: Rho, Rac, Cdc42, Rnd, RhoT und RhoBTB (Bustelo X. et al., 2007). Die ersten vier Untergruppen werden auch als „typische“ Rho-GTPasen bezeichnet, während RhoT und RhoBTB aufgrund struktureller und funktioneller Unterschiede auch als „atypisch“ eingeteilt werden. Jede dieser sechs Untergruppen umfasst wiederum mehrere GTPasen, sodass aktuell insgesamt 23 Mitglieder der Rho-Familie bekannt sind. Die funktionell am besten charakterisierten GTPasen sind Rho A, Rac 1 und Cdc42, welche auch im Focus dieser Arbeit stehen.

1.6.1 Aufbau und Funktionsprinzip

Rho-GTPasen sind monomere molekulare Schalter, die eine einfache Strategie verwenden, um komplexe zelluläre Prozesse zu steuern. Sie wechseln zwischen zwei Konformationszuständen, einem GTP-gebundenem, aktiven Zustand und einem GDP (Guanosindiphosphat)-gebundenem, inaktiven Zustand. Im aktiven Zustand erkennen sie Zielproteine und lösen Reaktionen aus, bis sie durch ihre intrinsische Hydrolaseaktivität wieder in den inaktiven

Zustand wechseln (Bishop und Hall, 2000). Damit verbunden ist ein Lokalisationswechsel von der Plasmamembran (aktiver Zustand) zum Zytosol (inaktiver Zustand).

Die meisten typischen Rho-GTPasen sind mit einer Größe von 190-250 Aminosäuren klein und bestehen neben der eigentlichen GTPase-Domäne nur aus kurzen C- und N-terminalen Abschnitten. Durch posttranslationelle Modifikation wird eine Isoprenylgruppe an die GTPase gebunden, die eine Verankerung in die Plasmamembran im aktiven Zustand ermöglicht. Weiterhin besitzen die Rho-GTPasen definierte Nukleotid- und Mg^{2+} -Bindestellen. Je nach gebundenem Nukleotid (GDP oder GTP) ändert sich die Konformation der beiden „*switch*“-Regionen genannten Abschnitte der GTPase. Das im Cytosol vorhandene Mg^{2+} verhindert hierbei einen spontanen Austausch der Nukleotide, sodass zur Regulierung dieses Schalterprinzips weitere Schritte nötig sind.

1.6.2 Regulation

Die Funktion der Rho-GTPasen ist streng reguliert um eine stets der Situation angemessene Reaktion auszulösen. In erster Linie sind drei Proteinklassen daran beteiligt: GEFs (*guanine-nucleotide-exchange-factors*), GAPs (*GTPase-activating-proteins*) und GDIs (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*).

1.6.2.1 GEFs

Der erste für Rho A bei Säugetieren entdeckte GDP/GTP-Austauschfaktor wurde als ein Produkt eines Transformationsgens von Zellen eines diffusen B-Zell-Lymphoms identifiziert und deshalb Dbl getauft (Eva et al., 1988). Dieses stellte sich als erstes Mitglied einer Familie von GEFs dar, die spezifisch Rho-GTPasen aktivieren können. Insgesamt sind heute 69 verschiedene dieser Dbl-verwandten GEFs bekannt. Diese Gruppe der GEFs besitzt alle eine DH (Dbl-Homologie)-Domäne neben einer PH (Pleckstrin-Homologie)-Domäne, die den Einbau von GTP in die Rho-GTPasen fördern. In den letzten Jahren wurde eine weitere GEF-Familie identifiziert, genannt DOCK180 (*dedicator of cytokines 180*) (Cote und Vuori, 2002). Somit sind insgesamt aktuell 85 GEFs bekannt (Hall, 2005).

GEFs interagieren mit der GTPase über ein Schlüssel-Schloss-Prinzip und verändern dabei die „*switch*“-Regionen. Dies bewirkt eine Dissoziation von Mg^{2+} und GDP, wodurch die Bindungstasche frei wird und das im Cytosol im relativen Überschuss vorhandene GTP zusammen mit Mg^{2+} binden kann (Rossman et al., 2005). Somit katalysieren GEFs also den Austausch von GDP in GTP und führen zur Aktivierung.

1.6.2.2 GAPs

P50-rhoGAP war das erste identifizierte GTPase-aktivierende Protein und wurde aus Extrakten einer menschlichen Milz isoliert. Es führt zur Aktivierung der intrinsischen Hydrolaseaktivität von Rho A, Rac 1 und Cdc42, somit zur Umwandlung von GTP in GDP und zur Inaktivierung dieser GTPasen (Garrett et al., 1989). Insgesamt sind heute über 70 Proteine mit GAP-Aktivität bekannt (Yang und Kazanietz, 2007).

Allen GAPs gemein ist eine Sequenz aus ca. 170 Aminosäuren, die ursächlich für die Rho-Aktivierung ist und RhoGAP-Domäne genannt wird. Meist inseriert ein konservierter Argininrest in die aktive Bindungsstelle der Rho-GTPase und stabilisiert einen Konformationszustand, der für die Hydrolyse nötig ist (Rittinger et al., 1997).

1.6.2.3 GDIs

Für Rho-GTPasen wurden bisher insgesamt 3 GTP-Dissoziations-Inhibitoren identifiziert, zuerst der ubiquitär vorhandene RhoGDI (Ueda et al., 1990). Es folgten der hauptsächlich auf das hämopoetische System beschränkte Ly/D4GDI (Scherle et al., 1993), sowie RhoGDly, der vor allem in Lunge, Gehirn und Hoden exprimiert wird (Adra et al., 1997).

Es wurden drei biochemische Wege beschrieben, mittels derer RhoGDIs ihre inhibitorische Wirkung vermitteln (DerMardirossian und Bokoch, 2005): Erstens unterdrücken sie die Dissoziation von GDP von der GTPase, zweitens interferieren sie mit dem GTP-gebundenen Zustand und unterdrücken die intrinsische wie auch die durch GAP katalysierte Hydrolyse und verhindern die Interaktion mit Effektormolekülen. Als dritte Möglichkeit der Einflussnahme modulieren GDIs das Zirkulieren der Rho-GTPase zwischen Plasmamembran

und Cytosol, indem sie mit ihrer Bindungstasche an den GTPase-eigenen Isoprenylrest zur Membranverankerung binden.

1.6.3 Funktionen der Rho-GTPasen

Rho-GTPasen regulieren eine Fülle von zellulären Funktionen. Recht gut charakterisiert ist ihre Wirkung auf das Aktin-Zytoskelett. So konnte vor gut 15 Jahren gezeigt werden, dass Rho die räumliche Verteilung und Formierung von kontraktilen Aktin-Myosin-Filamentbündeln (Stressfasern), sowie den Einbau fokaler Kontakte in die Zellmembran als Reaktion auf eine Vielzahl extrazellulärer Stimuli wie Integrinbindung oder LPA (*lysophosphatidic acid*) reguliert (Ridley und Hall, 1992). Der Effekt auf Kontraktilität und die Verteilung von Stressfasern wird beispielsweise über die Rho-Effektormoleküle ROCKI und ROCKII (*Rho associated coiled-coil containing protein kinases*) vermittelt. Die Aktivität dieser Serin/Threonin-Kinasen wird durch Bindung von Rho-GTP erhöht. Sie hemmen die Myosinleichtkettenphosphatase (MLCP), und dadurch die Dephosphorylierung der Myosinleichtkettenkinase (MLC). Dies führt zu einer vermehrten Aktivität der MLC mit gesteigerter Aktivierung von Myosin, vermehrter Bildung von Stressfasern und Kontraktilität. (Noda et al., 1995).

Aktivierung von Rac 1 steigert die Polymerisation und Stabilisierung von Aktin in der Zellperipherie und führt damit zur Ausbildung von Lamellipodien. z.B. nach Stimulation durch Plättchenwachstumsfaktor (PDGF) oder Insulin. Aktivierung von Cdc42 fördert die Polymerisation von Aktinfilamenten und die Filopodienformation nach Gabe von Bradykinin oder Interleukin-1 (Ridley et al., 1992; Kozma et al., 1995). Dies geschieht über verschiedene Mechanismen. So kann Rac 1 über seinen Effektor PAK (p21-aktivierte Kinase) die Lim-Kinase aktivieren, welche daraufhin Cofilin inhibiert, was zur Stabilisierung von Aktinfilamenten führt. Zudem wird über eine vermehrte Dephosphorylierung von MLC der Aufbau von Stressfasern vermindert. Als dritten Weg kann Pak auch zur Komplexbildung von Cortactin mit dem Aktin-Polymerisierungsfaktor Arp 2/3 und Vertretern der WASP (Wiscott-Aldrich-Syndrom-Protein)-Familie (Millard et al., 2004) führen, was in einer Ausbildung von Aktinfilamenten resultiert.

N-WASP kann auch direkt von Cdc42 aktiviert werden, sodass Cdc42 über diesen Weg ähnliche Effekte wie Rac 1 vermitteln kann. Schlussendlich ist PAK

ebenfalls ein Effektor von Cdc42, sodass die oben genannten Wege prinzipiell nicht nur für Rac 1, sondern auch für Cdc42 gelten.

Rho-GTPasen werden auch mit Bildung und Regulation von Zellkontakten in Verbindung gebracht. So sind Rho A und Rac 1 essentiell für die Ausbildung von Adhärenskontakten in Keratinozyten (Braga et al., 1997; Takaishi et al., 1997). Eine verminderte Expression dieser zwei GTPasen geht auch mit verminderter E-Cadherin-Expression einher. Umgekehrt führt eine homophile E-Cadherin-Bindung zur Aktivierung von Rac 1 und Cdc42 (Kim et al., 2000; Kovacs et al., 2002; Hogan et al., 2004) und in MDCK-Zellen zu einer Inaktivierung von Rho A (Noren et al., 2001). In weiteren Studien zeigte die Gruppe um Braga allerdings, dass Aktivierung von Rac 1 zu Störung von E-Cadherin-Adhäsion führt (Braga et al., 2000; Lozano et al., 2008). Rho A ist dagegen zur Ausbildung von Okkludenskontakten notwendig (Nusrat et al., 1995). Über die Regulation von Desmosomen durch Rho-GTPasen ist noch recht wenig bekannt. In einer Studie zeigten sich keine Effekte von Rho-GTPasen auf bereits ausgebildete Desmosomen (Braga et al., 1997). Interessanterweise ist p120-Catenin, ein in Adhärensjunktionen und an freies Dsg 3 gebundenes Protein in der Lage, Rho A zu inhibieren und Rac 1 sowie Cdc42 zu aktivieren (Anastasiadis, 2007). Auch ein naher Verwandter von p120-Catenin, das in Desmosomen zu findende p0071, aktiviert Rho A über den GEF Ect 2 während der Zellteilung (Wolf et al., 2006).

Neben der Beeinflussung des Aktinzytoskeletts und von Zelljunkten konnte eine Vielzahl von weiteren Effekten identifiziert werden, an deren Entstehung Rho-GTPasen beteiligt sind. Hierzu gehören eine Beeinflussung der Ausbildung von Mikrotubuli, des Zellzyklus und der Zellteilung, der Zellmigration oder Interaktion mit dem Phospholipidstoffwechsel (Jaffe und Hall, 2005).

1.7 Fragestellung

Die Integrität der Epidermis ist von großer Bedeutung für die Homöostase des Säugetierorganismus. Im adulten Organismus stellen Desmosomen mit ihren Strukturproteinen, insbesondere den Desmocadherinen, wichtige Bestandteile zur Aufrechterhaltung der Barrierefunktion der Haut dar. Es ist zu erwarten, dass Expression und Verteilung von desmosomalen Proteinen aufgrund ihrer

Wichtigkeit streng reguliert werden. Die potentiell lebensbedrohliche Pemphigus-Erkrankung ist ein Beispiel für eine erworbene autoimmun bedingte Malfunktion der Desmosomen. Zum Verständnis dieser Erkrankung und zur Entwicklung von Therapieansätzen ist es daher wichtig, den Kenntnisstand über die physiologische Regulation der Desmosomen in der Epidermis zu erweitern. Verschiedene Beobachtungen sprechen dafür, dass die klinischen Merkmale der Pemphigus-Erkrankung auch durch Interferenz mit der physiologischen Regulation der desmosomalen Haftung ausgelöst werden. Hierbei scheinen Rho-GTPasen aufgrund ihrer Schlüsselrolle in vielen intrazellulär ablaufenden Signalprozessen mit bekannten Effekten auf Zellzytoskelett und Adhärensjunktionen geeignete Regulationsproteine im Hinblick auf desmosomale Adhäsion zu sein.

In dieser Arbeit werden deshalb schwerpunktmäßig zwei Zielsetzungen verfolgt: Zuerst soll der Einfluss von Rho-GTPasen auf die desmosomale Haftung von Keratinozyten untersucht werden. Darauf aufbauend schließt sich dann die Überprüfung an, ob Pemphigus-IgG über eine Beeinflussung von Rho-GTPasen ihre epidermal destabilisierenden Effekte vermitteln und ob durch eine experimentelle Beeinflussung der Aktivität von Rho-GTPasen die zelluläre Wirkung von Pemphigus-IgG beeinflusst werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Es wurden zwei Zelllinien in Kultur gehalten. HaCaT (*human adult low calcium elevated temperature*)-Zellen sind spontan immortalisierte humane Keratinozyten und wurden erstmals 1988 charakterisiert (Boukamp et al., 1988). Diese stabile Zelllinie ist vollständig differenzierungsfähig, nicht tumorigen und *in vivo* nicht invasiv. Sie ist weiterhin problemlos kultivierbar und bildet schnell konfluente Zellrasen auf unbehandelten Kulturflaschen oder Deckgläsern.

Zur Produktion von Desmoglein-Fc-Konstrukten wurden immortalisierte CHO (*Chinese hamster ovary*)-Zellen verwendet. Diese Zelllinie wurde 1957 aus den Ovarien eines Chinesischen Hamsters isoliert (Puck, 1957). Aufgrund ihrer Anspruchslosigkeit in den Haltungsbedingungen und einem leistungsfähigem Genamplifikationssystem sind sie die am häufigsten zur Proteinexpression verwendeten Säugetier-Wirtszellen (Mohan et al., 2008).

Beide Zelllinien wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM, Sigma Aldrich, München) mit einer Konzentration von 1,8 mmol/L Ca^{2+} sowie 4,5 g/L Glucose unter Zusatz von 50 U/ml Penicillin G und 50 μg Streptomycin sowie 10% fetalem Kälberserum (FCS, Biochrom, Berlin) gehalten. Der Austausch des Mediums erfolgte jeden zweiten Tag.

Die Linien wuchsen in angefeuchteter Luft mit einem Anteil von 5% CO_2 bei 37°C bis zum Zeitpunkt der Aufteilung zur Verwendung bzw. zur erneuten Passage. CHO-Zellen wurden in T25-Flaschen kultiviert und bei Erreichen von Konfluenz durch Zugabe einer Trypsinlösung (0,05% (w/v) Trypsin, 0,02% (w/v) EDTA in PBS) vom Flaschenboden abgelöst. Nach gründlicher Resuspension mittels einer elektrischen Pipette wurden die Zellen im Verhältnis 1:20 bis 1:50 auf neue T25-Kulturflaschen, bzw. zur Proteinaufreinigung auf T175-Kulturflaschen verteilt. Die HaCaT-Zelllinie wurde in T75-Flaschen gehalten und ebenfalls bei 90-100%iger Konfluenz geteilt. Vor der Zugabe der Trypsinlösung wurde für 30 min eine EDTA-Lösung [0,05% (w/v) EDTA in PBS] zugegeben, um durch die Chelation von Ca^{2+} die Cadherin-Bindung zu schwächen und

somit eine Vereinzelnung der Zellen zu erleichtern. Danach erfolgte analog zur CHO-Kultur die Zugabe von Trypsin, Homogenisierung der Zellsuspension und Aufteilung auf neue T75-Flaschen im Verhältnis 1:5-1:10 bzw. für Versuche die Aussaat auf Deckgläser.

2.2 ***Bakterielle Toxine***

Das von *Clostridium limosum* stammende Exoenzym C3 katalysiert die Übertragung des ADP-Ribose-Restes vom Co-Substrat NAD auf Asparagin an Position 41 von Rho A-C. Daraus resultiert eine Inaktivierung dieser GTPase (Just et al., 1992). Um die schlechte Zellgängigkeit der Transferase zu verbessern, wurde sie an die N-terminale Adaptordomäne der Enzymkomponente C2I des C2-Toxins von *Clostridium botulinum* gekoppelt (Haug et al., 2006). Das C2INC3 genannte Fusionstoxin wurde in einer Konzentration von 300 ng/ml über 180 min eingesetzt.

Letales Toxin (LT) aus *Clostridium sordellii* nutzt UDP-Glucose als Co-Substrat, um Rac und Ras an Threonin in Position 35 zu glykosilieren (Just et al., 1996). Dies führt zu einer Inaktivierung der betreffenden GTPasen. Es wurde ebenfalls in Konzentrationen von 300 ng/ml über 180 min eingesetzt.

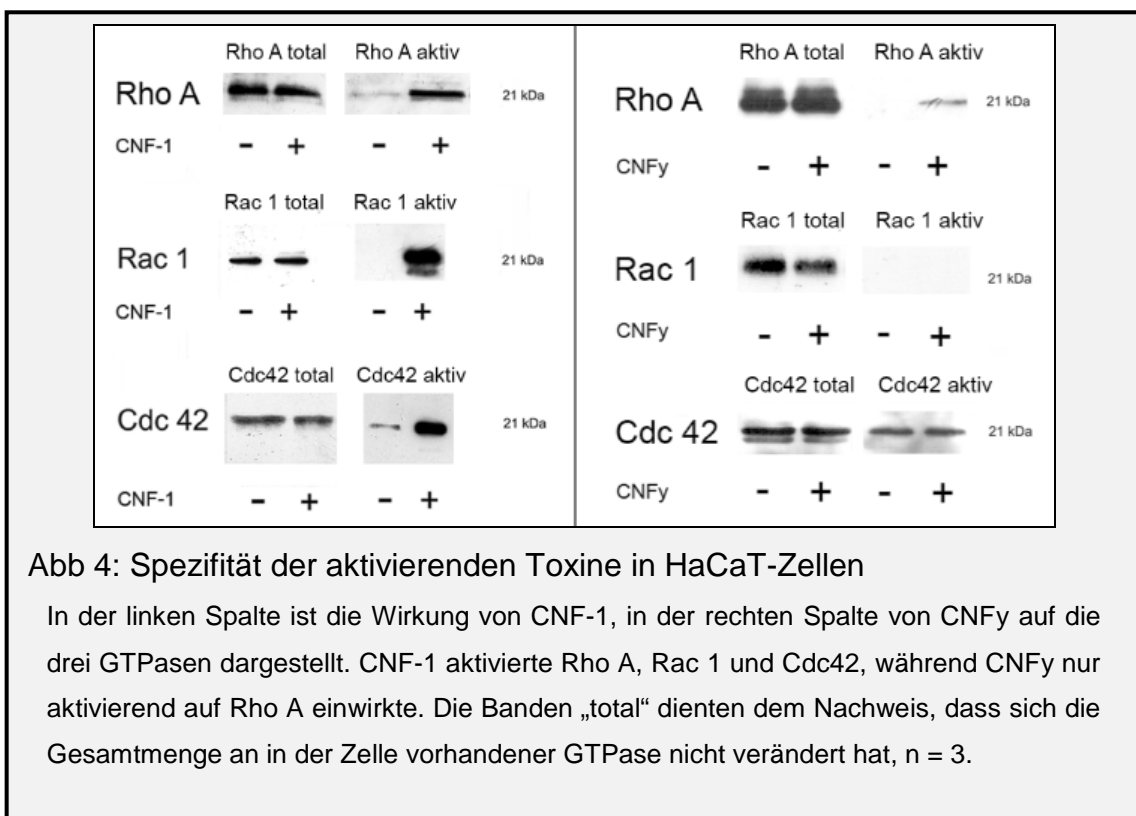
Toxin B, einer der Hauptvirulenzfaktoren von *Clostridium difficile*, führt, ähnlich LT, zu einer Glykosylierung von Rho-GTPasen (Just et al., 1995). Ziele sind allerdings Rho A, B, C, Rac 1-3, Cdc42 sowie TC10 (einem Mitglied der Cdc42-Untergruppe) mit Glykosylierung von Threonin 37 im Falle von Rho A sowie Threonin 35 bei Rac 1 und Cdc42. Das Toxin wurde *in vitro* in einer Konzentration von 200 ng/ml über einen Zeitraum von 180 min verwendet. Für Versuche mit menschlicher Haut war eine Konzentration von 800 ng/ml nötig.

Der von etwa der Hälfte aller *Escherichia coli*-Stämme produzierte zytotoxische nekrotisierende Faktor 1 (CNF-1) führt durch Deamidierung zu konstitutiver Aktivierung der GTPasen Rho A, Rac 1 und Cdc42. Im Falle von Rho A geschieht diese Deamidierung an einem Glutaminrest an Position 63 (Schmidt et al., 1997). CNF-1 wurde in Konzentrationen von 300 ng/ml über 120 min bei Behandlung mit Kulturzellen bzw. 1200 ng/ml bei Behandlung von Epidermis verwendet.

Eine selektive Aktivierung von Rho A ebenfalls über eine Deamidierung an Glutamin 63 gelingt mit dem zytotoxischen, nekrotisierenden Faktor γ (CNF γ) aus *Yersinia pseudotuberculosis* (Hoffmann et al., 2004). Eine Konzentration von 600 ng/ml über einen Zeitraum von 360 min war nötig, um eine sichere Aktivierung von Rho A in Kulturzellen zu garantieren. Bei Versuchen mit Explantaten menschlicher Epidermis war eine Konzentration von 2400 ng/ml notwendig.

Um die Substratspezifität der GTPasen in Keratinozyten zu sichern, wurden Pulldown-Versuche verwendet. Wie in der Western-Blot-Analyse in Abb. 4 zu sehen, aktiviert CNF-1 Rho A, Rac 1 und Cdc42 in HaCaT-Zellen, während sich durch CNF γ nur Rho A aktiviert wird.

Toxin B, LT sowie C2INC3 wurden uns freundlicherweise von Prof. H. Barth (Universität Ulm) überlassen. CNF-1 und CNF γ wurden uns von Prof. G. Schmidt (Universität Freiburg) zur Verfügung gestellt.



2.3 *Antikörper und Testreagenzien*

Antikörper wurden bei indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie und zur Immundetektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen verwendet. Hierzu wurden immer Primärantikörper gegen Epitope des zu untersuchenden Zielproteins mit Sekundärantikörpern verwendet, die den Fc-Teil des Primärantikörpers erkennen (Tab 1, 2). Zur gezielten pharmakologischen Beeinflussung bestimmter Proteine wurden die in Tab. 3 dargestellten Mediatoren verwendet. ALEXA 488 ist ein Fluorophor, das hier gekoppelt an Phalloidin zur Färbung von Aktin verwendet wurde (1:60 in PBS). Phalloidin ist ein Toxin des Knollenblätterpilzes und bindet spezifisch filamentäres (F-)Aktin.

2.3.1 *Primärantikörper*

Tab. 1: Verwendete Primärantikörper				
Antikörper	Typ	Hersteller	Konzentration	
			IF	Blot
a-Dsg 1 p124	monoklonal	Progen, Heidelberg	1:100	n. verw.
a-Dsg 1 p23	monoklonal	Progen, Heidelberg	1:100	n. verw.
a-Dsg 3 p194	monoklonal	Progen, Heidelberg	1:100	n. verw.
a-Dsg 3 2/04	monoklonal	Zytomed, Berlin	1:100	n. verw.
a-E-Cadherin	monoklonal	BD, San Jose	1:100	n. verw.
a-Desmoplakin	polyklonal	Biozol, Eching	1:100	n. verw.
a-Cytokeratin 14	monoklonal	Chemicon, Rosemont	1:100	n. verw.
a-Plakoglobin	monoklonal	Serva, Heidelberg	1:100	n. verw.
a-Rho A	monoklonal	Upstate, Hamburg	1:100	1:500
a-Rac 1	monoklonal	Upstate, Hamburg	1:100	1:500
a-Cdc42	monoklonal	Upstate, Hamburg	n.verw.	1:500

2.3.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Abk.	Hersteller	Konzentration	
			Cy3-gek.	POX-gek.
Ziege-anti-Maus-Fc	gam	Dianova, Hamburg	1:600	1:3000
Ziege-anti-Kaninchen-Fc	garb	Dianova, Hamburg	1:600	n. verw.

2.3.3 Testreagenzien

Name	Hersteller	Funktion	Konzentration
Y27632	Calbiochem	Inhibition Rho-Kinase	30 μ M
SB202190	Calbiochem	Inhibition p38 MAPK α,β	10 μ M

2.4 Desmoglein-Fc-Proteinaufreinigung

Ein Konstrukt aus entweder Dsg 1 oder Dsg 3, gekoppelt an einen Fc-Teil, wurde stabil in CHO-Zellen exprimiert (Waschke et al., 2005) und von diesen in den Überstand des Nährmediums sezerniert.

Um eine Verunreinigung des Protein-Endproduktes zu verhindern, wurden die transfizierten CHO-Zellen nach der letzten Aufteilung in Immunglobulindefizienten Medium gehalten. Dieses wurde nach drei Tagen aus den Kulturflaschen abgesaugt und nach Zugabe von Proteaseinhibitoren (Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin, jeweils 20 μ g/ml) 25 min bei 11 000 g zentrifugiert.

Die Isolation der Dsg-Fc-Konstrukte wurde mittels Protein-A-Affinitätschromatographie vorgenommen, da Protein-A aus dem Bakterium *Staphylococcus aureus* in der Lage ist, den Fc-Teil von Antikörpern zu binden. Hierzu wurde eine 5 ml Spritze mit 1 ml Protein A-Agarose befüllt, das Material ober- und unterhalb mit Fritten positioniert und vor Verwendung mit 20 ml HbSS gespült. Das Medium wurde langsam bei 4°C über Nacht über die Protein-A-Agarose geleitet. Die Elution des Dsg-Fc-Konstruktes von der Agarose erfolgte

durch Zugabe von 3 ml 20 mM Natriumcitrat mit pH 2,4 nach Spülen mit 10 ml HbSS. Das Eluat wurde in insgesamt sechs 0,5 ml-Portionen in Reaktionsgefäße aufgenommen, in denen zuvor 10 µl 2M Na-Carbonat vorgelegt worden war. Mit 1 M NaOH bzw. 1 M HCl wurden die Eluate auf einen pH von 7,0 – 8,0 eingestellt. Das Fusionsprotein wurde in dünnen Dialysesläuchen bei 4°C über Nacht gegen 5 l HbSS dialysiert und danach mit der Bradford-Methode die Menge an Protein bestimmt. Nach Portionierung erfolgte die Lagerung bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

2.5 *Aufreinigung der Patienten- und Kontroll-Antikörper*

Es wurden Seren von zwei PV- sowie zwei PF-Patienten verwendet, deren Erkrankung klinisch, histologisch und serologisch nachgewiesen wurde. Der mittels ELISA erhobene Wert der Dsg 1- bzw. Dsg 3-Autoantikörper ist in arbiträren Einheiten pro ml (U/ml) in Tab. 4 aufgeführt und entspricht einer semiquantitativen Kalibrierung des zu untersuchenden Serums an einer Referenzprobe.

Die Seren der Patienten wurden von Prof. Dr. med. Zillikens, Universitätshautklinik Lübeck zur Verfügung gestellt. Weiterhin stand Serum eines gesunden Freiwilligen zur Verfügung.

Tab. 4: Antikörperwerte der verwendeten Patientenserum

ELISA	Dsg 1 (U/ml)	Dsg 3 (U/ml)
PV IgG 1	535	1098
PV IgG 2	280	685
PF IgG 1	95,4	-
PF IgG 2	128,4	-

Die Aufreinigung zur Gewinnung von IgG-Fractionen erfolgte analog Punkt 2.4, sodass man als Eluat statt des Dsg-Konstrukts ein gereinigtes Antikörpergemisch erhielt. (PV-/PF-IgG bzw. IgG der gesunden Kontrollperson, nachfolgend NH-IgG abgekürzt). Dieses wurde über Nacht gegen 5 l PBS dialysiert, danach mittels Bradford-Analyse die Proteinkonzentration bestimmt,

anschließend portioniert und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert. Bei allen Versuchen wurde eine Endkonzentration von 0,15 mg/ml eingesetzt.

2.6 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

Zur Darstellung spezifischer Strukturen in HaCaT-Zellen bzw. in Epidermisschnitten wurden Antikörper verwendet, die Epitope der jeweiligen Zielstruktur erkennen. Der Fc-Teil dieser gebunden Primärantikörper wird wiederum von einem zugegebenem Sekundärantikörper erkannt, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Durch Anregung mit Licht bestimmter Wellenlänge werden diese Fluorophore angeregt und emittieren selbst Licht sichtbarer Wellenlänge. So leuchtet Indocarbocyanin (Cy 3) rot, während ALEXA 488 grünes Licht emittiert.

HaCaT-Zellen wurden im Verhältnis 1:3 auf runde Deckgläschen (\varnothing 12 mm) aufgeteilt und bis zur Konfluenz in DMEM gehalten. Danach erfolgte die Versuchsbehandlung mit dem jeweiligen Agens. Nach Beendigung wurden die Zellen auf den Deckgläschen mit 2% Formalin (frisch aus Paraformaldehyd, PFA, hergestellt) über 10 min fixiert und anschließend für 5 min mit 0,1% (w/v) Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Alternativ wurde statt der beiden vorherigen Schritte auch Aceton (-20°C, 2 min) verwendet. Nach gründlichem Waschen mit PBS wurden die Deckgläser auf Objektträger überführt. Zur Absättigung unspezifischer Antikörperbindungsstellen erfolgte pro Deckglas die Zugabe von 20 μ l BSA-NGS [0,1% (v/v) Rinderserumalbumin mit 10% (v/v) Ziegenserum in PBS] für 30 min bei Raumtemperatur. Nach Absaugen des BSA-NGS wurden die Zellen mit 20 μ l des Primärantikörpers im entsprechenden Verhältnis in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS über jeweils 5 min wurden die Zellen mit dem entsprechenden Sekundärantikörper mit oder ohne ALEXA 488-Phalloidin für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS über jeweils 5 min wurden die Deckgläschen auf einen Objektträger mit einem Tropfen NPG [1% (w/v) n-propyl-Gallat mit 60% (v/v) Glycerin in PBS] mit der Zellseite nach unten verbracht. NPG vermindert das Ausbleichen des Präparates durch kurzwelliges Licht (Giloh und Sedat, 1982).

2.7 Proteinkonzentrationsbestimmung

Proteinkonzentrationen mussten zur Aufreinigung der Dsg-Konstrukte und Patientenantikörper sowie bei den Pulldown-Versuchen und den Proteinextraktionsversuchen bestimmt werden. Hierbei kamen folgende zwei Methoden zum Einsatz:

2.7.1 Bradford-Methode

Diese Methode kann nur unter nicht denaturierenden Bedingungen verwendet werden. Sie beruht darauf, dass der Farbstoff Coumassie Brilliant Blau in ungebundenem Zustand Absorptionsmaxima bei 470 nm und 650 nm, über basische und hydrophobe Seitenketten an Proteine gebunden allerdings ein Maximum bei 595 nm aufweist (Bradford, 1976). Je mehr Protein einem Überschuss an Bradford-Reagenz (Roth, Karlsruhe) zugegeben wird, desto stärker absorbiert diese Probe Licht der Wellenlänge 595 nm. Um eine quantitative Aussage über die Proteinmenge machen zu können, muss eine Eichgerade mit Proben bekannter Konzentration angelegt werden.

Zu einem Milliliter der Bradford-Lösung im Verhältnis 1:5 wurden jeweils 10 µl der Proben zugegeben. Für die Standardreihe verwendete man jeweils 10 µl eines BSA-Standards zwischen 0,1 und 2 mg/ml.

Nach dem Schütteln der Proben und 10 min Inkubation bei RT wurden diese in ein Photometer-Röhrchen überführt und die Extinktion bei 595 nm im Photometer gemessen.

2.7.2 Amidoschwarz-Methode

Diese Methode kann auch bei Proteingemischen angewandt werden, die in hohen Konzentrationen eines Detergentiums gelöst sind (Nakamura et al., 1985). Er eignet sich somit auch für in SDS-Puffer gelöste Proben. Der Farbstoff Amidoschwarz 10B bindet unter sauren Bedingungen an die Amidostickstoffe des Proteingemisches und kann danach photometrisch bei 620 nm bestimmt werden.

Ein schmaler Streifen Zelluloseacetatfolie wurde mittels eines Bleistifts in gleich breite Abschnitte unterteilt und frei schwebend zwischen zwei Metallklammern fixiert. Auf jeden dieser Abschnitte wurden 5 µl des Proteingemisches sowie ein

Standard aus Proteinen bekannter Menge schlangenlinienförmig verteilt. Die Streifen wurden daraufhin 10 min bei RT in der Färbelösung [0,5% (w/v) Amidoschwarz, 45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure und 45% (v/v) Aqua dest.] gebadet. Danach wurden die Membranen mit einer Entfärbelösung [47,5% (v/v) Methanol, 5% (v/v) Essigsäure und 47,5% (v/v) Aqua dest.] mehrmals gewaschen, bis die kein Protein tragenden Abschnitte vollständig entfärbt waren. Nach Trocknung wurden die unterteilten Segmente des Streifens abgeschnitten und in Reaktionsgefäße überführt. Nach Zufügen einer Lyselösung [2% (w/v) Trichloressigsäure, 16% (v/v) Ameisensäure, 2% (v/v) Essigsäure, 82% (v/v) Aqua dest.] löste sich die Membran bei 60°C über 30 min auf. Nach kräftigem Vortexen ließ sich photometrisch die Extinktion messen und anhand des Eichstandards die Menge an Gesamtprotein bestimmen.

2.8 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Das Prinzip der SDS-PAGE besteht in der unterschiedlichen Laufgeschwindigkeit von verschiedenen großen Molekülen durch eine Gelmatrix aus Acrylamid und Bisacrylamid in einem elektrischen Feld. Hierzu wird der zu untersuchenden Probe das anionische Detergens SDS (Natrium-Dodecyl-Sulfat) im Überschuss zugegeben. Die Anlagerung von SDS an das Protein führt einerseits zur Auflösung von Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine, andererseits zur Maskierung der unterschiedlichen Ladungen. Somit sind die Moleküle einheitlich negativ geladen und liegen in einem linearisierten Zustand vor. Die Denaturierung wird unterstützt durch Erhitzen der Probe auf 95°C. Somit wird eine Beeinflussung des Ergebnisses durch die räumliche Struktur vermieden und die Proteine wandern durch ihre negative Gesamtladung entsprechend ihrer Masse im elektrischen Feld unterschiedlich schnell zur Anode.

Die Auftrennung des Proteingemisches erfolgte nach der Laemmli-Methode (Laemmli, 1970). Hierbei wurden die in dreifach konzentriertem SDS-Puffer gelösten Proben erst in einem 5% (v/v) Polyacrylamid-Gel gesammelt und deren Bestandteile dann in einem 7,5% (v/v) oder 15% (v/v) Gel der Größe nach aufgetrennt. Die Polymerisation des Gels wurde mit APS (Ammoniumpersulfat) initiiert und mit TEMED (Tetramethylethyldiamin)

katalysiert. Verwendet wurden hierbei vertikale Elektrophorese-Gelsysteme (Biorad, München). Zwischen zwei im Abstand von 1 mm senkrecht angeordneten Glasscheiben wurde zuerst das Trenngel mit einer Höhe von ca. 7 cm auspolymerisiert, danach das Sammelgel (Höhe ca. 8 mm) zugegeben und ein Kunststoffkamm eingefügt. Nach der Polymerisation des Sammelgels und dem Entfernen des Kamms wurden die Proben in die entstandenen Taschen gefüllt und mittels der angelegten elektrischen Spannung von 80 V im Sammelgel und 130 V im Trenngel bei RT elektrophoretisch getrennt. Zur Größenidentifikation der Proteine wurde einer der Taschen immer ein Marker zugefügt, der ein Gemisch aus Proteinen bekannter Größe enthielt [PPL (*prestained protein ladder*), Fermentas, St. Leon-Rot]. Nach der Auftrennung erfolgte der Transfer der Proteine auf Nitrozellulosemembranen (siehe 2.9).

2.9 Westernblotting und Immundetektion von Proteinen

Um die nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine näher untersuchen zu können, wurden sie durch Stromfluss im halbtrockenen Verfahren zunächst von dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond-C extra, Amersham, Braunschweig) übertragen (Towbin et al., 1979). Hierzu wurden zwischen zwei Graphitelektroden einer Mini-Transblot-Kammer (Biorad) drei mit Transferpuffer [25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol] angefeuchtete Filterpapiere positioniert. Darauf wurden von unten nach oben die Nitrozellulosemembran, das Gel sowie nochmals drei feuchte Filterpapiere angeordnet. Über die Elektroden wurde ein Stromfluss von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gelfläche über 90 min eingestellt, um die Proteine auf die Membran zu übertragen.

Die Detektion spezifischer Proteine auf der Membran erfolgte mittels Erstantikörper gegen Epitope des jeweiligen Proteins und Zweitantikörper gegen den Fc-Teil des Erstantikörpers.

Um eine Absättigung noch vorhandener hydrophober Bindungsstellen an den Proteinen zu erreichen, wurde die Membran direkt nach dem Elektrotransfer für 30 min in 5% (w/v) Magermilch in PBS mit 0,05% (v/v) Tween 20 inkubiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe des entsprechenden Erstantikörpers für 16 h bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen mit PBS + 0,05% Tween 20 wurde die

Membran für 1 h bei RT mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltem Zweitantikörper inkubiert.

Zur Sichtbarmachung des gebundenen Zweitantikörpers wurde die ECL (*enhanced chemiluminescence*)-Methode verwendet (Whitehead et al., 1979). Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS + 0,05% Tween 20 wurde die Membran in einem 1:1 Verhältnis der ECL-Lösungen I und II zur Initiierung der Peroxidasereaktion geschwenkt. Das Meerrettich-Peroxidase-Enzym des Zweitantikörpers katalysiert die Oxidation des in der ECL-Lösung I vorhandenen Luminols, das in Gegenwart von H₂O₂ (ECL-Lösung II) in ein lichtemittierendes Carbonyl umgewandelt wird.

In einer Dunkelkammer wurde die Membran in eine lichtundurchlässige Röntgenkassette gelegt, mit einem Röntgen-Detektionsfilm bedeckt und je nach Intensität des ECL-Signals entsprechend lange belichtet. Danach wurde der Röntgenfilm für 1 min in der Entwicklerlösung gebadet, kurz in Aqua dest. geschwenkt und daraufhin für 1 min in die Fixierlösung verbracht. Anschließend erfolgte die Trocknung, Digitalisierung und Auswertung.

2.10 Messung der Aktivität von Rho-GTPasen mit Pulldown-Versuch

Hierbei wurden Reagenzien des Herstellers Upstate (Lake Placid, USA) nach den entsprechenden Vorgaben verwendet. Das Prinzip besteht in der Abtrennung der aktiven Form der GTPase von der inaktiven, da verfügbare Antikörper nicht zwischen den beiden Zuständen unterscheiden können. Wichtigstes Reagens ist ein Fusionsprotein aus der Bindungsdomäne eines Effektormoleküls der entsprechenden GTPase und eines Glutathion-S-Transferase (GST)-Abschnitts, über den es an Glutathion-Agarose gekoppelt ist. Als Effektor-Domäne wurde bei dem Rho-Aktivierungsversuch Rhotekin verwendet, während bei der Variante für Rac 1 und Cdc42 die Bindungsdomäne von Pak1 zum Einsatz kam. Die so konjugierte Agarose bindet spezifisch die aktive, GTP-gebundene Form der GTPase. Diese kann nach Zentrifugation, Verwerfen des Überstandes und Elution von der Agarose durch SDS-Puffer mittels Western-Blot semiquantitativ dargestellt werden.

Konfluente HaCaT-Zellen wurden in T75-Flaschen unter verschiedenen Versuchsbedingungen mit Toxinen bzw. Pemphigus-IgG behandelt. Danach wurde das Medium abgesaugt und nach dreimaligem Waschen mit 10 ml eiskalten PBS 1 ml des Lysepuffers [bestehend aus dem Assay-Puffer, 0,5% (w/v) Natriumdesoxycholat, 0,1% (w/v) SDS sowie Proteaseinhibitoren (Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin, jeweils 20 µg/ml)] für 10 min auf Eis zugegeben. Die Zellen wurden mit einem Schaber vom Flaschenboden abgelöst, zusammen mit dem Lysepuffer in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und für 5 min bei 4°C und 14.000 g zentrifugiert. Der entstehende Überstand wurde auf die Agarose überführt und die Reaktionsgefäße für 45 min bei 4°C auf dem Drehrad gelagert. Mit einem Teil des Überstandes wurde die enthaltene Menge Gesamtprotein durch das Bradford-Verfahren ermittelt.

Nach dem Anlagern von GTP-gebundener GTPase an die Agarose wurde nach dreimaligem Waschen mit dem Lysepuffer das Agarose-Pellet in 10 µl SDS-Puffer für die Auswertung mittels Western-Blot aufgenommen. Dieser wurde analog Punkt 2.8 und 2.9 unter Verwendung eines 15%-Agarosegels durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, pro Spur jeweils die gleiche Proteinmenge aufzutragen. Die anschließende Immundetektion der GTPase erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Rho A, Rac 1 bzw. Cdc42.

2.11 Proteinextraktion

Diese Methode wurde verwendet, um die Menge an Dsg 3, die an das Zytoskelett gebunden vorliegt, getrennt von derjenigen beurteilen zu können, die sich im zytoplasmatischen Kompartiment bzw. frei in der Zellmembran befindet. Hierzu wurden HaCaT-Zellen in 60 mm-Petrischalen bis zur Konfluenz gehalten. Nach Inkubation unter den jeweiligen Versuchsbedingungen wurde den Schalen Extraktionspuffer [1% (w/v) Triton X-100, 10 mM Tris, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2 mM EGTA, jeweils 20 µg/ml Leupeptin, Pepstatin und Aprotinin, 1 mM PMSF] für 10 min auf Eis zugegeben. Danach wurden die Zellen mit einem Schaber vom Boden der Schalen gelöst, in Reaktionsgefäße überführt und für 30 min bei 4°C und 14.000 U/min zentrifugiert. Der Triton-lösliche Überstand enthielt die nicht zytoskelettal gebunden Proteine und wurde mit dreifach konzentriertem SDS-Puffer versetzt. Das Sediment mit den

restlichen Proteinen, also auch den am Zytoskelett verankerten Desmogleinen, wurde in SDS-Puffer für 5 min bei 95°C gelöst. Beide Fraktionen wurden in einem 7,5%-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot auf ihren jeweiligen Gehalt an Dsg 3 hin überprüft.

2.12 Laserpinzette

Mit der Laserpinzette wurden die Veränderungen der Desmocadherin-vermittelten Adhäsion auf HaCaT-Zellen unter Behandlung mit Pemphigus-IgG sowie mit bakteriellen Toxinen zur Aktivierung bzw. Inhibierung von Rho-GTPasen gemessen.

2.12.1 Beschichtung der Protein-A-Mikroperlen mit den Dsg-Fc-Konstrukten

Für die Versuche mit der Laserpinzette wurden Protein-A-beschichtete Polystyrenperlen (\varnothing 2,8 μm , Dynal Biotech, Norwegen) mit den Dsg-Fc-Konstrukten gekoppelt. Durch Aufbringen dieser Mikroperlen auf die Oberfläche von HaCaT-Zellen entstanden artifizielle Zell-Mikroperlen-Kontakte. Innerhalb dieser Kontaktflächen ließ sich Dsg 1, Dsg 3 und Plakoglobin nachweisen, allerdings keine vollständigen Desmosomen (Waschke et al., 2005).

Nach dreimaligem Waschen der Mikroperlen mit Puffer A (0,1 M Na-Phosphat pH 8,1) erfolgte die Bindung von 5 μg des jeweiligen Dsg-Fc-Konstruktes an Protein A für 16 h bei 4°C in Puffer A bei sanfter Rotation, um Aggregationen der Perlen zu vermeiden. Die Quervernetzung der Konstrukte mit Protein A wurde nach dreimaligem Waschen mit Puffer A sowie dreimaligem Waschen mit Puffer B (0,1 M Na-Borat pH 9,0) mit 4,15 μl DMP in 95,85 μl 0,1 M Na-Borat pH 8,5 bei RT für 45 min durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen mit Puffer C (0,2 M Ethanolamin pH 8,0) erfolgte die Absättigung der Mikroperlen in Puffer C über 120 min bei RT. Die beschichteten Mikroperlen wurden nach Austausch des Ethanolamins durch HbSS auf dem Drehrad bei 4°C gelagert.

2.12.2 Prinzip der Laserpinzettentechnik

Die Technik der Laserpinzette wurde erstmals 1970 eingeführt (Ashkin, 1997) und als optische Falle bezeichnet. Hierbei macht man sich zunutze, dass energiereiches gebündeltes Licht auf stark lichtbrechende runde Partikel, deren Durchmesser deutlich größer als die Wellenlänge des Lichts ist, zweierlei Kräfte ausübt: Einerseits den vertikal einwirkenden Strahlungsdruck der Photonen, der den Partikel bei von unten einwirkendem Laserlicht vom Untergrund abhebt und andererseits durch die Brechung des Lichts horizontal wirkende Kraftkomponenten, die ihn in die Mitte des Lichtstrahls hineinziehen. Dadurch wird der Partikel innerhalb des Strahls in drei Dimensionen fixiert und lässt sich durch Auslenkung des Lichtbündels bzw. durch Bewegung der darunterliegenden Zellschicht in seiner Position verändern.

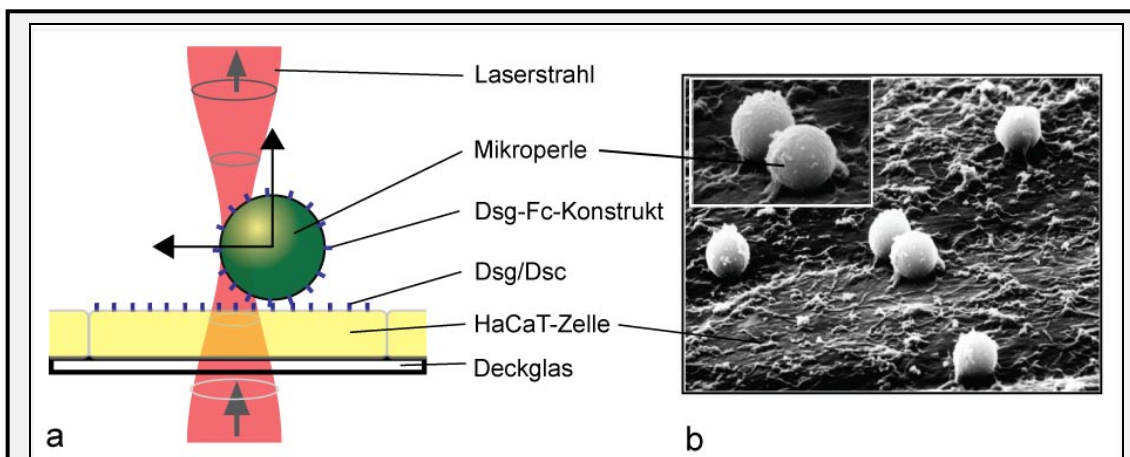


Abb. 4: Schema der Laserpinzette

Ein von unten durch eine auf Deckgläsern gewachsene Einzelzellschicht von HaCaTs geleiteter Laserstrahl übt horizontal und vertikal wirkende Kräfte auf sich an der Oberfläche befindende Mikroperlen aus (a). Durch ihre Dsg-Beschichtung waren die Perlen prinzipiell in der Lage, homo- oder heterophil an Desmocadherine auf der Zelloberfläche zu binden, weitere desmosomale Proteine zu rekrutieren und somit den durch den Laser vermittelten Kräften zu widerstehen. Das Rasterelektronenmikroskop zeigte von der Zelloberfläche ausgehende Ausläufer an den Mikroperlen, die den ausgebildeten Adhäsionskontakten entsprechen könnten (b, modifiziert nach Waschke et al., 2005).

Für alle Versuche wurden HaCaT-Zellen auf Deckgläsern (\varnothing 24 mm) im Verhältnis 1:3 ausgesät und bis zum Erreichen von Konfluenz in DMEM im Brutschrank kultiviert.

Die Laserpinzette ist ein Eigenbau des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Universität Würzburg (Baumgartner et al., 2003). Der Strahl eines Nd:Yag-Lasers (1064 nm Wellenlänge) wird über ein Linsensystem über die hintere Apertur des Objektivs (100x1.3, Öl, Carl Zeiss Microimaging, Oberkochen) eines Mikroskops (Axiovert 135, Carl Zeiss Microimaging) geleitet und auf eine Leistung von 42 mW eingestellt. Mittels einer Kamera wurde das Bild auf einen Computermonitor übertragen, um eine Exposition des Auges mit dem Laserlicht zu verhindern. Ein Piezoelement, auf dem das Deckglas mit den Zellen befestigt war, ermöglichte über ein Steuergerät eine präzise Bewegung der Zellen in allen drei Achsen relativ zum Laserstrahl.

2.12.3 Durchführung der Versuche mit der Laserpinzette

Jedes beim Versuch verwendete Deckgläschen wurde mit 190 µl DMEM und 10 µl Mikroperlen-Suspension bedeckt und für 30 min bei 37°C gelagert, damit die beschichteten Perlen auf die Zelloberfläche sinken und Kontakte ausbilden konnten. Daraufhin exponierte man die Perlen dem Licht des Lasers. Ließen sich die Perlen dadurch aus der fokalen Ebene herauslösen und horizontal bewegen, so wurden sie als „ungebunden“ gewertet, gelang dies nicht, wurden sie als „fest“ gewertet. Insgesamt wurden pro Deckglas 100 Perlen auf diese Weise in multiplen Gesichtsfeldern ausgezählt und die Anzahl gebundener Perlen als 100% definiert.

Danach erfolgte die eigentliche Behandlung mit dem Antikörper-Gemisch der Pemphigus- bzw. Kontrollpatienten und/oder den Toxinen für die angegebene Konzentration und Zeit bei 37°C, woraufhin die erneute Auszählung von 100 Perlen erfolgte. Die Anzahl der nicht verschiebbaren Perlen wurde mit derjenigen vor Beginn des Experiments verglichen. Der erhaltene Prozentwert ist ein Maß für die reduzierte bzw. gesteigerte Bindungsfähigkeit der Desmocadherine.

2.13 ex vivo-Hautmodell

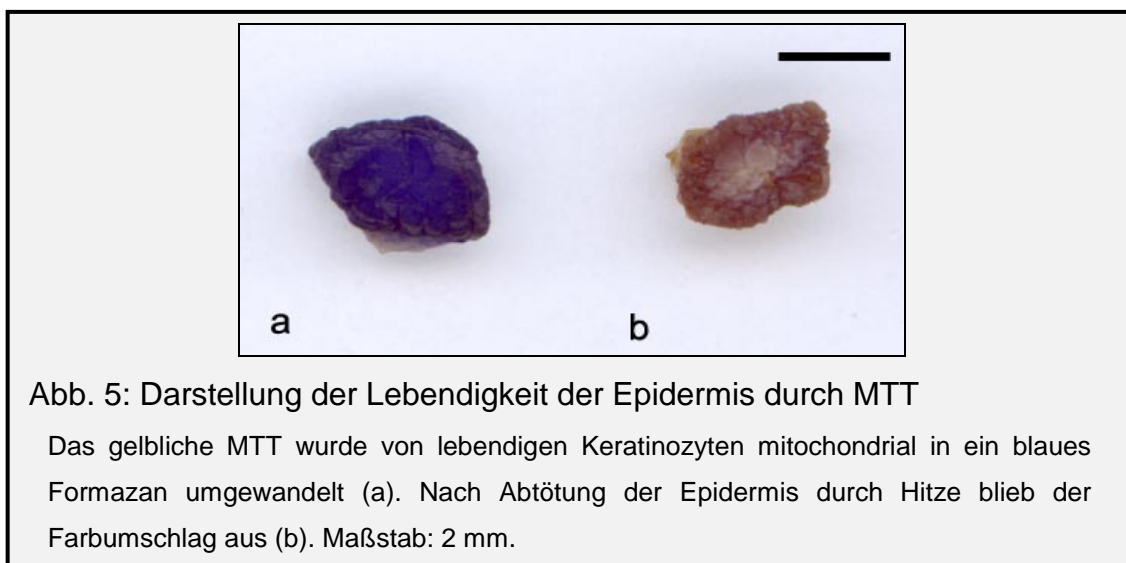
Von den Leichen frisch verstorbener Körperspender (Todeszeitpunkt maximal 16 h zuvor) wurden von verschiedenen Stellen der Körperoberfläche ein ca. 8x8 cm großes Stück der Haut ohne subkutanes Fett entfernt (Tab. 5). Diesen

Hautlappen unterteilte man in ca. 3x3 mm große Stücke, die dann unter den verschiedenen Versuchsbedingungen in Kulturmedium (DMEM mit 10% FCS und 50 U/ml Penicillin G/50 µg Streptomycin) bei 37°C im Brutschrank in den Vertiefungen einer 96-Loch-Platte inkubiert wurden.

Tab. 5: Daten der Körperspender

Lfd. Nr.	Geschlecht	Geburtsdatum	Alter	Entnahmeort
31/04	weiblich	19.11.1916	88	Oberschenkel
32/04	weiblich	31.03.1916	88	Schulter
02/05	männlich	14.02.1930	75	Oberschenkel
11/05	männlich	09.05.1932	72	Oberschenkel
19/05	männlich	03.11.1911	93	Oberschenkel
21/05	weiblich	08.11.1920	84	Schulter
33/05	männlich	02.11.1912	93	Oberschenkel

Die Vitalität der Epidermis wurde vor und nach Inkubation mit 3-[4,5-Dimethyldiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolimbromid (MTT, Sigma Aldrich) überprüft. Das gelbliche MTT wird von mitochondrialen Dehydrogenasen zu einem blauen Formazan reduziert (Abb. 5a). Als Negativkontrolle diente abgetötete Dermis (65°C, 30min; Abb. 5b).



Nach der Inkubation unter den verschiedenen Bedingungen wurden die Hautstücke aus den Vertiefungen der 96-Loch-Platten in Kupferschälchen

überführt, dort in Reichert-Jung-Medium (Cambridge Instruments, Nußloch) eingebettet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Mittels eines Cryostats (Reichert-Jung 2800 Frigocut; Cambridge Instruments) wurden 5 µm dicke Schnitte der Hautproben angefertigt. Nach jedem Schnitt wurden mindestens 50 µm verworfen und der nächste Schnitt mikroskopisch auf epidermale Spalten überprüft. Hierdurch ließ sich sicherstellen, dass keine Spalte mehrmals angeschnitten wurde. Die Schnitte wurden auf Objektträger überführt und bei 37°C mit Aceton für eine Minute fixiert und permeabilisiert. Danach erfolgte die immunzytochemische Markierung mit Antikörpern gegen Dsg 1 und 3 analog 2.6.

Um dünnere Schnitte zu erhalten, wurde bei einem Teil der Proben eine Einbettung in Epoxydharz (Epon-Glycidether) vorgenommen. Hierzu fixierte man das Hautstück in 2% Formalin (frisch angesetzt aus PFA) für 60 min. Nach dreimaligem Waschen mit Aqua dest. für 15 min wurden die Proben mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Den Hautstücken wurde jeweils für 15 min eine 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96% sowie zweimalig 100% Ethanollösung zugefügt. Danach erfolgte die Inkubation in Propylenoxid für zweimalig 30 min. Für 16 h wurden dann die Proben mit einem 1:1-Gemisch aus Propylenoxid und Epon-Glycidether inkubiert. Nach Verdampfen des Propylenoxids erfolgte die Überführung in reines Epon für zweimal jeweils 120 min. Danach wurden die Proben in Epon in kleinen Trägern eingebettet und das Harz in einem Ofen über 48h bei 65°C ausgehärtet. Mit einem Ultramikrotom (Ultracut E; Reichert-Jung, Cambridge Instruments) wurden Semidünnschnitte (1 µm Dicke) angefertigt und mit Toluidinblau gefärbt. Zur Immunfärbung einiger dieser Schnitte wurde zuvor das Epon herausgelöst. Dies erfolgte durch Behandlung mit Natriummethalonat [55% (v/v) 5,4 M Natriummethoxid (Sigma-Aldrich), 22,5% (v/v) Methanol, 22,5% (v/v) Toluol] für 5 min, gefolgt von einem 1:1-Gemisch aus Methanol und Toluol für 5 min und zweimalig Aceton für 5 min. Nach waschen mit Aqua dest. und PBS für jeweils 5 min wurden die Proben analog 2.6 mit Antikörpern zur Immunfluoreszenz-Darstellung markiert.

2.14 Auswertung des Bild- und Datenmaterials

Alle gezeigten Abbildungen wurden mit einem Laserkonfokalmikroskop (LSM 510, Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena) mittels eines 40x NA 1.3 oil plan-Neofluar- und eines 63x NA 1.4 oil plan-Apochromat-Objektives (Carl Zeiss Microimaging GmbH) angefertigt. Die Begutachtung und initiale Bearbeitung wurde mit dem Programm Zeiss LSM Image Browser 2.80.1123 durchgeführt. Für die Weiterverarbeitung und Zusammenstellung der Bilder wurde Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems, San Jose, USA) verwendet. Die Schemazeichnungen wurden mit Adobe Illustrator CS3 (Adobe Systems) angefertigt.

Zur Auswertung der Hautschnitte wurden diese an einem Mikroskop (Axioskop 2 mot plus) über das Objektiv 1,25x Plan Neofluar (beides Carl Zeiss Microimaging) mit einer digitalen Kamera (HRP-100, Diagnostic Instruments Inc., Sterling Heights, USA) aufgenommen und die Länge der Spalten mit dem Programm Spot Advanced 4.6 (ebenfalls Diagnostic Instruments Inc.) gemessen.

Die Auswertung der entwickelten Western-Blots erfolgte durch Grauwertanalyse mit Adobe-Photoshop CS3. Nach Abziehen eines Leerwertes eines ungeschwärzten Teilstücks des Röntgenfilmes konnten so die Intensitäten verschiedener Banden miteinander verglichen werden.

Die statistischen Auswertungen wurden nach Beratung durch einen Statistiker mit dem Programm SigmaStat 3.5 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) durchgeführt. Eine Signifikanz wurde ab einem p-Wert $< 0,05$ angenommen. Für die Auswertungen der Laserpinzettenversuche wurde nach Überprüfung der Messwerte auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnoff-Test der zweiseitige, gepaarte Student's t-test verwendet (Abb. 10, 18). Die Auswertung der Ergebnisse der Hautschnittlängen wurde mit einem zweiseitigem, ungepaarten Student's t-test durchgeführt und das Signifikanzniveau Bonferroni-korrigiert (Abb. 15). Die Densitometrien der Pulldown-Versuche (Abb. 19-21) wurden mittels eines „ANOVA on ranks“-Tests auf Signifikanz überprüft (Kruskal-Wallis einfaktorielle Varianzanalyse, gefolgt von einem Paarvergleich mittels der Methode nach Student-Newman-Keuls).

3 Ergebnisse

3.1 Bedeutung der Rho-GTPasen für die Integrität der Epidermis

Um einen Eindruck von der Verteilung von Rho-GTPasen in menschlicher Epidermis zu gewinnen, wurden Hautschnitte gegen die Rho-GTPasen Rho A und Rac 1 immungefärbt. Es zeigte sich, dass in den unteren Epidermisschichten die Rho A-Immunfärbung hauptsächlich entlang der Plasmamembran auftritt, während sie in den oberflächlicheren Schichten geringer und diffuser sichtbar ist (Abb. 6a). Im Gegensatz dazu dominiert Rac 1 vor allem in den oberflächlichen Schichten (Abb. 6c). Die Aktinfärbung diente der Darstellung der gesamten Epidermis (Abb. 6b, d).

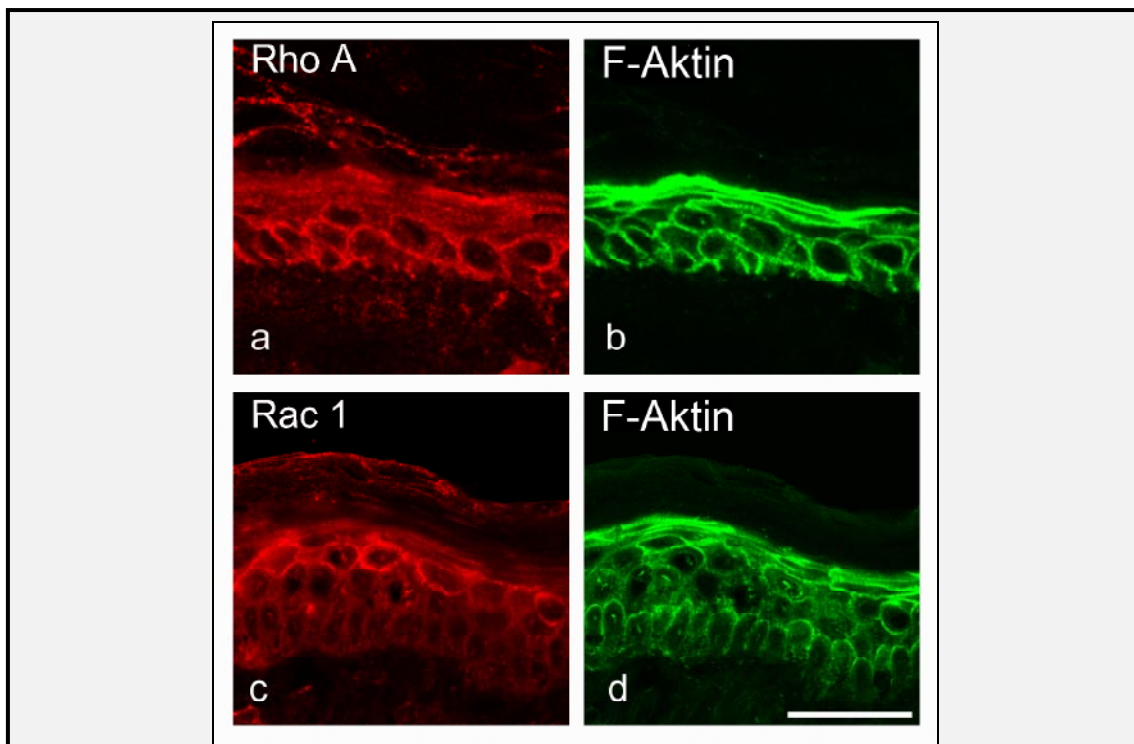


Abb. 6: Verteilung von Rho A und Rac 1 in menschlicher Epidermis

Immunfärbung gegen Rho A (a), Rac 1 (c), korrespondierende Darstellung von F-Aktin zur Abbildung der ganzen Epidermis (b, d). Rho A ist im Stratum basale und Stratum spinosum überwiegend entlang der Zellgrenzen lokalisiert während Rac 1 sich hauptsächlich in den oberflächlicheren Schichten darstellen lässt. Maßstab: 50 μm . n = 3.

Als nächster Schritt wurde anhand des *ex vivo*-Hautmodelles untersucht, ob Rho-GTPasen für die Integrität der Epidermis wichtig sind. Hierzu erfolgte die Zugabe von Toxin B (800ng/ml, 24h) zu in DMEM getauchten Hautstücken zur Inhibition aller drei GTPasen Rho A, Rac 1 und Cdc42.

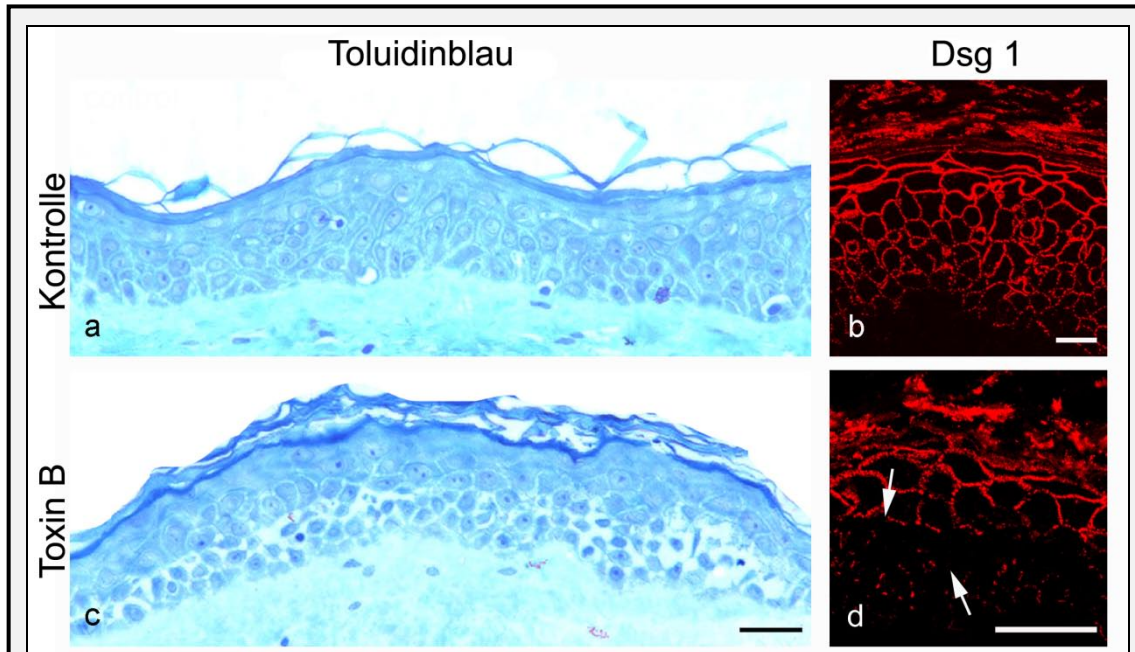


Abb. 7: Effekte von Toxin B in menschlicher Epidermis

Semidünnschnitte menschlicher Epidermis. Im Vergleich zur Kontrolle (a) führte die Inhibition der GTPasen Rho A, Rac 1 und Cdc42 zur suprabasalen Zelldissoziation (c). Die Färbung von Dsg 1 zeigte im Vergleich zur Kontrolle eine Fragmentation sowie einen teilweisen Verlust des Desmocadherins in tieferen Schichten der Epidermis (Pfeile in d). Maßstab: 100 μm (a, c) sowie 20 μm (b, d)

Hierbei zeigte sich im Toluidinblau-gefärbten Semidünnschnitt-Präparat im Vergleich zur Kontrolle eine Dissoziation der Keratinozyten im Stratum basale und dem unteren Stratum spinosum, erkennbar durch eine deutliche Verbreiterung der Interzellularspalten (Abb. 7a, c). Färbte man diese Hautstücke mit Antikörpern gegen Dsg 1, so erkannte man unter Kontrollbedingungen die von superfiziell nach basal hin abnehmende Dsg 1-Verteilung (Abb. 7b). Die kontinuierliche Dsg 1-Darstellung veränderte sich unter Inkubation mit Toxin B und zeigte eine Fragmentation sowie abschnittsweise völligen Verlust der Färbung (Abb. 7b, d). Dies trat vor allem in den tieferen Schichten der Epidermis auf. Inkubation der Hautstücke mit LT zur

alleinigen Inhibition von Rac 1 führte zu keiner sichtbaren Veränderung im Vergleich zur Kontrolle (nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnte in diesen Versuchen gezeigt werden, dass die Verteilung membrangebundener GTPasen in der Epidermis unterschiedlich ist, mit einer Dominanz von Rho A basal und von Rac 1 oberflächlich. Eine Inhibition von Rho-GTPasen resultierte in einer Zelldissoziation suprabasal und Verlust von Dsg 1-Färbung in diesem Bereich. Dadurch wird angedeutet, dass Rho-GTPasen eine Rolle bei epidermaler Keratinozytenadhäsion spielen und diese GTPasen Einfluss auf die Integrität der Epidermis nehmen. Hierbei schienen die Effekte hauptsächlich durch Rho A vermittelt zu werden.

3.2 Einfluss der Rho-GTPasen auf die Zelladhäsion in kultivierten Keratinozyten

Um detaillierter den Einfluss von Rho-GTPasen auf die Adhäsion von Keratinozyten untersuchen zu können, wurden die folgenden Versuche mit HaCaT-Zellen durchgeführt. Die Verwendung erfolgte ab dem Zeitpunkt, an dem sich ein konfluenter, einschichtiger Zellrasen ausgebildet hatte. Dieser wurde mit Toxinen zur Inhibierung bzw. Aktivierung von Rho-GTPasen inkubiert.

Unter Kontrollbedingungen zeigte sich eine lineare, kortikal betonte F-Aktin-Lokalisierung mit nur wenigen die Zelle durchspannenden Aktinfilamentbündeln. Dsg 3 war vor allem membranständig lokalisiert. (Abb. 8a-c). Nach Inhibition von Rho A durch C2INC3 (300 ng/ml, 180 min, d-f) verminderte sich diese randbetonte Dsg 3-Lokalisation zugunsten einer vermehrten perinukleären Anordnung. Auch das Aktinzytoskelett zeigte starke Veränderungen. Eine mehr granuläre zytoplasmatische Lokalisation von F-Aktin ersetzte den kortikalen Aktinring. Zwischen den Zellen bildeten sich Lücken (Pfeile), die teilweise noch von Zellausläufern überspannt wurden. Ein ähnliches Bild bot sich nach Inaktivierung von Rac 1 mittels LT (300 ng/ml, 180 min, g-i).

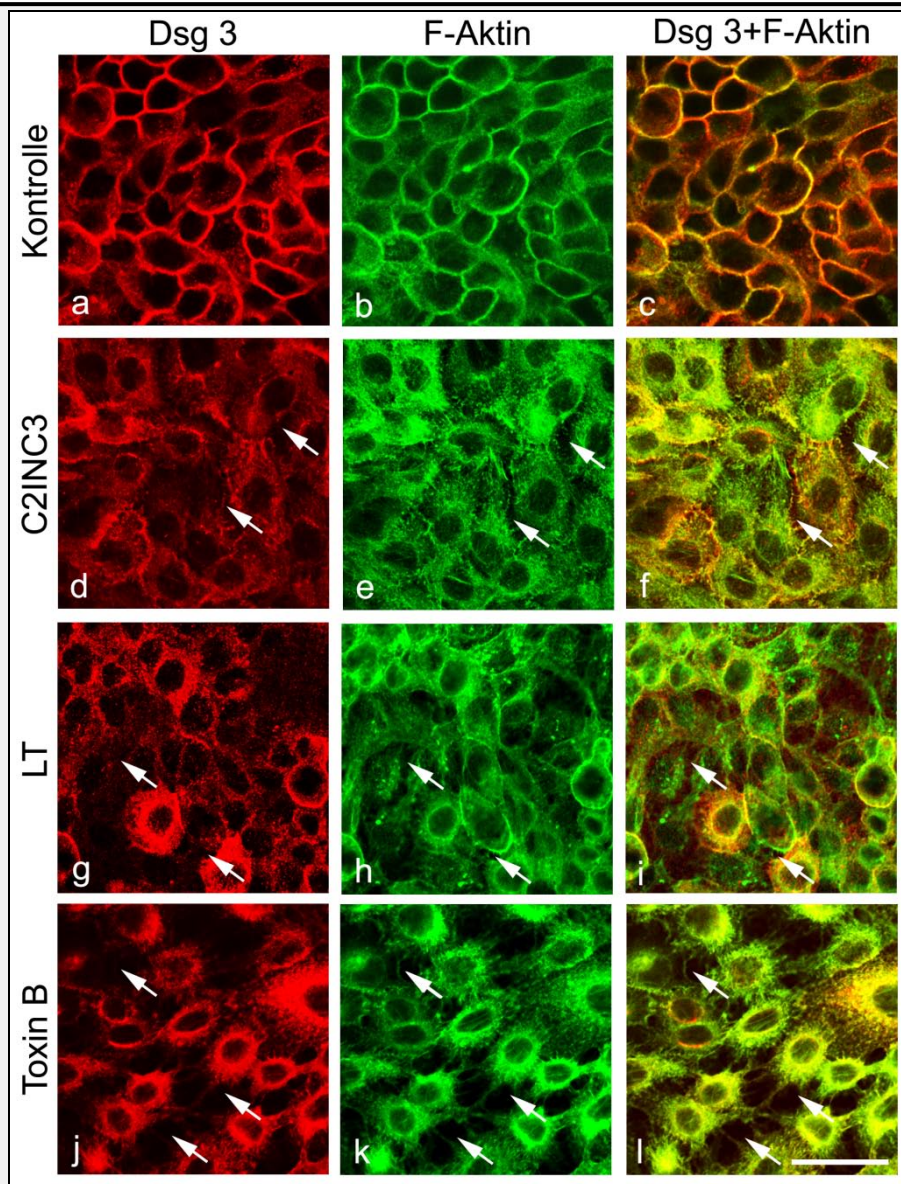


Abb. 8: Effekte durch Inhibition von Rho-GTPasen in HaCaT-Zellen

Darstellung der Desmosomen durch Immunfärbung mit Dsg 3, der Zellgrenzen durch Färbung von F-Aktin mit Phalloidin. Im Gegensatz zur Kontrolle (a-c) führte die Inhibition von Rho A mit C2INC3 (d-f) sowie Rac 1 mit LT (g-i) zu einem Verlust der membrangebundenen Dsg 3-Darstellung und zu Lückenbildung zwischen den Zellen. Die Effekte waren noch stärker ausgeprägt bei Inhibition der drei GTPasen Rho A, Rac 1 und Cdc42 zusammen durch Toxin B (j-l). Maßstab: 20 μm , n = 5.

Die Effekte nach Inhibition aller drei GTPasen Rho A, Rac 1 und Cdc42 durch Toxin B (200 ng/ml, 180 min) waren noch deutlich ausgeprägter als nach Inhibition von Rho A bzw. Rac 1 alleine. Sie führte zu einer massiven

Zelldissoziation und einem nahezu vollständigen Verlust des membrangebundenen Dsg 3 (j-l).

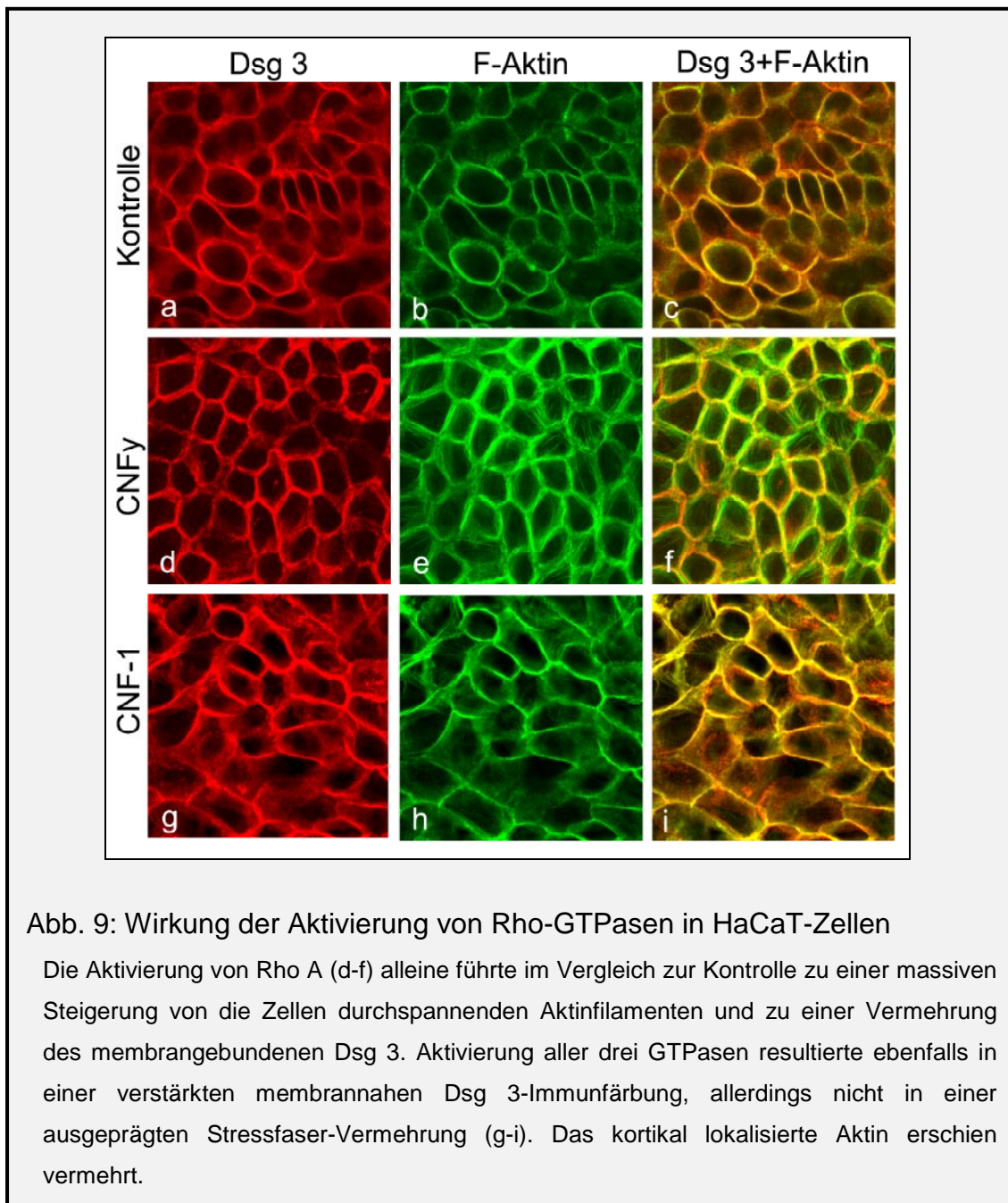


Abb. 9: Wirkung der Aktivierung von Rho-GTPasen in HaCaT-Zellen

Die Aktivierung von Rho A (d-f) alleine führte im Vergleich zur Kontrolle zu einer massiven Steigerung von die Zellen durchspannenden Aktinfilamenten und zu einer Vermehrung des membrangebundenen Dsg 3. Aktivierung aller drei GTPasen resultierte ebenfalls in einer verstärkten membrannahen Dsg 3-Immunfärbung, allerdings nicht in einer ausgeprägten Stressfaser-Vermehrung (g-i). Das kortikal lokalisierte Aktin erschien vermehrt.

Um die Effekte einer gesteigerten Aktivität von Rho-GTPasen zu untersuchen, wurden die bakteriellen Toxine CNFy (600ng/ml, 360 min) zur Aktivierung von Rho A alleine und CNF-1 (300ng/ml, 120 min) zur Aktivierung von Rho A zusammen mit Rac 1 und Cdc42 verwendet. Hier zeigte sich im Gegensatz zur Kontrolle (Abb. 9a-c) bei Aktivierung von Rho A (d-f) eine deutliche Vermehrung von Aktinfilamentbündeln. Die Bildung dieser Stressfasern genannten

Strukturen wird durch Rho A vermittelt. Auch die kortikale Anordnung von F-Aktin wurde durch Aktivierung von Rho A verstärkt. In der Dsg 3-Immunfärbung zur Darstellung der Desmosomen war eine stärkere Immunreaktivität im Bereich der Plasmamembran sichtbar. Die Effekte bei Aktivierung aller drei GTPasen (g-i) auf die desmosomalen Cadherine waren ähnlich. Auch hier ließ sich eine vermehrte Linearisierung von Dsg 3 entlang der Zellgrenzen erkennen. Die Induktion von Stressfasern war allerdings nicht so deutlich ausgeprägt wie durch die Aktivierung von Rho A alleine. Es ließ sich aber ebenfalls eine Verstärkung des kortikal lokalisierten Aktinzytoskeletts feststellen.

Die Immunfärbungen zeigten, dass Rho-GTPasen in HaCaT-Zellen die Lokalisation von Desmocadherinen beeinflussen. Eine Aktivierung resultierte in einer vermehrten Verteilung entlang der Zellgrenzen, während eine Inhibition zu Zelldissoziation, Verlust von junctional lokalisierten Desmogleinen und deren vermehrter perinukleärer Anordnung führte.

3.3 Rolle der Rho-GTPasen in der Regulation der durch Desmogleine vermittelten Adhäsion

Hierzu wurden mit einem Dsg-Fc-Konstrukt beschichtete Mikroperlen auf einen konfluenten Rasen von HaCaT-Zellen gegeben. Dort konnten die Mikroperlen spezifische Bindungen mit Desmocadherinen der Zelloberfläche ausbilden. Die Adhäsion dieser Mikroperlen auf der Zelloberfläche wurde durch optische Manipulation mit der Laserpinzette untersucht. Die Anzahl der nicht durch einen Laserstrahl verschieblichen Mikroperlen war, normalisiert auf die Kontrolle, ein Maß für die Desmocadherin-vermittelte Adhäsion.

Nach Inkubation der HaCaT-Zellen mit CNF-1 (300 ng/ml, 120 min) stieg die Dsg 1-vermittelte Adhäsion auf $118 \pm 6\%$ der Kontrolle (Abb. 10). Auch eine Behandlung mit CNF γ (600ng/ml, 360 min) führte zu einem Anstieg der Adhäsion auf $122 \pm 5\%$. Die Inhibition von Rho A durch C2INC3 (300ng/ml 180 min) alleine resultierte in einer verringerten Haftung der Mikroperlen auf $52 \pm 5\%$. Nach Inhibition von Rac 1 via LT (300ng/ml, 180 min) sank die Adhäsion auf $68 \pm 6\%$. Bei einer Hemmung aller drei GTPasen zeigte sich eine auf $77 \pm 4\%$ verminderte Haftung. Die Effekte der verschiedenen Toxine im

Vergleich zur Kontrolle stellten sich alle signifikant dar. Aktivierung bzw. Inaktivierung der GTPasen mit den Toxinen zeigte im Falle von Dsg 3-beschichteten Mikroperlen Veränderungen der Adhäsion in ähnlichem Ausmaß wie bei Dsg 1-beschichteten Perlen (nicht dargestellt).

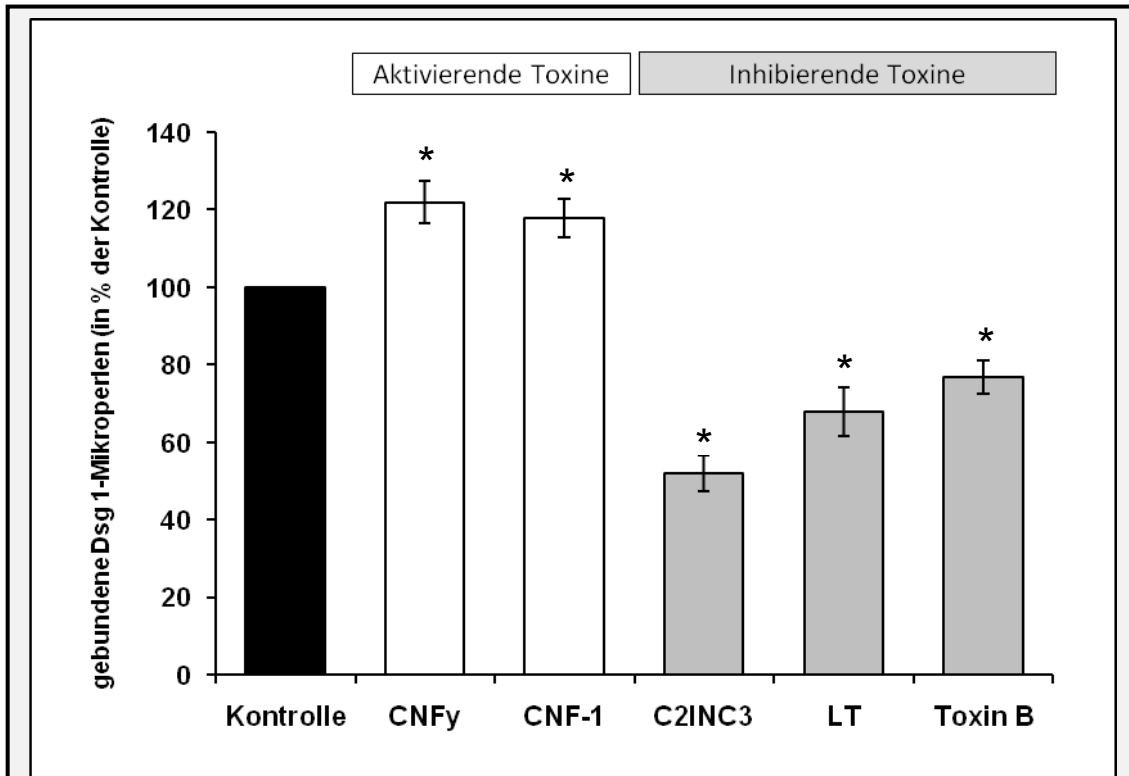


Abb. 10: Veränderungen der Dsg 1-vermittelten Adhäsion durch Rho-GTPasen-Modulation

Im Vergleich zur Kontrolle erhöhte sich die Anzahl gebundener Mikroperlen nach Inkubation mit aktivierenden Toxinen der Rho-GTPasen (CNFy, CNF-1). Bei Inhibition von Rho A (C2INC3), Rac 1 (LT) bzw. aller drei GTPasen (Toxin B) verringerte sich dagegen die Haftung. N = 6 für jede Bedingung, $p < 0,05$.

Zusammenfassend führte eine Aktivierung von Rho-GTPasen zu einer Zunahme der Haftung von mit Dsg 1 wie Dsg 3 beschichteten Mikroperlen, während eine Inhibition in einer Abnahme resultierte.

3.4 Wirkung von Pemphigus-IgG auf humane Epidermis *ex vivo*

Im nächsten Schritt wurde der Effekt von aufgereinigten IgG-Fractionen von Patienten mit Pemphigus im *ex vivo*-Modell hinsichtlich intraepidermaler Blasenbildung untersucht. Die Keratinozyten in der von Körperspendern

präparierten Epidermis waren stets noch vital, wie vor und nach jeder Inkubation durch MTT nachgewiesen wurde. Wie im H.E.-gefärbten Schnitt in Abb. 11 zu sehen, führte die Inkubation von Stücken menschlicher Haut mit PV-IgG (Abb. 11b) wie auch mit PF-IgG (c) über 24 h im Gegensatz zu Kontrollbedingungen (a) zu intraepidermaler Spaltbildung. Das *ex vivo*-Modell stellt also ein geeignetes Testsystem dar, um die Wirkung von Pemphigus-IgG an menschlicher Epidermis zu untersuchen.

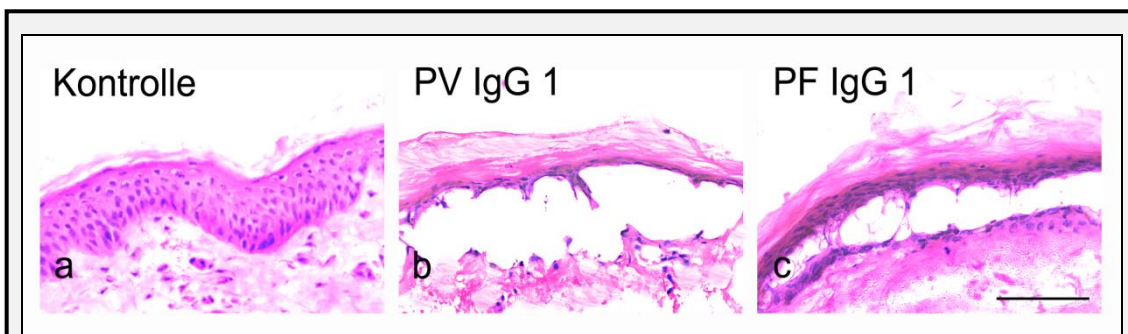


Abb 11: Wirkung von Pemphigus-IgG auf humane Epidermis (H.E.-Färbung)

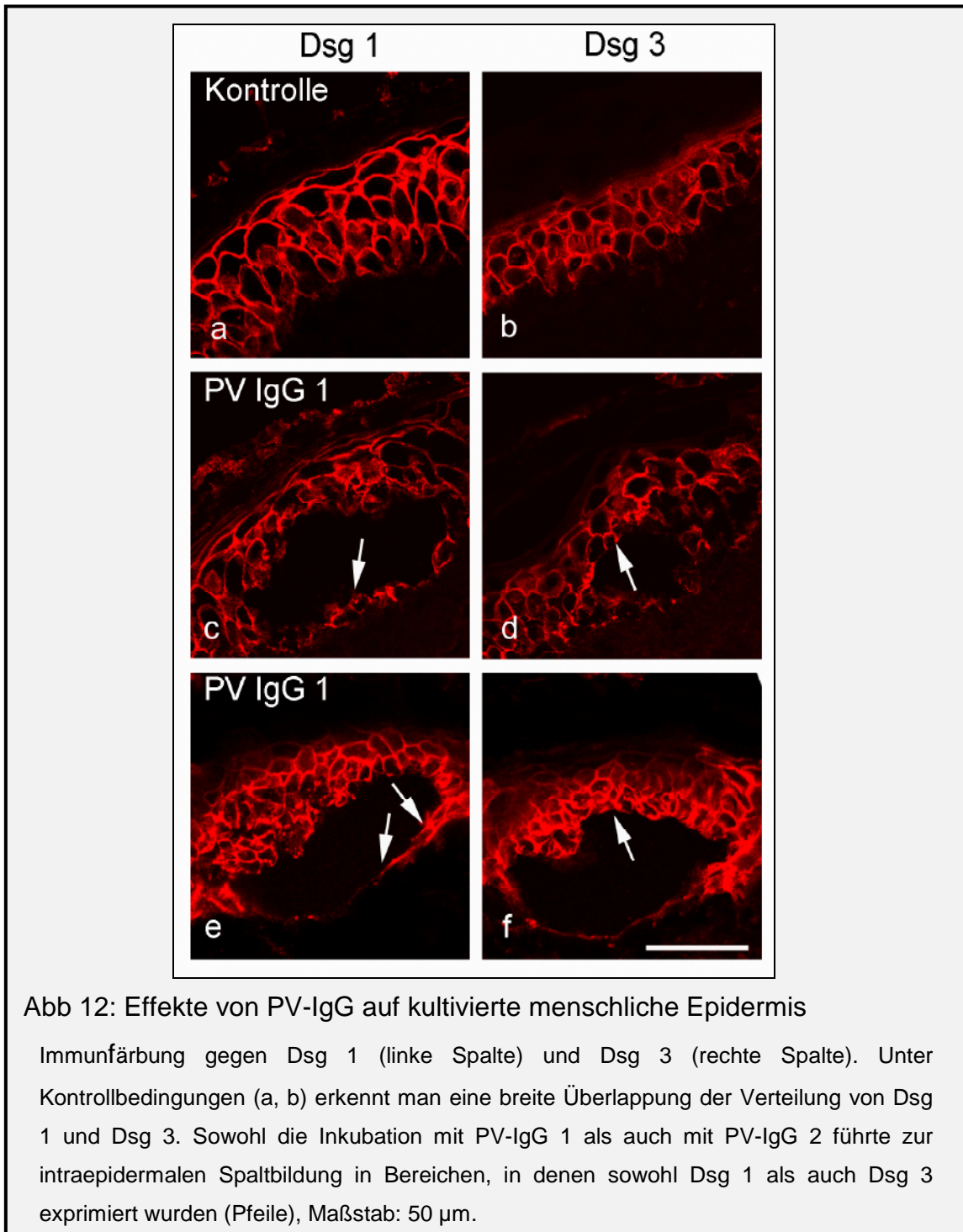
Im Gegensatz zu Kontrollbedingungen führte die Inkubation von Hautstücken von nicht an Pemphigus erkrankten Körperspendern mit PV-IgG (b) bzw. PF-IgG (c) zu intraepidermaler Spaltbildung. Die Spalten waren hauptsächlich in tieferen Schichten zu finden, auch nach Inkubation mit PF-IgG. Maßstab: 50 μ m.

Neben der Spaltbildung war auffällig, dass sich die Blasenbildung sowohl bei Inkubation mit PV-IgG wie auch mit PF-IgG überwiegend suprabasal darstellte. So waren bei PV-IgG 1 bzw. PV-IgG 2 87% und 86% der Lücken in tiefen Schichten der Epidermis lokalisiert und bei PF IgG 1 und PF-IgG 2 76% bzw. 64% (Tab 5).

Tab 5: Vertikale Lokalisation der Spaltbildung in der Epidermis

Behandlung	Anzahl Schnitte (n)	Spalten		
		Anzahl (n)	tief (%)	oberflächlich (%)
PV-IgG 1	57	23	87 %	13 %
PV-IgG 2	39	90	89 %	11 %
PF-IgG 1	63	68	76 %	24 %
PF-IgG 2	50	22	64 %	36 %

Um genauere Aussagen zur Lokalisation der Schnittbildung treffen zu können, wurden an den Präparaten auch Immunfärbungen zur Darstellung von Dsg 1 bzw. Dsg 3 vorgenommen. In den Kontrollen (Abb. 12a, b und 13a, b) erkennt man, dass die Verteilungsmuster von Dsg 1 und 3 eine breite Überlappung zeigten. Die Behandlung mit den beiden PV-IgG führte wieder zur intraepidermalen Blasenbildung (12c-f). Interessanterweise war sowohl ober- als auch unterhalb des Spaltes eine Immunreaktivität für Dsg 1 und Dsg 3 nachzuweisen (Pfeile). Die Blasenbildung fand also in Arealen statt, in denen sowohl Dsg 1 wie Dsg 3 vorhanden war.



Ähnliches ließ sich nach Inkubation mit zwei verschiedenen PF-IgG-Fractionen nachweisen, die durch Antikörper nur gegen Dsg 1 gekennzeichnet sind (Abb. 13c-f). Auch hier zeigte sich wie bei PV-IgG-Inkubation eine Spaltbildung in der tiefen Epidermis in der sowohl Dsg 1 wie Dsg 3 vorkommen (Pfeile).

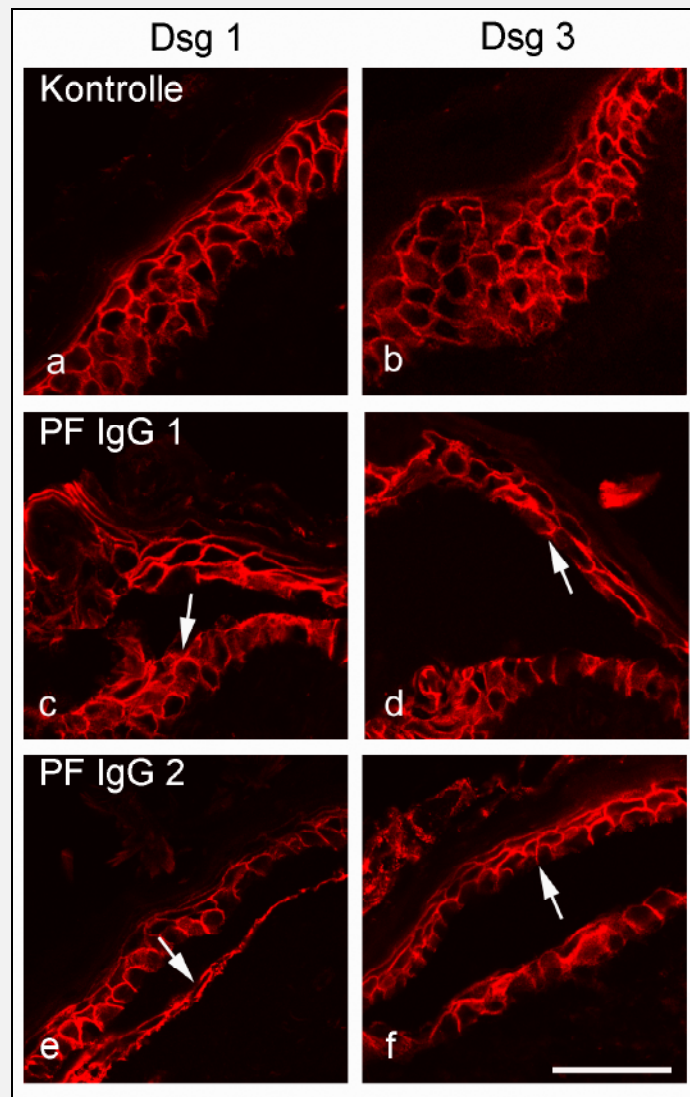


Abb. 13: Effekte von PF-IgG auf kultivierte menschliche Epidermis

Auch hier Färbung gegen Dsg 1 (linke Spalte) und Dsg 3 (rechte Spalte). Ähnlich den in Abb. 12 dargestellten Effekten von PV-IgG führte PF-IgG zu intraepidermaler Spaltbildung. Auch hier waren die Blasen kürzer als in der *in vivo*-Situation bei Pemphigus-Patienten und vorherrschend in tiefen Schichten der Epidermis lokalisiert. Die Spaltbildung fand hier ebenfalls in Bereichen statt, in denen sich sowohl Dsg 1 wie auch Dsg 3 nachweisen ließen (Pfeile). Maßstab 50 μ m.

Zusammenfassend führte die Inkubation von menschlicher Epidermis mit Pemphigus-IgG im *ex vivo*-Modell zu intraepidermaler Spaltbildung. Sowohl die Spalten bei PV- wie auch überraschenderweise bei PF-IgG bildeten sich

bevorzugt in Arealen, in denen sowohl Dsg 1 wie auch Dsg 3 nachweisbar waren.

3.5 Effekte der Aktivierung von Rho-GTPasen auf die durch Pemphigus- IgG vermittelte Akantholyse in humaner Epidermis ex vivo

Neben vielen Hinweisen durch andere Gruppen wurde auch in unserer Gruppe gezeigt, dass intrazelluläre Signalwege nötig sein müssen, um die Wirkung zumindest von PF-Autoantikörpern erklären zu können (Waschke et al., 2005). Rho-GTPasen sind bekannte Regulatoren des Aktinzytoskeletts, von Zelljunctionen und nehmen weitreichenden Einfluss auf eine Vielzahl von Signalkaskaden. Wie weiter oben dargelegt, erzeugte eine Inhibition von Rho-GTPasen eine Lückenbildung in humaner Epidermis sowie in Kultur von HaCaT-Zellen. Es lag daher nahe, die Wirkung von Rho-GTPasen im Zusammenhang mit der Pemphigus-Pathogenese näher zu untersuchen.

Hierzu erfolgte unter Verwendung des *ex vivo*-Modells die Zugabe von CNFy (2400 ng/ml) zur Aktivierung von Rho A oder von CNF-1 (1200 ng/ml) zur Aktivierung von Rho A, Rac 1 und Cdc42 zusätzlich zu Inkubation mit PV- und PF-IgG für 24 h. Hierbei zeigte sich eine deutliche Reduktion der durch PV- und PF-IgG induzierten Lückenbildung. Diese Reduktion wurde sowohl nach Aktivierung von Rho A alleine wie auch von Rho A, Rac 1 und Cdc42 zusammen beobachtet (Abb. 14).

Die statistische Auswertung zeigt Abb. 15. Für jede Bedingung wurden zwischen 24 und 111 Schnitte (111 Kontrollen, 28 NH-IgG, 50 PV-IgG 1, 51 PV-IgG 2, 24 PV-IgG 1 + CNF-1, 26 PV-IgG 2 + CNFy, 31 PV-IgG 2 + CNF-1, 31 PV-IgG 2 + CNFy, 37 PF-IgG 1, 63 PF-IgG 2, 35 PF-IgG 1 + CNF-1, 32 PF-IgG 1 + CNFy, 24 PF-IgG 2 + CNF- 1, 30 PF-IgG 2 + CNFy) von mindestens jeweils zwei verschiedenen Körperspendern mikroskopisch untersucht und die Spaltbildung quantifiziert. Hierzu wurde für jeden histologischen Schnitt die Länge der Spalten vermessen und auf die Gesamtlänge des Schnittes bezogen.

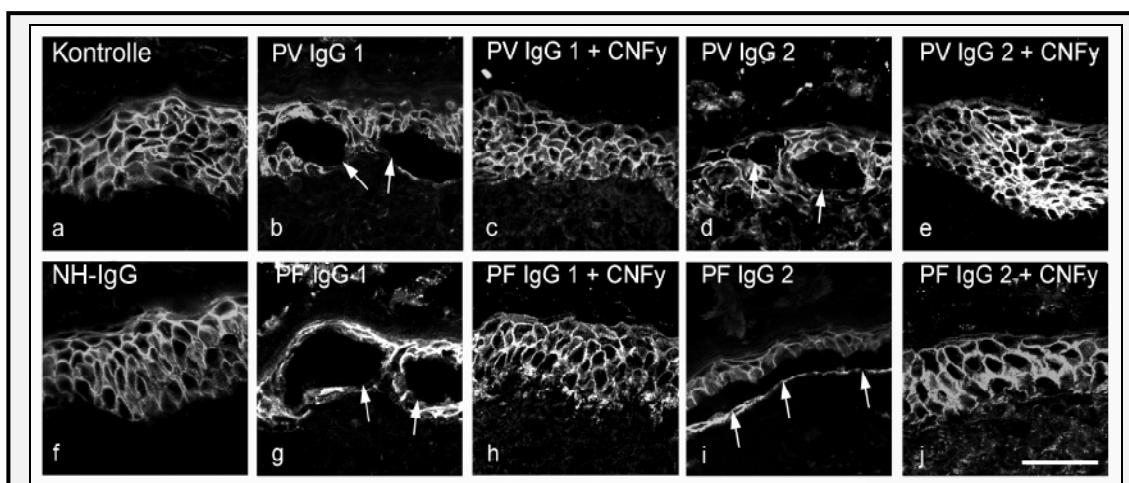


Abb. 14: Effekte einer Rho A-Aktivierung auf die epidermale Akantholyse

Im Gegensatz zu Kontrollbedingungen (a, f) führte eine Behandlung mit Pemphigus-IgG (b, d, g, i) zu intraepidermaler Spaltbildung (Pfeile). Eine gleichzeitige Inkubation mit CNFy zur Aktivierung von Rho A verhinderte dagegen die Ausbildung der durch Pemphigus-IgG induzierten Effekte (c, e, h, j). NH-IgG: IgG einer gesunden Kontrollperson. Maßstab: 50 μm .

Unter Kontrollbedingungen ohne Zugabe von humanem IgG ergab die Vermessung der Lückenlängen einen Wert von $4,0 \pm 0,9 \mu\text{m}/\text{mm}$ und unter Inkubation mit Kontroll-IgG (NH-IgG) einen Wert von $2,7 \pm 2,0 \mu\text{m}/\text{mm}$. Wie schon weiter oben beschrieben induzierte PV- bzw. PF-IgG jeweils signifikant die Bildung von Spalten. Die gleichzeitige Aktivierung von Rho A führte dagegen zu einer drastischen Reduktion der Lückenlänge von 76 auf $18 \pm 6,6 \mu\text{m}/\text{mm}$ bei PV1-IgG, von 106 auf $5 \pm 2,4 \mu\text{m}/\text{mm}$ bei PV2-IgG, von 82 auf $3 \pm 1,4 \mu\text{m}/\text{mm}$ bei PF1-IgG und im Falle von PF2-IgG von 37 auf $1 \pm 0,2 \mu\text{m}/\text{mm}$. Die Aktivierung von Rho A, Rac 1 und Cdc42 zusammen mit CNF-1 ergab eine signifikante Reduktion der Lückenlänge auf $15 \pm 4,5$, $3 \pm 1,0$, $3 \pm 1,7$ sowie $6 \pm 3,6 \mu\text{m}/\text{mm}$.

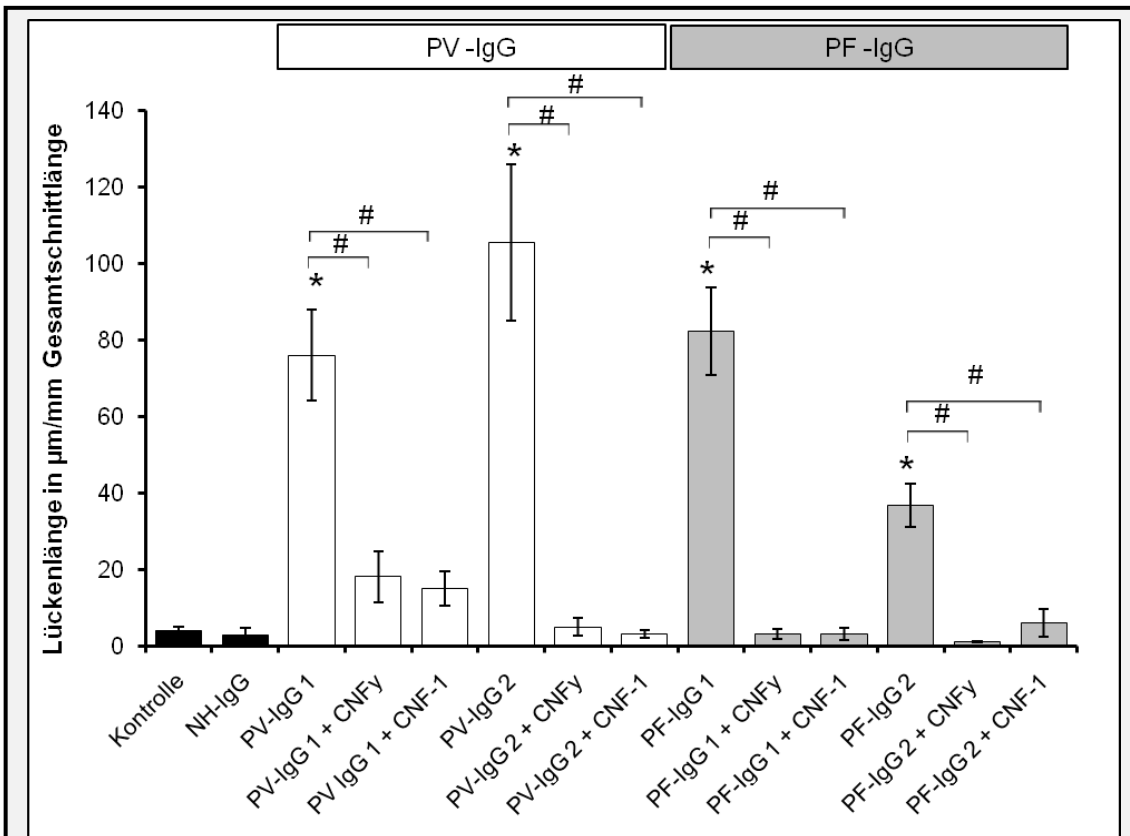


Abb 15: Auswertung der Hautschnitte bezüglich Lückenbildung

Zur Quantifizierung der Wirkung der Pemphigus-Seren wurde der Parameter „Lückenzänge in µm pro Gesamtlänge des Epidermisschnitts in mm“ definiert. Dieser Wert stieg unter Inkubation mit PV- wie mit PF- IgG im Vergleich zu Kontrollen signifikant an. Die Länge der Lücken wurde bei gleichzeitiger Gabe von CNFy oder CNF-1 ebenfalls signifikant reduziert. * $p < 0,05$ gegenüber Kontrolle; # $p < 0,05$ gegenüber entsprechende Behandlung mit Pemphigus-IgG.

Eine Aktivierung von Rho-Proteinen wirkte sich also protektiv im Hinblick auf die Wirkung von PV- wie PF-IgG aus und führte zu einer Reduktion der Lückenbildung meist bis auf das Niveau der Kontrolle. Da die Inhibition der Spaltbildung bei Aktivierung von Rho A alleine genauso stark ausfiel wie nach Stimulation aller drei GTPasen, schien Rho A hauptsächlich verantwortlich für die gezeigten protektiven Effekte zu sein.

3.6 Einfluss einer Aktivierung von Rho-GTPasen auf die durch Pemphigus-IgG vermittelte Zelldissoziation in kultivierten Keratinozyten

Für die folgenden Versuche wurden wieder konfluent gewachsene Zellverbände von HaCaT-Zellen verwendet. Eine Inkubation mit Kontroll-IgG für 24 h führte zu keiner Veränderung der Dsg 3-Verteilung (Abb. 16b), während die Gabe von PV-IgG 1 wie PV-IgG 2 über 24 h zu einem Verlust bzw. der Fragmentierung von membranständiger Dsg 3-Immunfärbung und zu Lückenbildung führte. (Abb. 16d, h). Inkubation mit PF-IgG 1 und 2 resultierten ebenfalls in interzellulärer Lückenbildung sowie in einem Verlust von Dsg 3 an den Zellgrenzen. (Abb. 16k, n). Eine gleichzeitige Inkubation mit CNF-1 verhinderte die Effekte von Pemphigus-IgG nahezu vollständig (Abb. 16e, i, l, o). Die Aktivierung von Rho A alleine mittels CNF γ führte zum gleichen Ergebnis (Abb. 16f, j, m, p).

In einem zweiten Schritt wurden die Effekte von PV-IgG und Rho A-Aktivierung auf andere desmosomale Komponenten mit Immunfärbung von Desmoplakin und Zytokeratin 14 (CK14) untersucht. Als ein integrales Protein der Adhärensjunktion wurde ebenfalls die Verteilung von E-Cadherin überprüft.

Unter Kontrollbedingungen (Abb. 17a-c) zeigte sich eine membranbetonte Verteilung von Desmoplakin und E-Cadherin sowie in Bündeln im Zytoplasma gelegene, in die Zellgrenzen einstrahlende Intermediärfilamente. Nach Inkubation mit PV-IgG 1 (17d-f) und PV-IgG 2 (nicht gezeigt) über 24 h entstanden deutliche Veränderungen. Die Desmoplakin-Färbung zeigte sich fragmentiert und angereichert in den die Lücken überspannenden Zellausläufern. Die Intermediärfilamentbündel erschienen retrahiert und dissoziiert von der Plasmamembran. Auch die Darstellung der Adhärensjunktion war verändert im Sinne einer vermehrten zytosolischen Verteilung von E-Cadherin. Die Effekte erschienen allerdings geringer ausgeprägt als auf die Desmosomen.

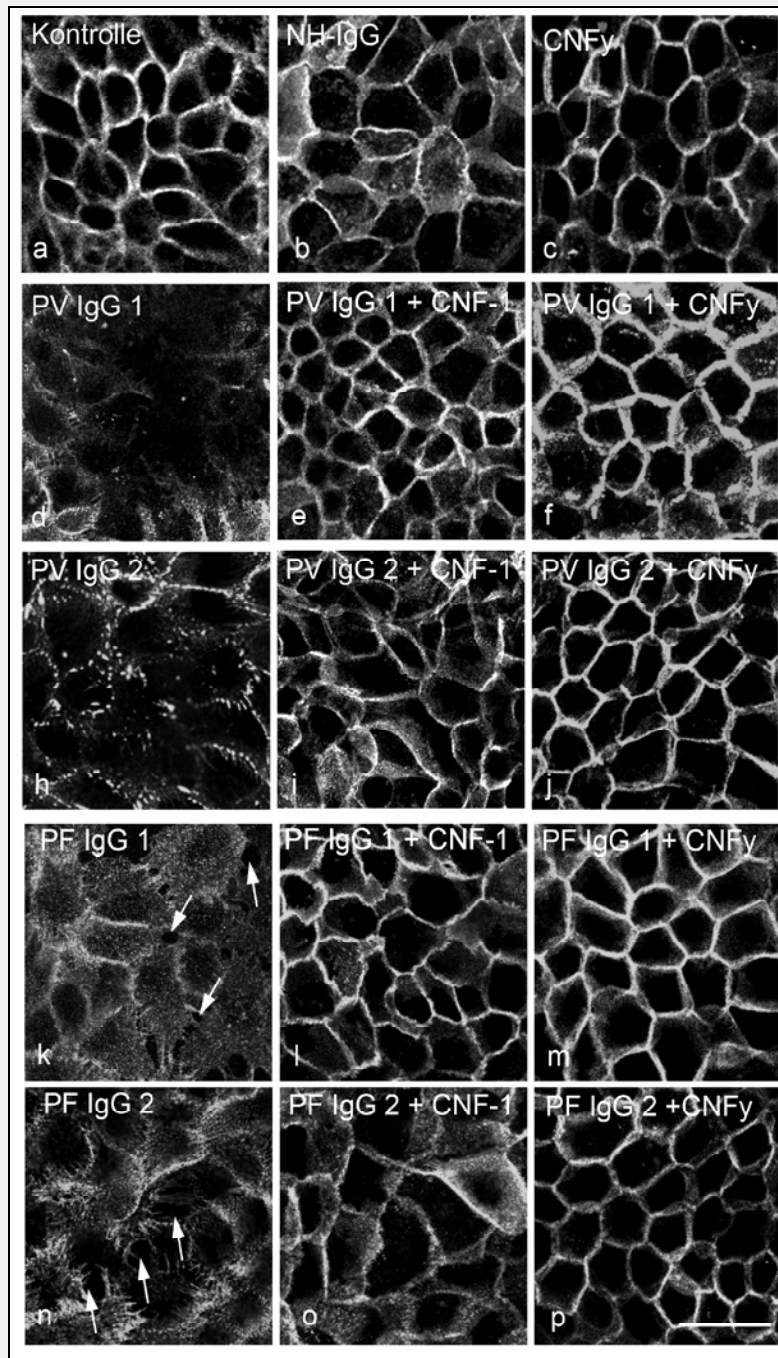


Abb. 16: Effekte von Pemphigus-IgG bei gleichzeitiger Aktivierung von Rho A
 Hier wurde immunzytochemisch Dsg 3 lokalisiert. Im Gegensatz zu Kontrollbedingungen (a-c) zeigte sich unter Inkubation mit PV-IgG ein massiver Verlust von membranständigem Dsg 3 (d) bzw. eine fragmentiert erscheinende Immunfärbung (h). PF-IgG führt ebenfalls zu einem Verlust des junctional lokalisierten Dsg 3 und Lückenbildung (k, n). Diese Effekte wurden unter jeder Bedingung durch Aktivierung von Rho A alleine (durch CNFy) bzw. Rho A, Rac 1 und Cdc42 (durch CNF-1) fast vollständig gehemmt (e, f, j, i, l, m, o, p). Es ließen sich weder Lücken noch ein Verlust des zellmembranassoziierten Dsg 3 nachweisen. Maßstab: 20 μ m, n = 5.

So war E-Cadherin weiterhin auch an den Zellgrenzen nachweisbar und nur an Stellen der Lückenbildung nicht mehr vorhanden. Die gleichzeitige Aktivierung von Rho A (CNFy, 600ng/ml, Abb. 17g-i) erwies sich als protektiv im Hinblick auf die Lückenbildung. Desmoplakin erschien deutlich gleichmäßiger an den Zellgrenzen mit nur noch gering vorhandener Fragmentation.

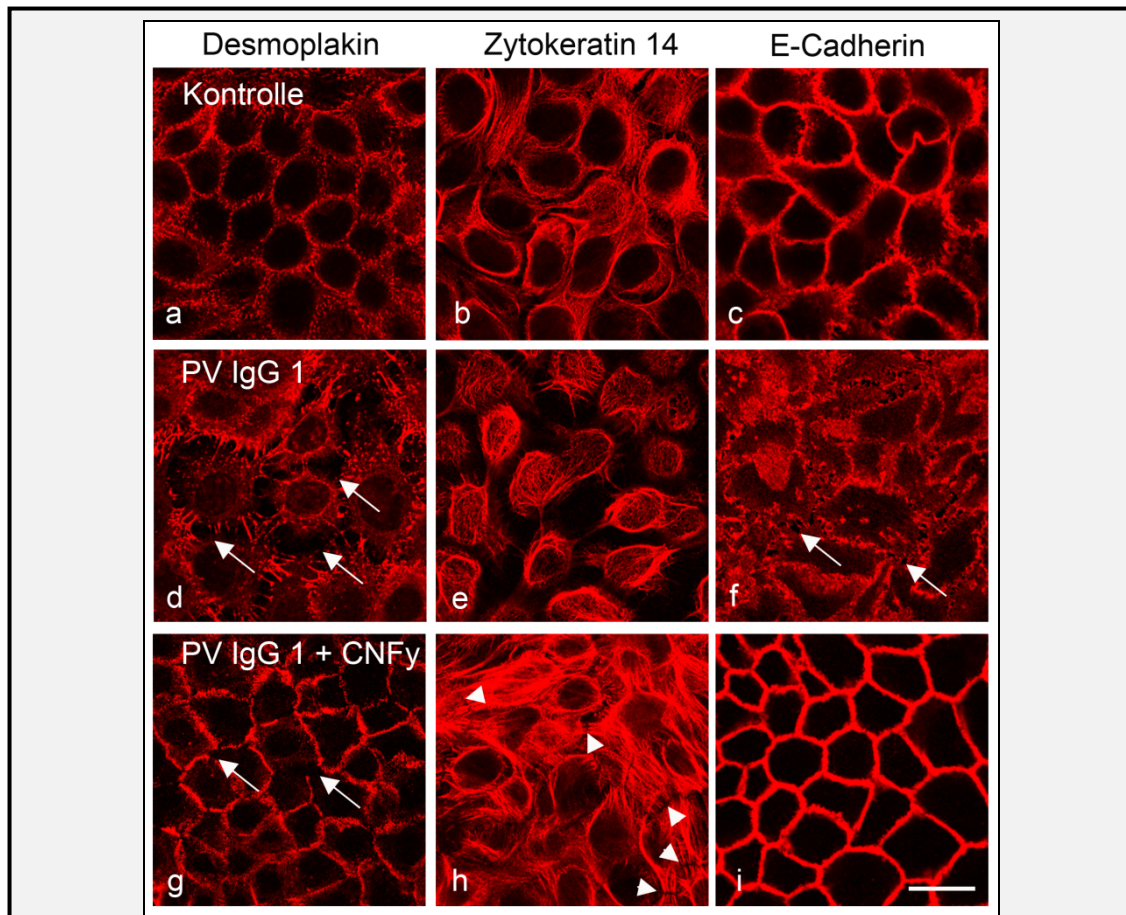


Abb 17: Effekte von PV-IgG auf die Verteilung von Desmoplakin, CK14 und E-Cadherin

Es wurde immunzytochemisch Desmoplakin (linke Spalte), Zytokeratin 14 (mittlere Spalte) und E-Cadherin (rechte Spalte) nachgewiesen. Im Vergleich zu Kontrollbedingungen (a-c) erschien nach Inkubation mit PV-IgG die Desmoplakin-Immunfärbung fragmentiert (d), die Intermediärfilamentbündel deutlich retrahiert (e) und die E-Cadherin-Färbung reduziert vor allem an Stellen der Lückenbildung (f). Simultane Inkubation mit CNFy führte zu einer deutlichen Reduktion der PV-IgG-induzierten Effekte. Die Fragmentation von Desmoplakin war deutlich schwächer ausgeprägt (g), E-Cadherin eher stärker membranständig lokalisiert (h) und die Zytokeratin-Retraktion inhibiert. Teilweise zeigte sich eine deutliche Vermehrung der die Zelle durchspannenden Filamentbündel (i). Maßstab: 20 μ m, n= 5

Auch die E-Cadherin-Färbung zeigte sich membranständig verstärkt. Die Keratinretraktion wurde vollständig blockiert und man konnte in vielen Zellen eine gesteigerte Anzahl von Intermediärfilamentbündeln beobachten.

Zusammenfassend führte Pemphigus-IgG somit zu Lückenbildung in der HaCaT-Zellkultur und einem Verlust bzw. einer Fragmentation von membrangebundenem Dsg 1 und Dsg 3. Weiterhin vermittelte PV-IgG Effekte auch an anderen Junctions- bzw. junctionsassozierten Proteinen. Sie führten zu fragmentierter Darstellung und Verlust der Membranständigkeit der Desmoplakin-Immunfärbung und zu Intermediärfilament-Retraktion. Bei E-Cadherin waren die Effekte weniger stark ausgeprägt mit einer Verminderung der Färbung hauptsächlich an Stellen der Lückenbildung. Diese Effekte allerdings waren nahezu vollständig inhibierbar durch selektive Aktivierung von Rho A.

3.7 Wirkung von Pemphigus-IgG auf die durch Desmogleine vermittelte Adhäsion in kultivierten Keratinozyten

Hierfür wurde die Laserpinzette in HaCaT-Zellkulturen angewandt. Die verwendeten Mikroperlen wurden entweder mit Dsg 1 oder mit Dsg 3 beschichtet. Die Inkubationszeit der Pemphigus-IgG nach Auszählen des Null- bzw. Kontrollwertes betrug 120 min. Für Versuche in Kombination mit CNFy wurde Pemphigus-IgG nach 240 min Toxin-Inkubation für weitere 120 min zugegeben, da das Toxin eine sechsstündige Einwirkzeit benötigt.

Die Verwendung von NH-IgG führte zu keiner signifikanten Änderung der Dsg 1-vermittelten Adhäsion gegenüber der Kontrolle ($98 \pm 6,5\%$, Abb. 18). Dagegen war eine signifikante Reduktion der Adhäsion von Dsg 1-Perlen die Folge einer Inkubation mit PV-IgG 1 ($82 \pm 7,0\%$), PV-IgG 2 ($51 \pm 4,6\%$), PF-IgG 1 ($57 \pm 2,5\%$) und PF-IgG 2 ($65 \pm 4,4\%$). Eine gleichzeitig durchgeführte Behandlung mit CNF-1 (300 ng/ml) führte zu keiner signifikanten Änderung der Adhäsion mehr ($102 \pm 1,2\%$, $105 \pm 4,1\%$, $88 \pm 7,2\%$ sowie $100 \pm 1,2\%$) im Vergleich zur Kontrolle. Auch die vierstündige Vorbehandlung mit CNFy (600 ng/ml) zeigte Effekte in ähnlichem Rahmen, hier stiegen die Werte auf $108 \pm 3,0\%$, $106 \pm 5,0\%$, $103 \pm 5,0\%$ und $105 \pm 6,0\%$ bei PV-IgG 1 und 2 bzw. PF-IgG 1 und 2. Einzelne Versuche wurden ebenfalls mit Dsg 3-beschichteten

Mikroperlen durchgeführt (nicht dargestellt). Hier reduzierte sich die Anzahl gebundener Mikroperlen gegenüber der Kontrolle bei Inkubation mit PV-IgG 1 auf 78%, mit PF-IgG 1 auf 66%. Eine gleichzeitige Behandlung mit CNF-1 verhinderte die Verringerung der Adhäsion (jeweils 97% der Kontrolle).

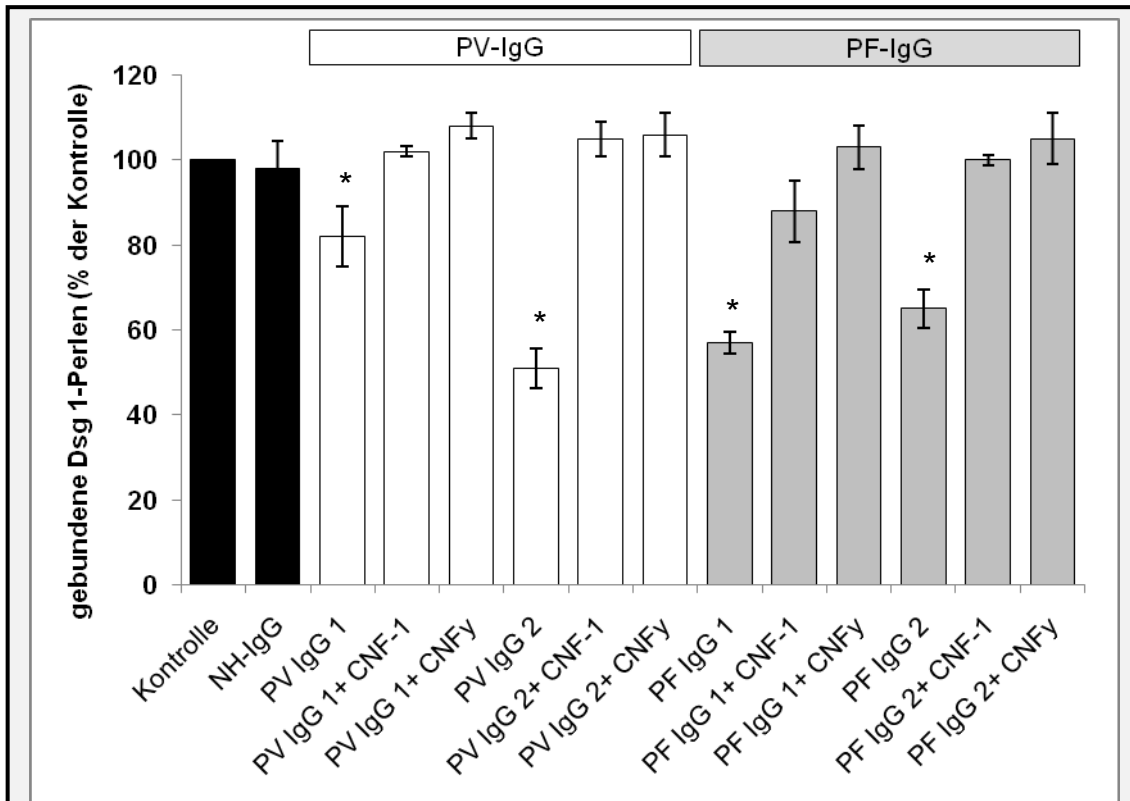


Abb. 18: Effekte von Pemphigus-IgG auf die Dsg 1-vermittelte Adhäsion

Gegenüber Kontrollbedingungen zeigte sich nach Inkubation von HaCaT-Zellen mit PV-IgG 1 oder 2 bzw. PF-IgG 1 oder 2 eine signifikante Abnahme der Dsg 1-vermittelten Adhäsion von Mikroperlen auf 82%, 51% bzw. 57% und 65%. Eine gleichzeitige Aktivierung von Rho-GTPasen durch CNF-1 oder CNFy verhinderte die Abnahme der Anzahl gebundener Mikroperlen. N = 6 pro Versuchsbedingung, $p < 0,05$.

Pemphigus-IgG verringerten signifikant die Anzahl gebundener Dsg 1-beschichteter Mikroperlen auf der Oberfläche von HaCaT-Zellen. Neben PV-IgG war auch PF-IgG in der Lage, die Haftung Dsg 3-gekoppelter Perlen zu verringern. Diese Effekte ließen sich nicht bei gleichzeitiger Inkubation mit CNF-1 oder CNFy auslösen.

3.8 Einfluss von Pemphigus-IgG auf die Aktivität von Rho A

Die bisher gezeigten Ergebnisse ließen einen Einfluss der Rho-GTPasen bei der Pemphigus-Pathogenese vermuten. Unklar war jedoch, ob die Aktivierung nur protektiv im Hinblick auf die von Pemphigus-IgG induzierten morphologischen Veränderungen wirkte, oder ob Pemphigus-IgG ihre Effekte direkt über Rho-GTPasen ausüben. Um diese Frage zu klären, wurden Pulldown-Versuche verwendet. Hierbei lag der Fokus auf der GTPase Rho A, da sich deren Aktivierung als ebenso protektiv auf die Pemphigus-IgG-Effekte erwies wie die Aktivierung aller drei GTPasen zusammen.

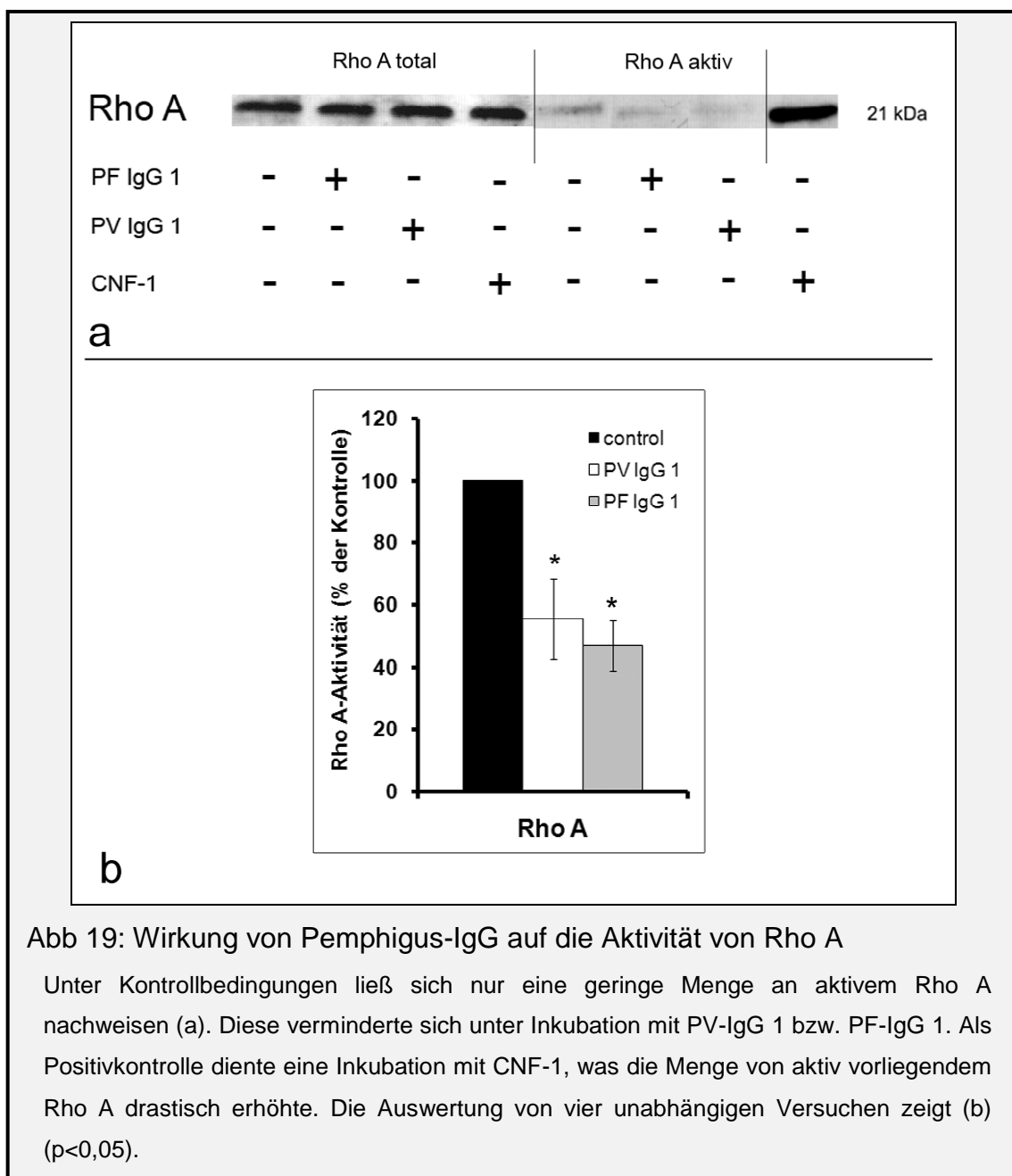
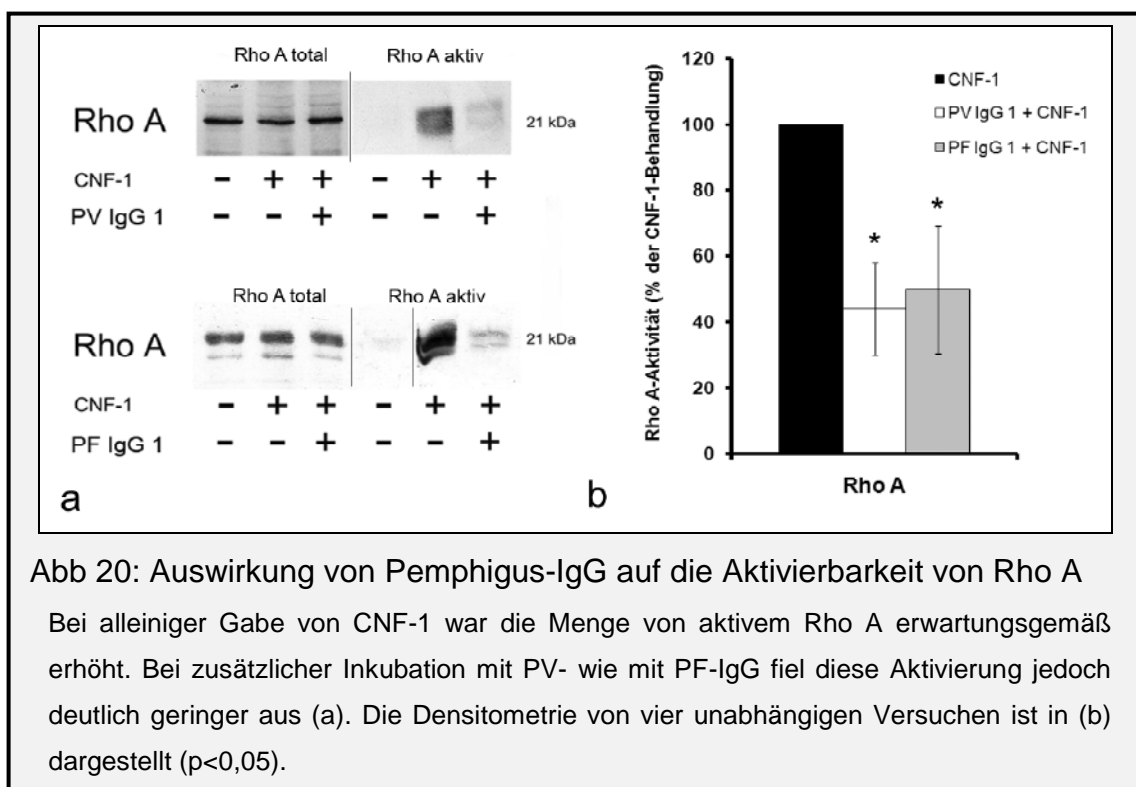


Abb. 19a zeigt einen repräsentativen Blot eines Pulldown-Versuches. Wie im rechten Teil zu sehen, ist der Anteil des aktiven am gesamten Rho A unter Kontrollbedingungen nur recht gering. Trotzdem ergab sich eine Abnahme des aktiven Rho A sowohl unter Inkubation für 2 h mit PV-IgG wie auch mit PF-IgG. In Abb. 19b findet sich die densitometrische Auswertung aller Versuche (jeweils $n=4$), bezogen auf die Kontrolle. PV-IgG führte zu einer signifikanten Abnahme der Aktivität von Rho A auf $55 \pm 13\%$ der Kontrolle, während PF-IgG ebenfalls signifikant in einer Abnahme auf $47 \pm 8\%$ resultierte.

Als weiterer Versuch wurde der Einfluss von Pemphigus-IgG auf die Aktivierbarkeit von Rho A untersucht. Hierzu wurde gleichzeitig PV- oder PF-IgG und CNF-1 zur Aktivierung der drei GTPasen zugegeben und danach mittels Pulldown-Versuch die Menge von aktivem Rho A bestimmt. Wie in Abb. 20a zu sehen, war wie bereits bekannt in der Kontrolle nur wenig aktives Rho A vorhanden. Auch hier führte eine Inkubation mit CNF-1 alleine für 2 h zur Aktivierung von Rho A. Bei einer gleichzeitigen Behandlung mit PV- bzw. PF-IgG ebenfalls über 2 h war dagegen die Aktivierung deutlich geringer ausgeprägt. Die densitometrische Auswertung aller Versuche ($n=4$, Abb. 20b) ergab eine Reduktion der Aktivität von Rho A auf $44 \pm 14\%$ der alleinigen CNF-1-Aktivierung für PV-IgG und $50 \pm 19\%$ für PF-IgG.



Zusammenfassend reduzierten PV- wie PF-IgG die Menge von aktiv vorliegenden Rho A. Desweiteren führten sie zu einer verminderten Aktivierbarkeit dieser GTPase durch CNF-1.

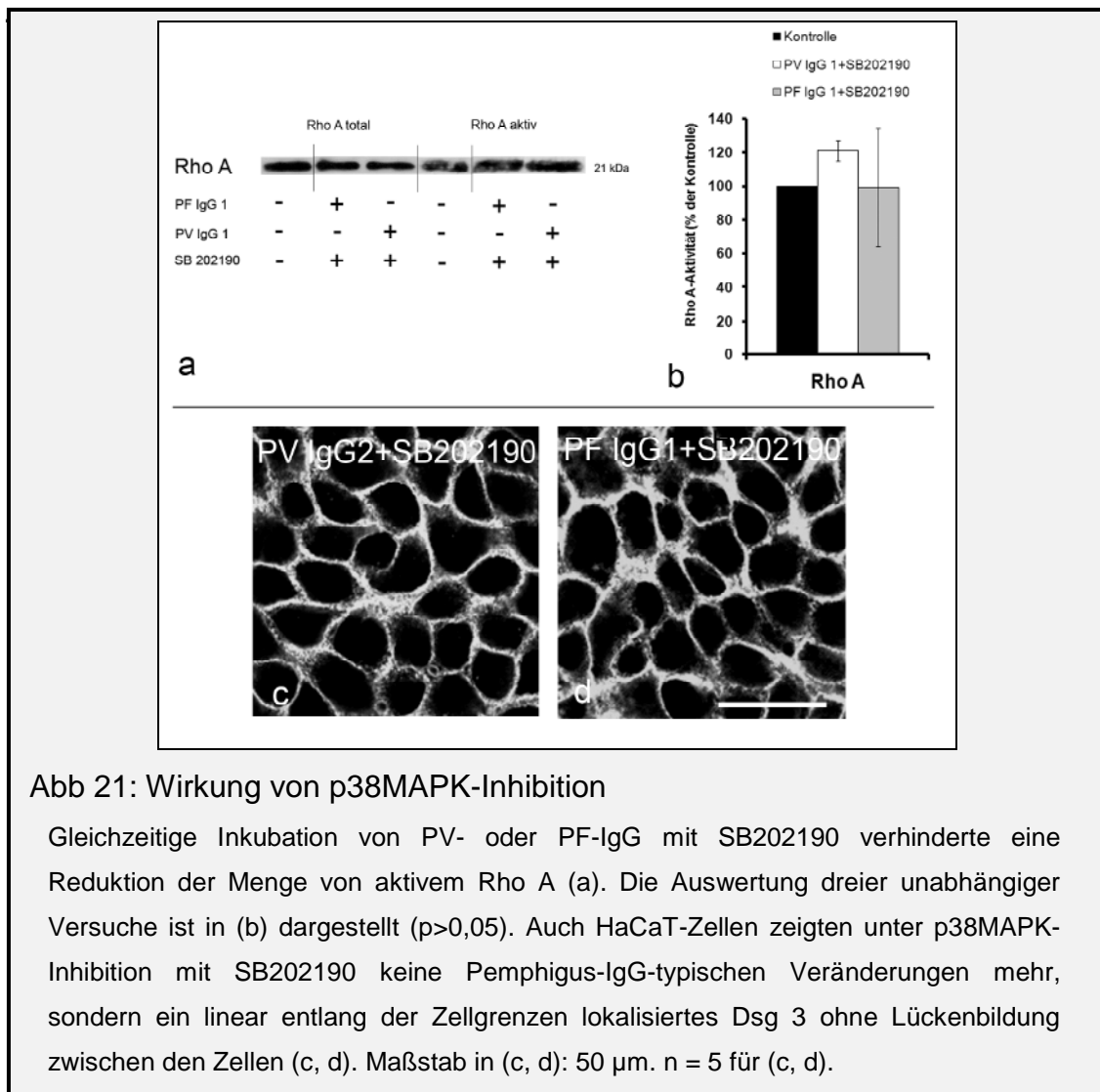
3.9 Bedeutung von p38MAPK für die durch Pemphigus-IgG vermittelte Inaktivierung von Rho A

Pemphigus-IgG führen bekanntermaßen zu einer Aktivierung von p38MAPK (Berkowitz et al., 2006; Berkowitz et al., 2007). Daher wurde der Einfluss dieser Stresskinase auf die Aktivierung von Rho A untersucht. Neben ERK1/2, ERK5 und JNK ist p38MAPK mit ihren vier Formen α , β , γ und δ eine Untergruppe der MAPKs, die in die Modulation einer Vielzahl von zellulären Effekten involviert ist. Aktiviert durch Zytokine oder Umweltstress wie Hypoxie, beteiligt sich p38MAPK an der Regulation des Zellzyklus, der Transkription und Translation diverser Zielgene, des Zellmetabolismus und des Zytoskeletts (Cuenda und Rousseau, 2007).

Durch eine gleichzeitige Inkubation mit SB202190, einem bekannten selektiven Inhibitor der p38MAPK-Unterformen α und β (Kuma et al., 2005), wurde untersucht, ob hierdurch die Inaktivierung von Rho A durch PV-IgG verhindert wird. Hierbei wurde wieder mit HaCaT-Zellen gearbeitet und die Effekte mit Pulldown-Versuchen analysiert. Wie in Abb. 21a dargestellt, führte eine simultane Behandlung von HaCaT-Zellen über 24 h mit PV-IgG 1 und SB202190 (10 μ m) zu einem Verlust der Inaktivierung von Rho A. Gleiches galt für die Behandlung von PF-IgG mit SB202190. Die Auswertung von drei unabhängigen Experimenten ergab bezogen auf die Kontrolle eine nicht signifikante Änderung der Rho A-Aktivität auf $121 \pm 6\%$ bei PV-IgG 1 und auf $99 \pm 35\%$ bei PF-IgG 2 (Abb. 21b).

Wenn p38MAPK einen Einfluss bei der Pemphigus-Pathogenese besitzt, so sollte eine Inhibition dieser Kinase auch die Effekte von Pemphigus-IgG in HaCaT-Zellkultur blockieren. Konsequenterweise führte die Inkubation von HaCaT-Zellen mit SB202190 und Pemphigus-IgG zu keiner Ausprägung der bekannten Effekte. Bei PV- wie PF-Behandlung der Zellen zeigte sich eine den Kontrollen entsprechende Dsg 3-Verteilung. Es ließen sich keine Lücken,

Fragmentationen der Immundarstellung und kein Verlust von Dsg 3 feststellen (Abb. 21c, d).



P38MAPK war also involviert in die Pemphigus-IgG-vermittelte verminderte Aktivierbarkeit von Rho A. Eine Inhibition dieser Stresskinase blockierte den Aktivitätsverlust von Rho A durch Pemphigus-IgG und verhinderte die Ausprägung von typischen Effekten der Autoantikörper in der HaCaT-Zellkultur.

3.10 Mechanismen der Rho A-vermittelten Regulation der desmosomalen Adhäsion bei Pemphigus

Die Ergebnisse zeigten, dass Rho A und p38MAPK in die Auslösung der durch Pemphigus-IgG vermittelten Effekte involviert sind. Daher war die Aufklärung der Mechanismen von Interesse, die durch diese zwei Proteine induziert

werden. Aufgrund des Einflusses von Rho A auf das Zytoskelett lag es nahe, den Einfluss auf die Zytoskelettverankerung von desmosomalen Proteinen nach Gabe von Pemphigus-IgG zu untersuchen.

Hierzu wurde die Methode der Proteinextraktion angewandt. Damit kann die Menge von membrangebundenen bzw. zytosolisch vorliegenden Proteinen von der Menge unterschieden werden, die zytoskelettal verankert ist. Diese Untersuchung wurde für Dsg 3 in HaCaT-Zellen durchgeführt (Abb. 22).

Unter Kontrollbedingungen war der größere Teil von Dsg 3 am Zytoskelett verankert. Die Menge dieser Fraktion änderte sich nur wenig unter den verschiedenen Versuchsbedingungen.

Alleinige Applikation von PV-IgG 1 über 24 h zeigte eine Zunahme von Dsg 3 im Triton-löslichen, das heißt zytosolisch bzw. membrangebunden vorliegendem Dsg 3. Gleichzeitige Inkubation mit CNFy (600ng/ml) zur

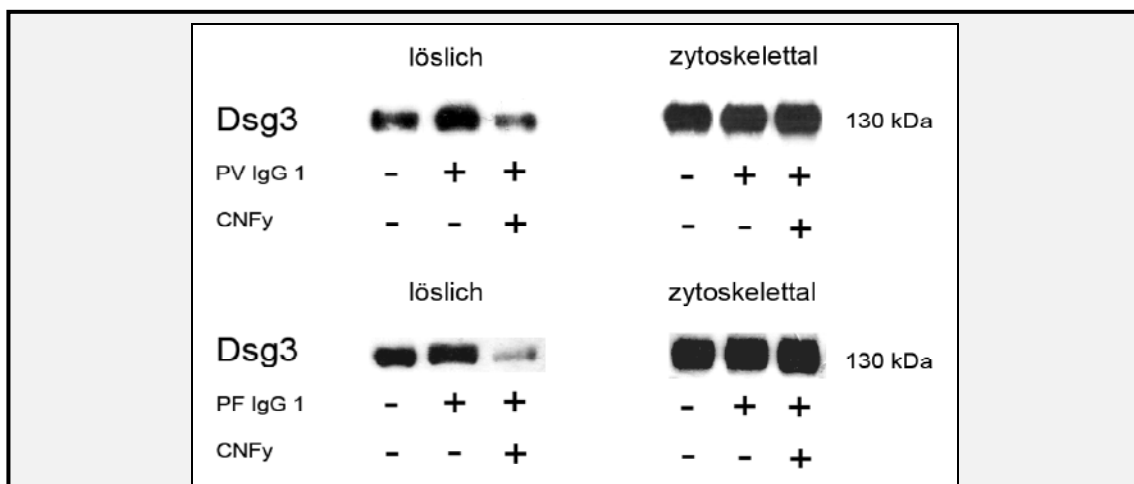


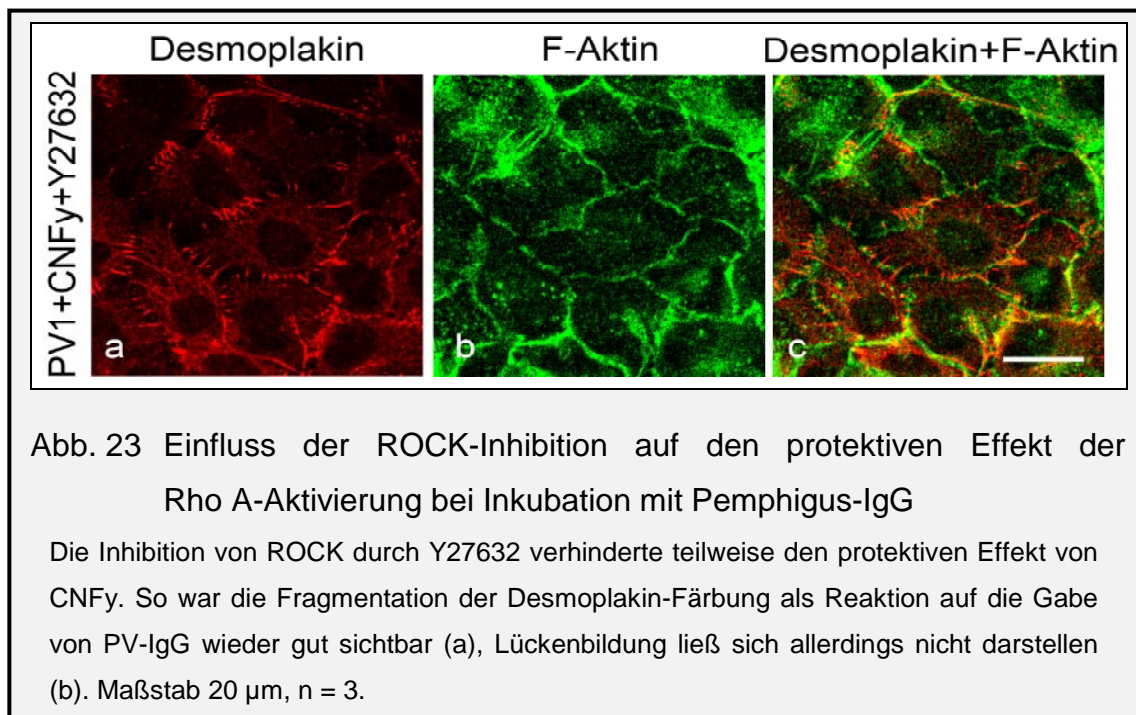
Abb. 22: Einfluss von Pemphigus-IgG auf die Dsg 3-Verankerung am Zytoskelett

PV-IgG 1 (obere Zeile) sowie PF-IgG 1 (untere Zeile) vermehrten beide den Anteil des tritonlöslichen Dsg 3. Eine gleichzeitige Behandlung mit CNFy zur Aktivierung von Rho A resultierte in einem deutlich verringerten Anteil an nicht Zytoskelett-gebundenem Dsg 3. Der Anteil des zytoskelettal verankerten Dsg 3 veränderte sich unter keiner der Bedingungen merklich, n = 3.

Aktivierung von Rho A führte dagegen zu einem deutlichen Verlust des frei vorliegenden Dsg 3. Zusammen mit der vermehrten Färbungsintensität von Dsg 3 in der Immunfluoreszenzdarstellung wies dies auf eine vermehrte Zytoskelettverankerung in der Membran hin. Diese Daten deuteten an, dass

Rho A an der Regulation der Zytoskelettverankerung von Desmocadherinen beteiligt ist.

Als nächster Schritt wurde untersucht, ob die durch Pemphigus-IgG reduzierte Aktivität von Rho A über eine Beeinflussung von ROCK wirkt. Dieses Effektorprotein von Rho A vermittelt viele der Einflüsse dieser GTPase auf das Aktinzytoskelett. (Schmandke und Strittmatter, 2007). Durch Verwendung des Inhibitors Y27632 wurde ROCK inhibiert (Ishizaki et al., 2000). Die gleichzeitige Gabe von Y27632 (10 mM) zusammen mit CNFy (600 ng/ml) und PV-IgG führte zu einer teilweisen Verminderung des protektiven Effektes einer Rho A-Aktivierung (dargestellt für Desmoplakin, Abb. 23). Es ließ sich zwar keine Lückenbildung mehr induzieren, jedoch zeigte sich eine Fragmentierung der Immunfärbung von Desmoplakin sowie eine reduzierte Anfärbung von F-Aktin.



Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass Pemphigus-IgG einem vermehrten Auftreten von freiem, nicht zytoskelettal gebundenem Dsg 3 führte. Dies konnte durch eine Aktivierung von Rho A mittels CNFy verhindert werden, Weiterhin schien ein Teil der PV-IgG-induzierten Effekte über ROCK vermittelt zu werden.

4 Diskussion

4.1 Rho-GTPasen sind an der Regulation der desmosomal vermittelten Haftung beteiligt

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen eine Beeinflussung der zellulären Adhäsion *in vitro* wie *ex vivo* durch Rho-GTPasen. Auch scheinen Rho-GTPasen die Lokalisation von Desmocadherinen zu regulieren. Weiterhin wirken Rho-GTPasen auf die Dsg-vermittelte Adhäsion ein.

4.1.1 Rho-GTPasen beeinflussen die zelluläre Adhäsion und die Lokalisation von Desmogleinen

Eine Inhibition von Rho A oder Rac 1 führte in kultivierten Keratinozyten zu interzellulärer Lückenbildung und Verlust von Desmocadherin-Immundarstellung entlang der Zellgrenzen. Weiterhin führte die Inhibition von Rho A in einem *ex vivo*-Modell menschlicher Haut zur Keratinozytendissoziation mit Fragmentation und Verlust der Dsg 1-Immunfärbung in suprabasalen Schichten der Epidermis. Eine Aktivierung von Rho A führte vornehmlich zu einer gesteigerten Bildung von Aktin-Stressfasern, während eine Aktivierung von Rho A, Rac 1 und Cdc42 zusammen vor allem in einer vermehrten Darstellbarkeit des kortikalen Aktinfilamentsystems resultierte. Dies steht mit bekannten Daten im Einklang, nach denen in unterschiedlichen Zelllinien eine Aktivierung von Rho A zur Bildung von Stressfasern führt und Rac 1 das kortikale Aktinsystem reguliert (Hall und Nobes, 2000). Unabhängig davon, ob Rho A alleine oder ob alle drei Rho-GTPasen aktiviert wurden, entstand eine verstärkte Immunreaktivität und Linearisierung von Dsg 3 an der Plasmamembran. Die Daten zeigen weiterhin, dass eine Aktivierung von Rho A zu einer Verminderung des nicht zytoskelettal verankerten Dsg 3 führt. Somit könnte die Modulation des Einbaus von Desmogleinen in Desmosomen und die damit verbundene Verankerung an Plaque-Proteinen und Intermediärfilamenten einen Mechanismus darstellen, über den Rho-GTPasen die interzelluläre Haftung regulieren.

Diese Ergebnisse stehen nicht im Einklang mit einer Studie, die keinen Einfluss von Rho-GTPasen auf Desmosomen beobachten konnte (Braga et al., 1997). Hierbei wurden in Keratinozyten konstitutiv aktive bzw. inaktive Rho A- bzw. Rac 1-Mutanten injiziert und resultierende Effekte auf die Adhärensjunktionen evaluiert. Es zeigte sich hierbei, dass immunfärberisch die Lokalisation von Desmoplakin 25 min nach Injektion gegenüber Kontrollen unverändert blieb. Eine weitere Charakterisierung desmosomaler Proteine wurde nicht durchgeführt. Auch im Rahmen dieser vorliegenden Dissertation wurden Versuche zur Mikroinjektion von für Rho-GTPasen kodierende Plasmide begonnen. Da eine gleichmäßige Injektion eines ausreichend großen Areals mit adhären Keratinozyten jedoch nur schwer zu erreichen war, wurde diese Technik wieder verlassen. Zusammenfassend betrachtet lässt sich die Studie von Braga et al. aufgrund einer anderen Zielsetzung, unterschiedlichen Zeitfenstern und eventueller methodischer Probleme wohl nicht mit den Ergebnissen dieser Dissertation vergleichen.

4.1.2 Rho GTPasen modulieren die Desmoglein-vermittelte Haftung

Mit der Laserpinzettentechnik war es möglich, die Dsg-vermittelte Haftung in kultivierten Keratinozyten näher zu charakterisieren. So führte eine Aktivierung von entweder Rho A alleine oder von Rho A, Rac 1 und Cdc42 zusammen zu einer verstärkten Bindung Dsg-beschichteter Mikroperlen. Eine Hemmung von Rho A oder Rac 1 resultierte in einer Verminderung der Dsg-vermittelten Haftung. Auch eine Inhibition aller drei GTPasen reduzierte die Anzahl gebundener Perlen. Allerdings war dieser Effekt, im Gegensatz zu den in der Immunfluoreszenzmikroskopie sichtbaren Auswirkungen, weniger stark ausgeprägt als nach Hemmung von Rho A oder Rac 1 alleine. Für diese Diskrepanz könnten zweierlei Erklärungen möglich sein. So waren bei Inhibition der drei GTPasen vermehrt große, nicht an Zellen gebundene Mikroperlenaggregate sichtbar. Es ist denkbar, dass zwar deutlich weniger Mikroperlen auf der Zelloberfläche haften, die ungebundenen Perlen daraufhin aber vermehrt über ihre Dsg-Moleküle aggregieren. Definitionsgemäß wurden diese Perlenaggregate allerdings nicht in die Zählung mit einbezogen. Somit

wären die noch auf der Zelloberfläche fest gebundenen Perlen in der Auszählung überrepräsentiert.

Andererseits muss eine verminderte interzelluläre Haftung nicht unbedingt mit einer stark verminderten Desmoglein-vermittelten Haftung einhergehen. Dsg-Moleküle liegen entweder komplexiert in Desmosomen vor oder diffundieren frei in der Plasmamembran, wo sie nicht am Zytoskelett verankert zu sein scheinen (Aoyama und Kitajima, 1999; Windoffer et al., 2002). Die interzelluläre Haftung wird wohl hauptsächlich über die Desmosomen vermittelt (Green und Simpson, 2007). Dagegen ist davon auszugehen, dass die mit der Laserpinzette gemessene Dsg-vermittelte Adhäsion vor allem die Bindungsfähigkeit der nicht desmosomal vorliegenden Dsg-Moleküle auf der Zelloberfläche widerspiegelt. So könnte eine Hemmung von Rho-GTPasen unterschiedliche Effekte auf die Bindungsfähigkeit von desmosomal und nicht-desmosomal vorliegenden Dsg ausüben. Interessant ist hierbei die Tatsache, dass p120-Catenin, das nur an nichtjunktionale Dsg 3-Moleküle gebunden sein soll (Kanno et al., 2008), modulierend auf Rho-GTPasen einzuwirken scheint (Anastasiadis et al., 2000; Noren et al., 2000) und beispielsweise in der Lage ist, Rho A und p190RhoGAP an Adhärensjunktionen zu rekrutieren (Magie et al., 2002; Wildenberg et al., 2006). Unklar ist die Rolle von Cdc42, dessen Funktion mangels eines selektiven Inhibitors nicht isoliert untersucht werden konnte. Es ist nicht auszuschließen, dass diese GTPase z. B. p120-Catenin-vermittelt andere Effekte zeigt als Rho A oder Rac 1. Auch ein hemmender Einfluss von Cdc42 auf Rho A oder Rac 1 wäre denkbar und könnte die Diskrepanz zwischen den stärkeren Effekten nach Inhibition von Rho A oder Rac 1, verglichen mit denen nach Hemmung aller drei GTPasen, erklären helfen. Insgesamt ist die Datenlage zu einer möglichen Regulation von desmosomalen Proteinen durch Rho-GTPasen noch wenig aussagekräftig, was nicht zuletzt in der großen Schwierigkeit der experimentellen *in vivo*-Zugänglichkeit desmosomaler Proteine begründet ist (Rubenstein und Diaz, 2006).

4.2 *Rho A ist an der Pemphigus-Pathogenese beteiligt*

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Pemphigus-IgG mit der Aktivität von Rho-GTPasen interferieren und dass eine pharmakologische Aktivierung der GTPasen die Ausbildung Pemphigus-IgG vermittelter Effekte blockiert. Die Tatsache, dass diese schützenden Effekte bei Aktivierung von Rho A alleine sowie bei Aktivierung aller drei GTPasen gleich stark ausgeprägt waren, lässt darauf schließen, dass Rho A hierbei eine Schlüsselfunktion zukommt.

4.2.1 *Pemphigus-IgG vermindern die Aktivität von Rho A*

Mit Pulldown-Versuchen wurde ermittelt, dass Pemphigus-IgG sowohl zur Verminderung der Menge von aktiven Rho A führt als auch eine verminderte Aktivierbarkeit dieser GTPase zur Folge hat. Desweiteren führten Pemphigus-IgG wie eine Inhibition von Rho-GTPasen zu suprabasaler Zelldissoziation in der Epidermis und zu Lückenbildung in kultivierten Keratinozyten. Dieser Effekt war von p38MAPK abhängig, was mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen korreliert (Berkowitz et al., 2005; 2006; Chernyavsky et al., 2007). Übereinstimmend hierzu verhinderte eine Aktivierung von Rho A bzw. die Inhibition von p38MAPK die Ausbildung Pemphigus-IgG-vermittelter Effekte.

Pemphigus-IgG führten zu einer vergrößerten Menge an nicht junctional lokalisiertem Dsg 3, was sich bei gleichzeitiger Behandlung mit Rho A-aktivierendem Toxin nicht auslösen ließ, sondern sogar in einer Verminderung resultierte. Eine Inhibition von ROCK, einem Effektormolekül von Rho A, zusammen mit Pemphigus-IgG und Aktivierung von Rho A verhinderte einerseits die Lückenbildung, andererseits aber weder die Fragmentation der Immundarstellung von Desmoplakin und Dsg 3 noch die Verminderung der Aktinfärbung. Dies deutet zusammen mit den Ergebnissen der Proteinextraktionsversuche darauf hin, dass Rho A zumindest teilweise über ROCK stabilisierend auf desmosomale Proteine wirkt und deren Dissoziation vom Zytoskelett verhindert. Es zeigt aber auch, dass noch andere Mechanismen den protektiven Effekt von Rho A vermitteln.

Eine Inkubation mit PV-IgG soll zu gesteigerter Phosphorylierung von Proteinen von Adhärensjunktionen und Desmosomen führen (Aoyama et al., 1999;

Nguyen et al., 2004). In der Tat ist die Phosphorylierung von Cadherinen und Plaqueproteinen an Tyrosin- und/oder Serin-/Threonin-Resten ein bekannter Mechanismus zur Regulation von Cadherin-basierten Junctionen, der zur Internalisierung junctionaler Proteine führt (Gumbiner, 2005). Es ist beispielsweise denkbar, dass die Inhibition von Rho A durch Pemphigus-IgG über eine vermehrte Phosphorylierung zur Endozytose desmosomaler Proteine führt. So wurde bereits gezeigt, dass Rac 1 und Cdc42 Aktin-abhängig zu Internalisierung von E-Cadherin führt (Izumi et al., 2004). Hierbei könnte die Tyrosinkinase Src eine wichtige Rolle spielen. Diese führt wohl einerseits zu Aktivierung von p38MAPK und andererseits zu PV-IgG-abhängiger Phosphorylierung von p120-Catenin (Chernyavsky et al., 2007; 2008). Da eine p120-Catenin-Cadherin-Interaktion zur Stabilisierung von Adhärensjunctionen notwendig ist und ein Verlust dieser Interaktion zu Internalisierung nahezu aller Adhärensjunctions-Proteine führt (Davis et al., 2003), liegt die Vermutung nahe, dass ein vergleichbarer Mechanismus auch für den Umsatz desmosomaler Proteine vorhanden und an den durch Pemphigus-IgG vermittelten Membranverlust von Desmogleinen beteiligt ist.

Auch wenn die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammen mit anderen Gruppen eine eher geringere Beeinflussung der Adhärensjunctionen durch Pemphigus-IgG vermuten lassen (Calkins et al., 2006; de Bruin et al., 2007), so kann doch nicht ausgeschlossen werden, dass sich dies auf den Umsatz desmosomaler Proteine auswirkt. So sollen zum einen die Adhärensjunctionen durch Rho-GTPasen reguliert werden (Braga, 2002), zum anderen ist eine homophile E-Cadherin-Bindung wohl wichtig zur Ausbildung von Desmosomen (Yap et al., 1997). Interessanterweise konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass eine Inhibition der Na^+/K^+ -ATPase die Ausbildung von Desmosomen und Okkludenskontakten über eine Verminderung der Aktivität von Rho A verhindert (Rajasekaran et al., 2001). Die Frage, inwieweit diese Mechanismen auch für den Umsatz von Proteinen in bereits gebildeten Desmosomen verantwortlich sind, bleibt offen.

4.2.2 Die Desmoglein-Kompensationstheorie erklärt die Pemphigus-Pathogenese nicht vollständig

Die Desmoglein-Kompensationstheorie als alleiniges Modell zur Erklärung der unterschiedlichen Blasenlokalisierung bei PF und PV wird in den letzten Jahren immer mehr in Frage gestellt (Bystryn und Rudolph, 2005; Amagai et al., 2006; Waschke, 2008). In der Tat erklärt dieses Modell nicht, wieso die Spaltbildung bei PV mit Antikörpern gegen Dsg 1 und 3 in der Epidermis nur suprabasal auftritt und nicht in allen Schichten. Auch die Fülle an Signalwegen, die durch Pemphigus-IgG induziert wird und deren Beeinflussung die Ausbildung der pathogenen Effekte verhindern, sprechen gegen die Allgemeingültigkeit dieser Theorie.

In der vorliegenden Arbeit führte die Gabe von PF-IgG im *ex vivo*-Modell der Epidermis zu Spaltbildung in Arealen, in denen Dsg 1 wie Dsg 3 exprimiert wurden. Auch in Keratinozyten, die Dsg 1 und 3 ausbilden, ließ sich so eine Lückenbildung induzieren. Ein weiterer Hinweis der vorgestellten Daten, der gegen das Modell der direkten Inhibition spricht, ergibt sich aus der Tatsache, dass Inkubation mit PF-IgG zur Hemmung der Dsg 3-vermittelten Haftung von Mikroperlen führte. Dies ließe sich über die Kompensationstheorie nur erklären, wenn eine heterophile Bindung zwischen Dsg 1 und 3 bestünde. Eine Publikation dieser Arbeitsgruppe konnte allerdings zeigen, dass dies nicht der Fall ist (Heupel et al., 2008). Somit kompensiert Dsg 3 in den verwendeten Modellen nicht für Dsg 1. Auch unterscheidet sich die Desmoglein-Verteilung in menschlicher Haut von der Verteilung in Mäuseepidermis – aus denen die Kompensationstheorie abgeleitet wurde – durch einen breiteren Überlappungsbereich von Dsg 1 und 3 (Mahoney et al., 2006). Dies konnte mit den vorliegenden Daten bestätigt werden.

Verschiedene Signalwege in den einzelnen Epidermis-Schichten sowie einige weitere Faktoren des Mikromilieus könnten eine wichtige Rolle in der Pemphigus-Pathogenese und für die Erklärung der unterschiedlichen Blasenlokalisierung bei PV und PF spielen. Eine Arbeitsgruppe berichtete über Antikörper gegen cholinerge Rezeptoren, die ursächlich an der Pathogenese beteiligt sein sollen (Grando, 2006). Diese These wird durch die Tatsache

unterstützt, dass in der Epidermis in tieferen Schichten vorwiegend M₃-Acetylcholinrezeptoren exprimiert werden und in oberen Schichten der M₄-Subtyp vorherrscht (Ndoye et al., 1998). Eine weitere Möglichkeit der Erklärung der unterschiedlichen Blasenlokalisation entsteht durch einen in der Epidermis vorhandenen von superfiziell nach basal hin abnehmenden Ca²⁺-Gradienten (Menon et al., 1985). Bedingt durch die Ca²⁺-Abhängigkeit der Cadherinbindung könnte eine Veränderung dieses Gradienten mit Zelldissoziation in distinkten Schichten der Epidermis einhergehen (Waschke et al., 2007). Eine interessante, wenn auch spekulative Vermutung besteht in der Annahme einer Beeinflussung der Pemphigus-Pathogenese durch die unterschiedliche epidermale Zytokeratinverteilung (Amagai et al., 2006). Da diese mit Desmosomen verknüpften Zytoskelettfilamente stark an der Ausbildung und Unterhaltung von Zellpolarität und –form beteiligt sind, ist eine unterschiedliche Beeinflussung spezifischer Zytokeratine durch PV und PF denkbar.

Andererseits kann durch die Beschreibung von Pemphigus-IgG-vermittelten Signalwegen natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass durch Bindung pathogener Antikörper eine zumindest partielle direkte Schwächung der Transinteraktion entsteht. Während bei PF eine direkte Inhibition keine Rolle zu spielen scheint (Waschke et al., 2005; Heupel et al., 2008), konnte doch für PV eine Behinderung der Dsg 3-Interaktion in einem zellfreien System nachgewiesen werden (Heupel et al., 2008). Zusammen mit der Tatsache, dass PF-IgG-Inkubation die Dsg 3-vermittelte Haftung inhibiert, ist dies ein wichtiger Hinweis darauf, dass Desmogleine in der Lage sind, Signale aus dem Extrazellulärraum im Rahmen eines „*outside-in signalling*“ ins Zellinnere zu vermitteln. Dies steht im Einklang mit dem Erklärungsmodell einer anderen Arbeitsgruppe (Müller et al., 2008). Ob diese Signaltransduktion ins Zellinnere durch Antikörperbindung vermittelt wird oder eine Folge des Verlusts der Transadhäsion durch (allo)sterische Behinderung ist (Sharma et al., 2007), lässt sich noch nicht abschließend beurteilen. Zwei Tatsachen sprechen eher für ersteres Modell: Erstens führt PF-IgG in einem zellfreien Versuchsaufbau nicht zu einem Verlust der Dsg 1-Transinteraktion, zweitens zeigt sich Akantholyse nach 12-24 h deutlich später als die meisten gefundenen Signalwege (1 min - 4 h).

In diesem Zusammenhang könnte ein Vergleich der Wirkung von Exfoliativem Toxin (ET) mit der von PF-IgG beispielsweise auf Rho A oder p38MAPK aufschlussreich sein. ET von *Staphylococcus aureus* schneidet spezifisch Dsg 1 zwischen EC-3 und EC-4 und führt zum Krankheitsbild des SSSS (*Staphylococcal scalded skin syndrome*) mit der Ausbildung oberflächlicher Blasen (Amagai, 2003). Somit sollte Inkubation mit ET im Gegensatz zu der mit PF-IgG sicher zu Verlust von Dsg 1-Adhäsion führen und es ließen sich unterschiedliche Auswirkungen auf die Signaltransduktion untersuchen.

Insgesamt bestehen wohl grundlegende Unterschiede in der Pathogenese von PV und PF (Waschke, 2008). Während die Blasenbildung bei PF nur über intrazelluläre Signalwege vermittelt zu werden scheint, spielt für PV wohl zusätzlich eine direkte Inhibition der Cadherinbindung durch Dsg 3-Autoantikörper eine Rolle (siehe Abb. 24). Dies und die Tatsachen, dass die Daten dieser Arbeit keine Unterschiede bei PV- und PF-IgG hinsichtlich der Auslösung von Signalwegen zeigten, in der Literatur aber auch Hinweise dafür bei anderen Signalwegen existieren, deutet einen mehrstufigen Prozess der Pemphigus-Pathogenese an, der schließlich die Ausbildung des unterschiedlichen Phänotyps erklären könnte.

4.2.3 Die Entstehung von Hautblasen kann als ein mehrstufiger Prozess verstanden werden

Die Versuche an menschlicher Epidermis mittels des *ex vivo*-Modells zeigten bei Inkubation mit PV-IgG wie mit PF-IgG gleichermaßen eine Spaltbildung vorzugsweise in tiefen Schichten. Dies und die geringe Länge der Spalten entspricht nicht unbedingt der Situation beim erkrankten Patienten, wo große schlaffe Blasen entstehen, die bei PV tief und bei PF oberflächlich lokalisiert sind. Es muss allerdings in Betracht gezogen werden, dass im verwendeten Modell die Inkubationszeit der Antikörper nur 24 h betrug, während die Autoantikörper im Patienten über einen längeren Zeitraum ihre pathogenen Effekte ausüben. Somit könnten die in unserem *ex vivo*-Modell beobachteten Läsionen Vorläufer von Blasen darstellen, die sich erst im weiteren Verlauf verschlimmern und dann das Vollbild der Pemphigus-Effloreszenzen ergeben. Somit ist ein Modell der Pemphigus-Pathogenese denkbar, wonach bei PV wie

bei PF durch Störung bestimmter Signalwege initiale Veränderungen in basalen Bereichen der Epidermis auftreten, die durch weitere Mechanismen verstärkt werden und durch die sich schließlich der unterschiedliche Phänotyp von PV und PF ausbildet (Abb. 24). Gegen diese These spricht allerdings, dass nach passiver Injektion von Pemphigus-IgG in neonatale Mäuse eine vollständige Blasenbildung schon nach 18-24 h zu erreichen ist (Anhalt et al., 1982; Nguyen et al., 2000b; Berkowitz et al., 2006). Hierzu muss angemerkt werden, dass in allen Transferstudien sehr hohe Konzentrationen an Pemphigus-IgG verabreicht wurden, die mit der Situation beim erkrankten Menschen wohl nicht zu vergleichen sind. Hinzu kommt, dass die Epidermis von Mäusen *in vivo* im Vergleich zu inkubierten Explantaten menschlicher Haut erhöhter mechanischer Belastung ausgesetzt ist. Natürlich ist es letztendlich nicht auszuschließen, dass im *ex vivo*-Modell bestimmte pathogene Einflussfaktoren nicht abgebildet werden, weil modulierende Einflussgrößen des Organismus fehlen. So existiert beispielsweise keine gute Erklärung, wieso die Läsionen bei Behandlung mit PF-IgG im *ex vivo*-Modell vorwiegend in tiefen Hautschichten auftreten und nicht oberflächlich wie bei den PF-Patienten.

Zusammenfassend ist somit ein mehrstufiger Mechanismus der Pemphigus-Pathogenese denkbar, der viele aktuelle Erklärungsversuche vereint (Waschke, 2008, Abb 24): Die Bindung von Pemphigus-Autoantikörpern in intakter Epidermis führt zu Signaltransduktion ins Zellinnere mit Beeinflussung eines Signalweges, an dem Rho A und p38MAPK beteiligt sind. Auch Plakoglobin scheint als Signalmolekül in der PV-Pathogenese im Rahmen eines „*outside-in signalling*“ wichtig zu sein, da Plakoglobin-defiziente Keratinozyten nur sehr geringe PV-IgG-vermittelte Effekte zeigen (Caldelari et al., 2001; Müller et al., 2008).

Die durch diese Einflüsse entstehenden initialen Läsionen werden durch zusätzliche Faktoren moduliert. Diese unterscheiden sich für PV und PF und bedingen die unterschiedliche Lokalisation der Spalten. Bei PV spielen neben einer direkten Inhibition durch gebundene Autoantikörper und einer Depletion von Dsg 3 aus der Zellmembran eine Beeinflussung zusätzlicher Signalwege mit Komponenten wie c-Myc, PLC, PKC, Src oder Cdk2 eine Rolle.

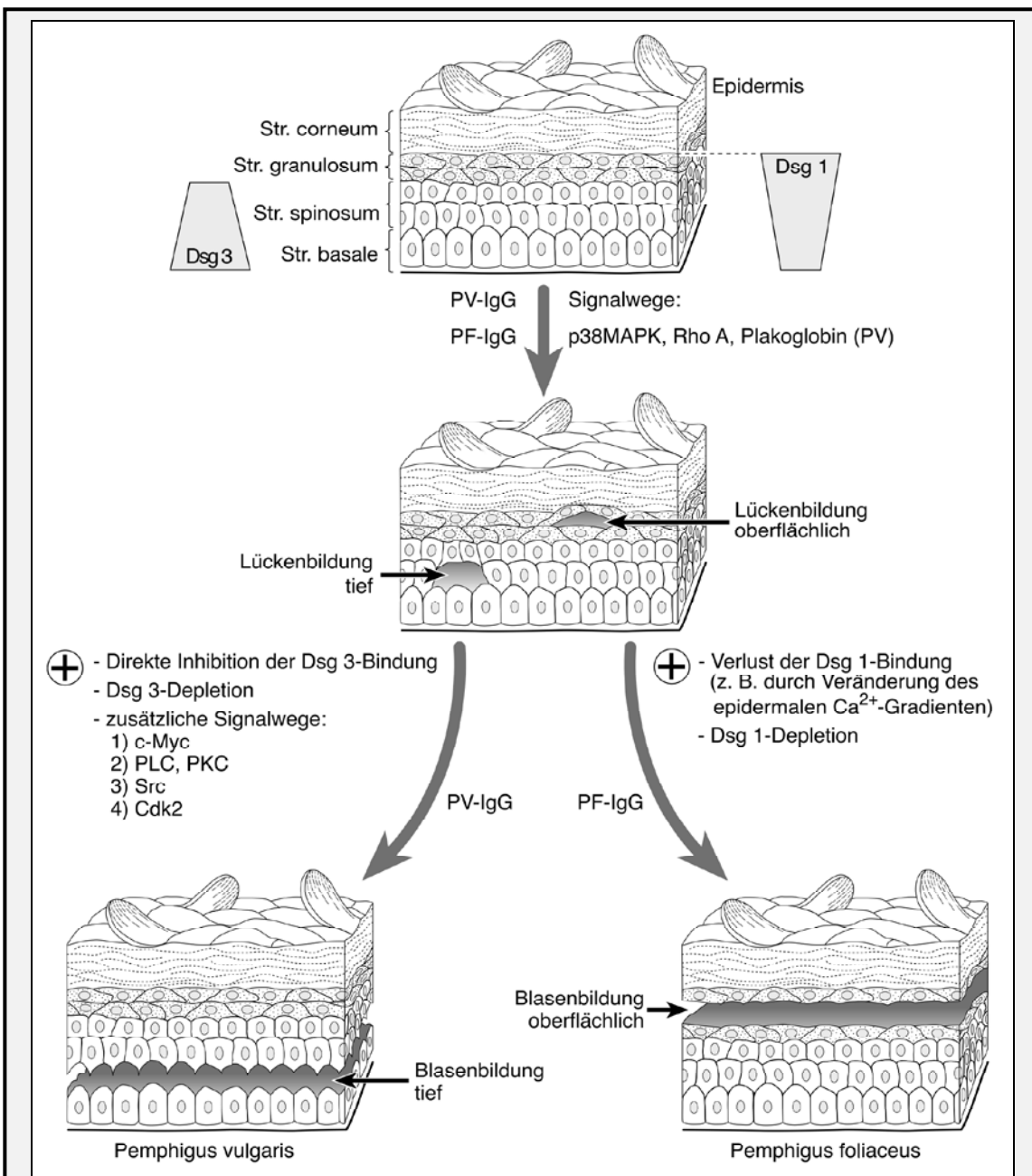


Abb. 24: Mechanismen der Pemphigus-Pathogenese

Pemphigus-IgG führen zur Beeinträchtigung von Signalwegen an denen p38MAPK, Rho A sowie Plakoglobin beteiligt sind. Dies führt zu Vorläufer-Läsionen in der Epidermis, die sich durch unterschiedliche weitere Mechanismen zum Vollbild der Spaltbildung bei PV und PF entwickeln. Bei PV ist eine Depletion von Dsg 3 neben einer Beeinflussung diverser Signalwege mit Beeinträchtigung von c-Myc, PLC und PKC, Src sowie Cdk2 ursächlich beteiligt. Hinzu kommt, im Unterschied zu PF, eine direkte Inhibition durch Antikörperbindung. Bei PF spielen neben der Dsg 1-Depletion eventuell eine Beeinflussung des Ca^{2+} -Gradienten in der Epidermis eine Rolle. Modifiziert nach Waschke, 2008.

Für PF hingegen sind weniger zusätzliche Faktoren bekannt. Eine Veränderung des Kalziumgradienten in der Epidermis könnte ebenso beteiligt sein, wie die beobachtete Dsg 1-Depletion.

4.3 Ausblick

Abschließend betrachtet ist die Pemphigus-Pathogenese noch nicht vollständig verstanden. Regelmäßig werden neue Aspekte der Wirkung von Pemphigus-IgG im zellulären Kontext aufgebracht, deren Integration in bereits bekanntes und als gesichert geltendes Wissen oftmals nicht einfach zu erreichen ist. Jedoch ist es auch weiterhin wichtig, die genauen Mechanismen aufzuklären und kritisch zu beleuchten, da Pemphigus ein relativ einfach zu untersuchendes Modell einer Immunerkrankung darstellt. Somit besteht die Hoffnung, dass Erkenntnisse aus der Pemphigus-Forschung auch auf andere, komplexere Autoantikörper-vermittelten Erkrankungen angewandt werden können. Auch in der Therapie des Pemphigus besteht erheblicher Forschungsbedarf, da die aktuellen Behandlungsmöglichkeiten insgesamt als unbefriedigend, weil zu unspezifisch und sehr nebenwirkungsreich, einzustufen sind.

Somit soll hier kurz auf einige interessante Aspekte des Pemphigus eingegangen werden, deren nähere Untersuchung zu relevanten Ergebnissen führen könnten.

Im Anschluss an die vorgelegten Daten wäre eine genauere Charakterisierung der Rho A-vermittelten Wirkung der Pemphigus-IgG wünschenswert, beispielsweise im Hinblick auf mögliche weitere Effektorproteine von Rho A. Die Rolle des Aktinzytoskelett hierbei ist ebenfalls nur unvollständig verstanden, ebenso wie die Einwirkung anderer Zytoskelettkomponenten wie Mikrotubuli. Weiterhin fehlen Daten über eine Verbindung zwischen der möglichen Weitergabe eines Antikörperbindungssignals durch Desmocadherine, der Aktivierung von p38MAPK und der Inhibition von Rho A. Hierbei wäre auch eine eingehende Untersuchung der Rolle von Src und p120-Catenin lohnenswert.

Die Tatsache, dass Dsc 3-defiziente Mäuse postnatal eine starke Hautblasenentwicklung zeigen, deutet darauf hin, dass dieses Desmocadherin eine wichtige Rolle bei der intraepidermalen Haftung spielt (Chen et al., 2008). Eine genaue Charakterisierung der Bindungseigenschaften und -partner von

Dsc 3 könnte Hinweise auf neue Aspekte der Pemphigus-vermittelten Zelldissoziation geben. Ähnliches gilt prinzipiell auch für das desmosomal lokalisierte Protein Perp, dessen Fehlen ebenfalls zu Blasenbildung führt (Marques et al., 2006).

Schlussendlich eröffnet die Tatsache, dass zirkulierende Pemphigus-Antikörper das Gefäßendothel passieren müssen, um zu ihrem Zielort zu gelangen, ein bis jetzt wenig beachtetes Forschungsfeld. Eine bessere Charakterisierung der Mechanismen, die den Übertritt von Antikörpern über das Endothel regulieren, könnte zu neuen therapeutischen Optionen bei der Behandlung des Pemphigus führen.

5 Zusammenfassung

Die Stabilität und Integrität der Epidermis beruht zu einem großen Teil auf der intakten Funktion der Desmosomen. Diese fleckförmigen Zellkontakte vermitteln extrazellulär die Haftung zwischen den Keratinozyten durch Desmocadherine und sind intrazellulär über Adaptorproteine im Intermediärfilamentsystem des Zellskeletts verankert. Diese Funktion ist bei der Autoimmunerkrankung Pemphigus gestört, die zu intraepidermaler Blasenbildung durch Akantholyse der Keratinozyten führt. Pemphigus vulgaris (PV) und Pemphigus foliaceus (PF) stellen die beiden Hauptvarianten dar, wobei PV durch Autoantikörper gegen die Desmocadherine Desmoglein (Dsg) 3 und oftmals zusätzlich gegen Dsg 1, PF durch Autoantikörper nur gegen Dsg 1 gekennzeichnet ist. Rho-GTPasen sind zelluläre Regulatorproteine, die das Aktinzytoskelett und verschiedene Zellkontakte beeinflussen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit dem Einfluss von Rho-GTPasen bei der Regulation von desmosomal vermittelter Adhäsion. In einem zweiten Teil wurde die Beteiligung von Rho-GTPasen bei den Pemphigusvarianten PV und PF näher charakterisiert. Für den ersten Abschnitt wurden bakterielle Toxine verwendet, die spezifisch Rho GTPasen aktivieren bzw. inhibieren, während für den zweiten Teil IgG-Fraktionen von PV- und PF-Patienten in Kombination mit aktivierenden Toxinen zur Anwendung kamen.

Eine Inhibition der drei Hauptvertreter der Rho-GTPasen in kultivierten Keratinozyten und humaner Epidermis führte zu einer Rarefizierung des Aktinfilamentsystems, zu Verlust von membranständig lokalisiertem Dsg 1 und 3 und zu Zelldissoziation sowie zu verminderter Dsg 1 und 3-vermittelter Haftung von Mikroperlen auf der Oberfläche von Keratinozyten. Die Aktivierung der GTPasen resultierte in vermehrter linearisierter Darstellbarkeit von Aktin und Dsg 3 an den Zellgrenzen und einer verstärkten Dsg-vermittelten Haftung. Pemphigus-IgG führten ebenfalls zu Zelldissoziation und Verlust von Dsg-Immunreaktivität in Keratinozytenkulturen, zu Spaltbildung in humaner Epidermis und zum Verlust der durch Dsg 1 und Dsg 3 vermittelten Adhäsion. Dies ging einher mit einer vermehrten Menge an nicht am Zytoskelett

verankerten Dsg 3 und wurde durch eine p38MAPK-abhängige Verminderung der Aktivität von Rho A moduliert. Die Aktivierung von Rho A verhinderte die Ausbildung der Pemphigus-induzierten Effekte nahezu vollständig.

Zusammenfassend regulieren Rho-GTPasen die desmosomale Haftung in Keratinozyten. Die Daten zeigen weiterhin, dass Pemphigus-IgG durch eine Inhibition von Rho A diese Regulation beeinträchtigt, was zu Schwächung der Zytoskelettverankerung von Desmogleinen und zu Haftungsverlust und Spaltbildung führt. Somit ist Rho A ein wichtiger Faktor der Pemphigus-Pathogenese und stellt einen Erfolg versprechenden Ansatzpunkt zur Entwicklung neuer Therapieoptionen dar.

6 *Literatur*

- Adra, C.N., Manor, D., Ko, J.L., Zhu, S., Horiuchi, T., Van Aelst, L., Cerione, R.A., and Lim, B.** (1997). RhoGDIgamma: a GDP-dissociation inhibitor for Rho proteins with preferential expression in brain and pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4279-4284.
- Al-Amoudi, A., Diez, D.C., Betts, M.J., and Frangakis, A.S.** (2007). The molecular architecture of cadherins in native epidermal desmosomes. *Nature* **450**, 832-837.
- Amagai, M., Klaus-Kovtun, V., and Stanley, J.R.** (1991). Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* **67**, 869-877.
- Amagai, M., Karpati, S., Prussick, R., Klaus-Kovtun, V., and Stanley, J.R.** (1992). Autoantibodies against the amino-terminal cadherin-like binding domain of pemphigus vulgaris antigen are pathogenic. *J Clin Invest* **90**, 919-926.
- Amagai, M., Hashimoto, T., Shimizu, N., and Nishikawa, T.** (1994a). Absorption of pathogenic autoantibodies by the extracellular domain of pemphigus vulgaris antigen (Dsg3) produced by baculovirus. *J Clin Invest* **94**, 59-67.
- Amagai, M., Karpati, S., Klaus-Kovtun, V., Udey, M.C., and Stanley, J.R.** (1994b). Extracellular domain of pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) mediates weak homophilic adhesion. *J Invest Dermatol* **103**, 609-615.
- Amagai, M., Komai, A., Hashimoto, T., Shirakata, Y., Hashimoto, K., Yamada, T., Kitajima, Y., Ohya, K., Iwanami, H., and Nishikawa, T.** (1999). Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3 for serodiagnosis of pemphigus. *Br J Dermatol* **140**, 351-357.
- Amagai, M.** (2003). Desmoglein as a target in autoimmunity and infection. *Journal of the American Academy of Dermatology* **48**, 244-252.
- Amagai, M., Ahmed, A.R., Kitajima, Y., Bystry, J.C., Milner, Y., Gniadecki, R., Hertl, M., Pincelli, C., Kurzen, H., Fridkis-Hareli, M., et al.** (2006). Are desmoglein autoantibodies essential for the immunopathogenesis of pemphigus vulgaris, or just "witnesses of disease"? *Exp Dermatol* **15**, 815-831.
- Anastasiadis, P.Z., Moon, S.Y., Thoreson, M.A., Mariner, D.J., Crawford, H.C., Zheng, Y., and Reynolds, A.B.** (2000). Inhibition of RhoA by p120 catenin. *Nat Cell Biol* **2**, 637-644.
- Anastasiadis, P.Z.** (2007). p120-ctn: A nexus for contextual signaling via Rho GTPases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1773**, 34-46.
- Anhalt, G.J., Labib, R.S., Voorhees, J.J., Beals, T.F., and Diaz, L.A.** (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 Kitajima, Y.** (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.
- Aoyama, Y., Owada, M.K., and Kitajima, Y.** (1999). A pathogenic autoantibody, pemphigus vulgaris-IgG, induces phosphorylation of desmoglein 3, and its dissociation from plakoglobin in cultured keratinocytes. *Eur J Immunol* **29**, 2233-2240.
- Ashkin, A.** (1997). Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4853-4860.
- Baumgartner, W., Schutz, G.J., Wiegand, J., Golenhofen, N., and Drenckhahn, D.** (2003). Cadherin function probed by laser tweezer and single molecule fluorescence in vascular endothelial cells. *J Cell Sci* **116**, 1001-1011.
- Berkowitz, P., Hu, P., Liu, Z., Diaz, L.A., Enghild, J.J., Chua, M.P., and Rubenstein, D.S.** (2005). Desmosome signaling. Inhibition of p38MAPK prevents pemphigus vulgaris IgG-induced cytoskeleton reorganization. *J Biol Chem* **280**, 23778-23784.
- Berkowitz, P., Hu, P., Warren, S., Liu, Z., Diaz, L.A., and Rubenstein, D.S.** (2006). p38MAPK inhibition prevents disease in pemphigus vulgaris mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12855-12860.
- Berkowitz, P., Diaz, L.A., Hall, R.P., and Rubenstein, D.S.** (2007). Induction of p38MAPK and HSP27 Phosphorylation in Pemphigus Patient Skin. *J Invest Dermatol* **128**, 738-740.
- Beutner, E.H., and Jordon, R.E.** (1964). Demonstration of Skin Antibodies in Sera of Pemphigus Vulgaris Patients by Indirect Immunofluorescent Staining. *Proc Soc Exp Biol Med* **117**, 505-510.
- Bishop, A.L., and Hall, A.** (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* **348 Pt 2**, 241-255.
- Blaschuk, O.W., Sullivan, R., David, S., and Pouliot, Y.** (1990). Identification of a cadherin cell adhesion recognition sequence. *Dev Biol* **139**, 227-229.
- Bonne, S., Gilbert, B., Hatzfeld, M., Chen, X., Green, K.J., and van Roy, F.** (2003). Defining desmosomal plakophilin-3 interactions. *J Cell Biol* **161**, 403-416.
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., and Fusenig, N.E.** (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* **106**, 761-771.
- 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., Machesky, L.M., Hall, A., and Hotchin, N.A.** (1997). The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J Cell Biol* **137**, 1421-1431.
- Braga, V.M., Betson, M., Li, X., and Lamarche-Vane, N.** (2000). Activation of the small GTPase Rac is sufficient to disrupt cadherin-dependent cell-cell adhesion in normal human keratinocytes. *Mol Biol Cell* **11**, 3703-3721.
- Braga, V.M.** (2002). Cell-cell adhesion and signalling. *Current Opinion in Cell Biology* **14**, 546-556.

- Bustelo X., Sauzeau V., and Berenjeno M.** (2007). GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *BioEssays* **29**, 356-370.
- Bystryn, J.-C., and Rudolph, J.L.** (2005). Pemphigus. *The Lancet* **366**, 61-73.
- Caldelari, R., de Bruin, A., Baumann, D., Suter, M.M., Bierkamp, C., Balmer, V., and Muller, E.** (2001). A central role for the armadillo protein plakoglobin in the autoimmune disease pemphigus vulgaris. *J Cell Biol* **153**, 823-834.
- Calkins, C.C., Setzer, S.V., Jennings, J.M., Summers, S., Tsunoda, K., Amagai, M., and Kowalczyk, A.P.** (2006). Desmoglein Endocytosis and Desmosome Disassembly Are Coordinated Responses to Pemphigus Autoantibodies. *J Biol Chem* **281**, 7623-7634.
- Chen, J., Den, Z., and Koch, P.J.** (2008). Loss of desmocollin 3 in mice leads to epidermal blistering. *J Cell Sci* **121**, 2844-2849.
- Chernyavsky, A.I., Arredondo, J., Kitajima, Y., Sato-Nagai, M., and Grando, S.A.** (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.
- Chernyavsky, A.I., Arredondo, J., Piser, T., Karlsson, E., and Grando, S.A.** (2008). Differential coupling of M1 muscarinic and alpha7 nicotinic receptors to inhibition of pemphigus acantholysis. *J Biol Chem* **283**, 3401-3408.
- Chitae, N.A., and Troyanovsky, S.M.** (1997). Direct Ca²⁺-dependent heterophilic interaction between desmosomal cadherins, desmoglein and desmocollin, contributes to cell-cell adhesion. *J Cell Biol* **138**, 193-201.
- Cote, J.-F., and Vuori, K.** (2002). Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity. *J Cell Sci* **115**, 4901-4913.
- Cuenda, A., and Rousseau, S.** (2007). p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1773**, 1358-1375.
- Davis, M.A., Ireton, R.C., and Reynolds, A.B.** (2003). A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol* **163**, 525-534.
- de Bruin, A., Caldeleri, R., Williamson, L., Suter, M.M., Hunziker, T., Wyder, M., and Muller, E.J.** (2007). Plakoglobin-dependent disruption of the desmosomal plaque in pemphigus vulgaris. *Exp Dermatol* **16**, 468-475.
- Delva, E., Jennings, J.M., Calkins, C.C., Kottke, M.D., Faundez, V., and Kowalczyk, A.P.** (2008). Pemphigus Vulgaris IgG-induced Desmoglein-3 Endocytosis and Desmosomal Disassembly Are Mediated by a Clathrin- and Dynamin-independent Mechanism. *J Biol Chem* **283**, 18303-18313.
- DerMardirossian, C., and Bokoch, G.M.** (2005). GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends in Cell Biology* **15**, 356-363.
- Diaz, L.A., Sampaio, S.A., Rivitti, E.A., Martins, C.R., Cunha, P.R., Lombardi, C., Almeida, F.A., Castro, R.M., Macca, M.L., Lavrado, C., et al.** (1989). Endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem): II. Current and historic epidemiologic studies. *J Invest Dermatol* **92**, 4-12.
- Donetti, E., Bedoni, M., Boschini, E., Dellavia, C., Barajon, I., and Gagliano, N.** (2005). Desmocollin 1 and desmoglein 1 expression in human epidermis and keratinizing oral mucosa: a comparative

- immunohistochemical and molecular study. *Archives of Dermatological Research* **297**, 31-38.
- Drenckhahn, D.** (2008). Zellenlehre. In Benninghoff Drenckhahn, Anatomie Band 1 Seite 24-42.
- Dusek, R.L., Godsel, L.M., and Green, K.J.** (2007). Discriminating roles of desmosomal cadherins: Beyond desmosomal adhesion. *Journal of Dermatological Science* **45**, 7-21.
- Erez, N., Bershadsky, A., and Geiger, B.** (2005). Signaling from adherens-type junctions. *Eur J Cell Biol* **84**, 235-244.
- Eva, A., Vecchio, G., Rao, C.D., Tronick, S.R., and Aaronson, S.A.** (1988). The predicted DBL oncogene product defines a distinct class of transforming proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 2061-2065.
- Farb, R.M., Dykes, R., and Lazarus, G.S.** (1978). Anti-epidermal-cell-surface pemphigus antibody detaches viable epidermal cells from culture plates by activation of proteinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 459-463.
- Frusic-Zlotkin, M., Raichenberg, D., Wang, X., David, M., Michel, B., and Milner, Y.** (2006). Apoptotic mechanism in pemphigus autoimmunoglobulins-induced acantholysis--possible involvement of the EGF receptor. *Autoimmunity* **39**, 563-575.
- Garrett, M.D., Self, A.J., van Oers, C., and Hall, A.** (1989). Identification of distinct cytoplasmic targets for ras/R-ras and rho regulatory proteins. *J Biol Chem* **264**, 10-13.
- Garrod, D.R., Merritt, A.J., and Nie, Z.** (2002). Desmosomal cadherins. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 537-545.
- Getsios, S., Amargo, E., Dusek, R., Ishii, K., Sheu, L., Godsel, L., and Green, K.J.** (2004a). Coordinated expression of desmoglein 1 and desmocollin 1 regulates intercellular adhesion. *Differentiation* **72**, 419-433.
- Getsios, S., Huen, A.C., and Green, K.J.** (2004b). Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 271-281.
- Giloh, H., and Sedat, J.W.** (1982). Fluorescence microscopy: reduced photobleaching of rhodamine and fluorescein protein conjugates by n-propyl gallate. *Science* **217**, 1252-1255.
- Godsel, L.M., Hobbs, R.P., and Green, K.J.** (2008). Intermediate filament assembly: dynamics to disease. *Trends in Cell Biology* **18**, 28-37.
- Grando, S.A.** (2006). Cholinergic control of epidermal cohesion. *Exp Dermatol* **15**, 265-282.
- Green, K.J., and Simpson, C.L.** (2007). Desmosomes: new perspectives on a classic. *J Invest Dermatol* **127**, 2499-2515.
- Gumbiner, B.M.** (2005). Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 622-634.
- Hall, A., and Nobes, C.D.** (2000). Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**, 965-970.
- Hall, A.** (2005). Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans* **33**, 891-895.
- Hanakawa, Y., Matsuyoshi, N., and Stanley, J.R.** (2002). Expression of Desmoglein 1 Compensates for Genetic Loss of Desmoglein 3 in Keratinocyte Adhesion. **119**, 27-31.

- Hashimoto, K., Shafran, K.M., Webber, P.S., Lazarus, G.S., and Singer, K.H. (1983). Anti-cell surface pemphigus autoantibody stimulates plasminogen activator activity of human epidermal cells. A mechanism for the loss of epidermal cohesion and blister formation. *J Exp Med* **157**, 259-272.
- Hashimoto, K., Wun, T.C., Baird, J., Lazarus, G.S., and Jensen, P.J. (1989). Characterization of keratinocyte plasminogen activator inhibitors and demonstration of the prevention of pemphigus IgG-induced acantholysis by a purified plasminogen activator inhibitor. *J Invest Dermatol* **92**, 310-314.
- Haug, G., Barth, H., Aktories, K., William E. Balch, C.J.D., and Alan, H. (2006). Purification and Activity of the Rho ADP-Ribosylating Binary C2/C3 Toxin. In *Methods in Enzymology* (Academic Press), pp. 117-127.
- Heupel, W.M., Zillikens, D., Drenckhahn, D., and Waschke, J. (2008). Pemphigus vulgaris IgG directly inhibit desmoglein 3-mediated transinteraction. *J Immunol* **181**, 1825-1834.
- Hoffmann, C., Pop, M., Leemhuis, J., Schirmer, J., Aktories, K., and Schmidt, G. (2004). The Yersinia pseudotuberculosis Cytotoxic Necrotizing Factor (CNFY) Selectively Activates RhoA. *J Biol Chem* **279**, 16026-16032.
- Hogan, C., Serpente, N., Cogram, P., Hosking, C.R., Bialucha, C.U., Feller, S.M., Braga, V.M., Birchmeier, W., and Fujita, Y. (2004). Rap1 regulates the formation of E-cadherin-based cell-cell contacts. *Mol Cell Biol* **24**, 6690-6700.
- Ihrie, R.A., Marques, M.R., Nguyen, B.T., Horner, J.S., Papazoglu, C., Bronson, R.T., Mills, A.A., and Attardi, L.D. (2005). Perp is a p63-regulated gene essential for epithelial integrity. *Cell* **120**, 843-856.
- Ishizaki, T., Uehata, M., Tamechika, I., Keel, J., Nonomura, K., Maekawa, M., and Narumiya, S. (2000). Pharmacological Properties of Y-27632, a Specific Inhibitor of Rho-Associated Kinases. *Mol Pharmacol* **57**, 976-983.
- Izumi, G., Sakisaka, T., Baba, T., Tanaka, S., Morimoto, K., and Takai, Y. (2004). Endocytosis of E-cadherin regulated by Rac and Cdc42 small G proteins through IQGAP1 and actin filaments. *J Cell Biol* **166**, 237-248.
- Jaffe, A.B., and Hall, A. (2005). Rho GTPases: Biochemistry and Biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **21**, 247-269.
- Just, I., Mohr, C., Schallehn, G., Menard, L., Didsbury, J.R., Vandekerckhove, J., van Damme, J., and Aktories, K. (1992). Purification and characterization of an ADP-ribosyltransferase produced by *Clostridium limosum*. *J Biol Chem* **267**, 10274-10280.
- Just, I., Selzer, J., Wilm, M., Eichel-Streiber, C.v., Mann, M., and Aktories, K. (1995). Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* **375**, 500-503.
- Just, I., Selzer, J., Hofmann, F., Green, G.A., and Aktories, K. (1996). Inactivation of Ras by *Clostridium sordellii* Lethal Toxin-catalyzed Glucosylation. *J Biol Chem* **271**, 10149-10153.
- Kanno, M., Isa, Y., Aoyama, Y., Yamamoto, Y., Nagai, M., Ozawa, M., and Kitajima, Y. (2008). p120-catenin is a novel desmoglein 3 interacting

- partner: Identification of the p120-catenin association site of desmoglein 3. *Experimental Cell Research* **314**, 1683-1692.
- Kim, S.H., Li, Z., and Sacks, D.B.** (2000). E-cadherin-mediated cell-cell attachment activates Cdc42. *J Biol Chem* **275**, 36999-37005.
- Kitajima, Y., Aoyama, Y., and Seishima, M.** (1999). Transmembrane signaling for adhesive regulation of desmosomes and hemidesmosomes, and for cell-cell detachment induced by pemphigus IgG in cultured keratinocytes: involvement of protein kinase C. *J Invest Dermatol Symp Proc* **4**, 137-144.
- Koch, P.J., Walsh, M.J., Schmelz, M., Goldschmidt, M.D., Zimbelmann, R., and Franke, W.W.** (1990). Identification of desmoglein, a constitutive desmosomal glycoprotein, as a member of the cadherin family of cell adhesion molecules. *Eur J Cell Biol* **53**, 1-12.
- Koulu, L., Kusumi, A., Steinberg, M.S., Klaus-Kovtun, V., and Stanley, J.R.** (1984). Human autoantibodies against a desmosomal core protein in pemphigus foliaceus. *J Exp Med* **160**, 1509-1518.
- Kovacs, E.M., Ali, R.G., McCormack, A.J., and Yap, A.S.** (2002). E-cadherin homophilic ligation directly signals through Rac and phosphatidylinositol 3-kinase to regulate adhesive contacts. *J Biol Chem* **277**, 6708-6718.
- Kozma, R., Ahmed, S., Best, A., and Lim, L.** (1995). The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* **15**, 1942-1952.
- Kuma, Y., Sabio, G., Bain, J., Shpiro, N., Marquez, R., and Cuenda, A.** (2005). BIRB796 Inhibits All p38 MAPK Isoforms in Vitro and in Vivo. *J Biol Chem* **280**, 19472-19479.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lanza, A., Cirillo, N., Rossiello, R., Rienzo, M., Cutillo, L., Casamassimi, A., de Nigris, F., Schiano, C., Rossiello, L., Femiano, F., et al.** (2008). Evidence of Key Role of Cdk2 Overexpression in Pemphigus Vulgaris. *J Biol Chem* **283**, 8736-8745.
- Lever, W.F.** (1953). Pemphigus. *Medicine (Baltimore)* **32**, 1-123.
- Lever, W.F., and Schaumburg-Lever, G.** (1984). Treatment of pemphigus vulgaris. Results obtained in 84 patients between 1961 and 1982. *Arch Dermatol* **120**, 44-47.
- Lozano, E., Frasa, M.A.M., Smolarczyk, K., Knaus, U.G., and Braga, V.M.M.** (2008). PAK is required for the disruption of E-cadherin adhesion by the small GTPase Rac. *J Cell Sci* **121**, 933-938.
- Magie, C.R., Pinto-Santini, D., and Parkhurst, S.M.** (2002). Rho1 interacts with p120ctn and {alpha}-catenin, and regulates cadherin-based adherens junction components in Drosophila. *Development* **129**, 3771-3782.
- Mahoney, M.G., Wang, Z., Rothenberger, K., Koch, P.J., Amagai, M., and Stanley, J.R.** (1999a). Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. *J Clin Invest* **103**, 461-468.

- Mahoney, M.G., Wang, Z.H., and Stanley, J.R.** (1999b). Pemphigus Vulgaris and Pemphigus Foliaceus Antibodies are Pathogenic in Plasminogen Activator Knockout Mice. *113*, 22-25.
- Mahoney, M.G., Hu, Y., Brennan, D., Bazzi, H., Christiano, A.M., and Wahl, J.K., 3rd** (2006). Delineation of diversified desmoglein distribution in stratified squamous epithelia: implications in diseases. *Exp Dermatol* **15**, 101-109.
- Marques, M.R., Ihrie, R.A., Horner, J.S., and Attardi, L.D.** (2006). The requirement for *perp* in postnatal viability and epithelial integrity reflects an intrinsic role in stratified epithelia. *J Invest Dermatol* **126**, 69-73.
- Menon, G.K., Grayson, S., and Elias, P.M.** (1985). Ionic Calcium Reservoirs in Mammalian Epidermis: Ultrastructural Localization by Ion-Capture Cytochemistry. *J Invest Dermatol* **84**, 508-512.
- Millard, T.H., Sharp, S.J., and Machesky, L.M.** (2004). Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex. *Biochem J* **380**, 1-17.
- Mohan, C., Kim, Y.-G., Gyun, J.K., and Lee, M.** (2008). Assessment of cell engineering strategies for improved therapeutic protein production in CHO cells. *Biotechnology Journal* **3**, 624-630.
- Müller, E.J., Williamson, L., Kolly, C., and Suter, M.M.** (2008). Outside-in Signaling through Integrins and Cadherins: A Central Mechanism to Control Epidermal Growth and Differentiation? *J Invest Dermatol* **128**, 501-516.
- Nagar, B., Overduin, M., Ikura, M., and Rini, J.M.** (1996). Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature* **380**, 360-364.
- Nakamura, K., Tanaka, T., Kuwahara, A., and Takeo, K.** (1985). Microassay for proteins on nitrocellulose filter using protein dye-staining procedure. *Analytical Biochemistry* **148**, 311-319.
- Ndoye, A., Buchli, R., Greenberg, B., Nguyen, V.T., Zia, S., Rodriguez, J.G., Webber, R.J., Lawry, M.A., and Grando, S.A.** (1998). Identification and mapping of keratinocyte muscarinic acetylcholine receptor subtypes in human epidermis. *J Invest Dermatol* **111**, 410-416.
- Nguyen, V.T., Ndoye, A., and Grando, S.A.** (2000a). Novel human alpha9 acetylcholine receptor regulating keratinocyte adhesion is targeted by Pemphigus vulgaris autoimmunity. *Am J Pathol* **157**, 1377-1391.
- Nguyen, V.T., Ndoye, A., Shultz, L.D., Pittelkow, M.R., and Grando, S.A.** (2000b). Antibodies against keratinocyte antigens other than desmogleins 1 and 3 can induce pemphigus vulgaris-like lesions. *J Clin Invest* **106**, 1467-1479.
- Nguyen, V.T., Arredondo, J., Chernyavsky, A.I., Kitajima, Y., Pittelkow, M., and Grando, S.A.** (2004). Pemphigus vulgaris IgG and methylprednisolone exhibit reciprocal effects on keratinocytes. *J Biol Chem* **279**, 2135-2146.
- Noda, M., Yasuda-Fukazawa, C., Moriishi, K., Kato, T., Okuda, T., Kurokawa, K., and Takuwa, Y.** (1995). Involvement of rho in GTP[gamma]S-induced enhancement of phosphorylation of 20 kDa myosin light chain in vascular smooth muscle cells: inhibition of phosphatase activity. *FEBS Letters* **367**, 246-250.

- Noren, N.K., Liu, B.P., Burrridge, K., and Kreft, B. (2000). p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *J Cell Biol* **150**, 567-580.
- Noren, N.K., Niessen, C.M., Gumbiner, B.M., and Burrridge, K. (2001). Cadherin engagement regulates Rho family GTPases. *J Biol Chem* **276**, 33305-33308.
- Nusrat, A., Giry, M., Turner, J.R., Colgan, S.P., Parkos, C.A., Carnes, D., Lemichez, E., Boquet, P., and Madara, J.L. (1995). Rho protein regulates tight junctions and perijunctional actin organization in polarized epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10629-10633.
- Pertz, O., Bozic, D., Koch, A.W., Fauser, C., Brancaccio, A., and Engel, J. (1999). A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *EMBO J* **18**, 1738-1747.
- Prajapati, V., and Mydlarski, P.R. (2008). Advances in pemphigus therapy. *Skin Therapy Lett* **13**, 4-7.
- Puck, T.T. (1957). The genetics of somatic mammalian cells. *Adv Biol Med Phys* **5**, 75-101.
- Puviani, M., Marconi, A., Cozzani, E., and Pincelli, C. (2003). Fas ligand in pemphigus sera induces keratinocyte apoptosis through the activation of caspase-8. *J Invest Dermatol* **120**, 164-167.
- Rajasekaran, S.A., Palmer, L.G., Moon, S.Y., Peralta Soler, A., Apodaca, G.L., Harper, J.F., Zheng, Y., and Rajasekaran, A.K. (2001). Na,K-ATPase activity is required for formation of tight junctions, desmosomes, and induction of polarity in epithelial cells. *Mol Biol Cell* **12**, 3717-3732.
- Rickman, L., Simrak, D., Stevens, H.P., Hunt, D.M., King, I.A., Bryant, S.P., Eady, R.A., Leigh, I.M., Arnemann, J., Magee, A.I., et al. (1999). N-terminal deletion in a desmosomal cadherin causes the autosomal dominant skin disease striate palmoplantar keratoderma. *Hum Mol Genet* **8**, 971-976.
- Ridley, A.J., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**, 389-399.
- Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**, 401-410.
- Rittinger, K., Walker, P.A., Eccleston, J.F., Nurmahomed, K., Owen, D., Laue, E., Gamblin, S.J., and Smerdon, S.J. (1997). Crystal structure of a small G protein in complex with the GTPase-activating protein rhoGAP. *Nature* **388**, 693-697.
- Rossmann, K.L., Der, C.J., and Sondek, J. (2005). GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 167-180.
- Rubenstein, D.S., and Diaz, L.A. (2006). Pemphigus antibody induced phosphorylation of keratinocyte proteins. *Autoimmunity* **39**, 577-586.
- Ruiz, P., Brinkmann, V., Ledermann, B., Behrend, M., Grund, C., Thalhammer, C., Vogel, F., Birchmeier, C., Gunthert, U., Franke, W.W., et al. (1996). Targeted mutation of plakoglobin in mice reveals

- essential functions of desmosomes in the embryonic heart. *J Cell Biol* **135**, 215-225.
- Sánchez-Carpintero, I., España, A., Pelacho, B., López Moratalla, N., Rubenstein, D.S., Diaz, L.A., and López-Zabalza, M.J.** (2004). In vivo blockade of pemphigus vulgaris acantholysis by inhibition of intracellular signal transduction cascades. *British Journal of Dermatology* **151**, 565-570.
- Scherle, P., Behrens, T., and Staudt, L.M.** (1993). Ly-GDI, a GDP-dissociation inhibitor of the RhoA GTP-binding protein, is expressed preferentially in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7568-7572.
- Schmandke, A., and Strittmatter, S.M.** (2007). ROCK and Rho: biochemistry and neuronal functions of Rho-associated protein kinases. *Neuroscientist* **13**, 454-469.
- Schmidt, E., Brocker, E.B., and Zillikens, D.** (2000). [Pemphigus. Loss of desmosomal cell-cell contact]. *Hautarzt* **51**, 309-318.
- Schmidt, G., Sehr, P., Wilm, M., Selzer, J., Mann, M., and Aktories, K.** (1997). Gln 63 of Rho is deamidated by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor-1. *Nature* **387**, 725-729.
- Seishima, M., Satoh, S., Nojiri, M., Osada, K., and Kitajima, Y.** (1997). Pemphigus IgG induces expression of urokinase plasminogen activator receptor on the cell surface of cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* **109**, 650-655.
- Sharma, P., Mao, X., and Payne, A.S.** (2007). Beyond steric hindrance: The role of adhesion signaling pathways in the pathogenesis of pemphigus. *Journal of Dermatological Science* **48**, 1-14.
- Stanley, J.R., Yaar, M., Hawley-Nelson, P., and Katz, S.I.** (1982). Pemphigus antibodies identify a cell surface glycoprotein synthesized by human and mouse keratinocytes. *J Clin Invest* **70**, 281-288.
- Stanley, J.R., and Amagai, M.** (2006). Pemphigus, Bullous Impetigo, and the Staphylococcal Scalded-Skin Syndrome. *N Engl J Med* **355**, 1800-1810.
- Syed, S.E., Trinnaman, B., Martin, S., Major, S., Hutchinson, J., and Magee, A.I.** (2002). Molecular interactions between desmosomal cadherins. *Biochem J* **362**, 317-327.
- Takaishi, K., Sasaki, T., Kotani, H., Nishioka, H., and Takai, Y.** (1997). Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells. *J Cell Biol* **139**, 1047-1059.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354.
- Tselepis, C., Chidgey, M., North, A., and Garrod, D.** (1998). Desmosomal adhesion inhibits invasive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8064-8069.
- Tsunoda, K., Ota, T., Aoki, M., Yamada, T., Nagai, T., Nakagawa, T., Koyasu, S., Nishikawa, T., and Amagai, M.** (2003). Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. *J Immunol* **170**, 2170-2178.
- Ueda, T., Kikuchi, A., Ohga, N., Yamamoto, J., and Takai, Y.** (1990). Purification and characterization from bovine brain cytosol of a novel

- regulatory protein inhibiting the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to rhoB p20, a ras p21-like GTP-binding protein. *J Biol Chem* **265**, 9373-9380.
- Uitto, J., Richard, G., and McGrath, J.A.** (2007). Diseases of epidermal keratins and their linker proteins. *Experimental Cell Research* **313**, 1995-2009.
- Volberg, T., Geiger, B., Kartenbeck, J., and Franke, W.W.** (1986). Changes in membrane-microfilament interaction in intercellular adherens junctions upon removal of extracellular Ca²⁺ ions. *J Cell Biol* **102**, 1832-1842.
- Wang, X., Bregegere, F., Frusic-Zlotkin, M., Feinmesser, M., Michel, B., and Milner, Y.** (2004). Possible apoptotic mechanism in epidermal cell acantholysis induced by pemphigus vulgaris autoimmunoglobulins. *Apoptosis* **9**, 131-143.
- Waschke, J., Bruggeman, P., Baumgartner, W., Zillikens, D., and Drenckhahn, D.** (2005). Pemphigus foliaceus IgG causes dissociation of desmoglein 1-containing junctions without blocking desmoglein 1 transinteraction. *J Clin Invest* **115**, 3157-3165.
- Waschke, J., Menendez-Castro, C., Bruggeman, P., Koob, R., Amagai, M., Gruber, H.J., Drenckhahn, D., and Baumgartner, W.** (2007). Imaging and force spectroscopy on desmoglein 1 using atomic force microscopy reveal multivalent Ca(2+)-dependent, low-affinity trans-interaction. *J Membr Biol* **216**, 83-92.
- Waschke, J.** (2008). The desmosome and pemphigus. *Histochem Cell Biol* **130**, 21-54.
- Whitehead, T.P., Kricka, L.J., Carter, T.J., and Thorpe, G.H.** (1979). Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. *Clin Chem* **25**, 1531-1546.
- Wildenberg, G.A., Dohn, M.R., Carnahan, R.H., Davis, M.A., Lobdell, N.A., Settleman, J., and Reynolds, A.B.** (2006). p120-Catenin and p190RhoGAP Regulate Cell-Cell Adhesion by Coordinating Antagonism between Rac and Rho. *Cell* **127**, 1027-1039.
- Wilgram, G.F., Caulfield, J.B., and Lever, W.F.** (1961). An electron microscopic study of acantholysis in pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol* **36**, 373-382.
- Wilgram, G.F., Caulfield, J.B., and Madgic, E.B.** (1964). An Electron Microscopic Study of Acantholysis and Dyskeratosis in Pemphigus Foliaceus: With a Special Note on Peculiar Intracytoplasmic Bodies. *J Invest Dermatol* **43**, 287-299.
- Williamson, L., Raess, N.A., Caldelari, R., Zakher, A., de Bruin, A., Posthaus, H., Bolli, R., Hunziker, T., Suter, M.M., and Muller, E.J.** (2006). Pemphigus vulgaris identifies plakoglobin as key suppressor of c-Myc in the skin. *EMBO J* **25**, 3298-3309.
- Windoffer, R., Borchert-Stuhltrager, M., and Leube, R.E.** (2002). Desmosomes: interconnected calcium-dependent structures of remarkable stability with significant integral membrane protein turnover. *J Cell Sci* **115**, 1717-1732.
- Wolf, A., Keil, R., Gotzl, O., Mun, A., Schwarze, K., Lederer, M., Huttelmaier, S., and Hatzfeld, M.** (2006). The armadillo protein p0071 regulates Rho signalling during cytokinesis. *Nat Cell Biol* **8**, 1432-1440.

- Wolf, R., Tamir, A., and Brenner, S.** (1991). Drug-induced versus drug-triggered pemphigus. *Dermatologica* **182**, 207-210.
- Xue, W., Hashimoto, K., and Toi, Y.** (1998). Functional involvement of urokinase-type plasminogen activator receptor in pemphigus acantholysis. *J Cutan Pathol* **25**, 469-474.
- Yamamoto, Y., Aoyama, Y., Shu, E., Tsunoda, K., Amagai, M., and Kitajima, Y.** (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.
- Yang, C., and Kazanietz, M.G.** (2007). Chimaerins: GAPs that bridge diacylglycerol signalling and the small G-protein Rac. *Biochem J* **403**, 1-12.
- Yap, A.S., Brieher, W.M., and Gumbiner, B.M.** (1997). Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **13**, 119-146.
- Yin, T., Getsios, S., Caldelari, R., Kowalczyk, A.P., Muller, E.J., Jones, J.C., and Green, K.J.** (2005). Plakoglobin suppresses keratinocyte motility through both cell-cell adhesion-dependent and -independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 5420-5425.
- Zhu, X., and Zhang, B.** (2007). Paraneoplastic pemphigus. *The Journal of Dermatology* **34**, 503-511.
- Zhurinsky, J., Shtutman, M., and Ben-Ze'ev, A.** (2000). Plakoglobin and beta-catenin: protein interactions, regulation and biological roles. *J Cell Sci* **113 (Pt 18)**, 3127-3139.

7 *Anhang*

7.1 *Abkürzungsverzeichnis*

µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ÄMP	Äußere Membranplaque
APS	Ammoniumperoxydisulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BSA	Rinderserumalbumin
C2INC3	C3-Transferase-Fusionsprotein
Ca ²⁺	Calcium
CAR	Zelladhäsionserkennungsstelle
CDK	Cyclin-dependent kinase
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CHO-Zellen	Chinesische Hamsteroarialzellen
CK14	Zytokeratin 14
CNF-1	Cytotoxic necrotizing factor 1
CNFy	Cytotoxic necrotizing factor y
Cy3	Indocarbocyanin
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eaglemedium
DMP	Dimethylpimelimidat
Dsc	Desmocollin
Dsg	Desmoglein
EC	Extrazellulärdomäne
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
F-Aktin	Filamentäres Aktin
FCS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
gam	Goat anti-mouse
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
garb	Goat anti-rabbit
GDI	Guanosin-Nukleotid-Austauschinhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanosin-Nukleotid-Austauschfaktor
GST	Gluthation-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphat -Hydrolase

h	Stunde
H.E.	Hämatoxylin und Eosin
HaCaT-Zellen	Human adult low calcium elevated temperature-Zellen
HbSS	Hank's gepufferte Salzlösung
HSP27	Hitzeschockprotein 27
IF	Immunfluoreszenzmikroskopie
IgG	Immunglobulin G
IMP	Innere Membranplaque
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LT	Letales Toxin
M	Molar [g/mol]
mA	Milliampere
Mg ²⁺	Magnesium
min	Minute
ml	Milliliter
MLC	Myosin-Leichtketten
MLCP	MLC-Phosphatase
mm	Millimeter
MP	Mesophragma
MTT	3-[4,5-Dimethyldiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolimbromid
Nd:Yag	Neodym-dotiertes Yttrium-Aluminium-Granat
NGS	Normales Ziegen Serum
NH-IgG	Normales humanes IgG einer gesunden Testperson
NPG	N-Propylgallat
p38MAPK	p38 Mitogen-aktivierte Kinase
PA	Plasminogenaktivator
PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
PAK	p21-aktivierte Kinase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PF	Pemphigus foliaceus
PFA	Paraformaldehyd
PF-IgG	Pemphigus foliaceus-Immunglobulin G
pH	pH-Wert
PKC	Proteinkinase C
PKP	Plakophilin
PLC	Phospholipase C
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POX	Meerrettichperoxidase
PPL	Prestained protein ladder
PV	Pemphigus vulgaris

PV-IgG	Pemphigus vulgaris-Immunglobulin G
Ras	Rat sarcoma
Rho	Ras homolog
ROCK	Rho associated coiled-coil containing protein kinases
RT	Raumtemperatur
SB	Stratum basale
SC	Stratum corneum
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SG	Stratum granulosum
SS	Stratum spinosum
SSSS	Staphylococcal scalded skin syndrome
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethyldiamin
U	Umdrehungen
U	Units
uPAR	Urokinase-Typ-Plasminogenaktivatorrezeptor
V	Volt
W	Watt
WASP	Wiscott-Aldrich-Syndrom-Protein

7.2 Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Dr. Drenckhahn für die Überlassung des Themas und die stete Gewissheit um die volle Unterstützung und Anerkennung seinerseits.

Meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Waschke bin ich sehr dankbar für seinen unermüdlichen Einsatz für das Vorantreiben, die Planung und die Organisation der Arbeit. Mit einem stets offenen Ohr und durch seine Anregungen, Hilfestellungen sowie Lob und konstruktive Kritik gelang es ihm, meine Begeisterung für wissenschaftliche Arbeit zu wecken und meine Motivation und Neugier aufrecht zu erhalten.

Großer Dank gebührt ebenfalls den Mitarbeitern und naturwissenschaftlichen Doktoranden der Anatomie für ihre Unterstützung und ihre Geduld bei der Weitergabe ihres Wissens über die technische Umsetzung der Versuche, namentlich Fr. Stefanie Imhof, Fr. Gabriele Königer, Fr. Nadja Niedermeier, Fr. Agnes Weth und Fr. Dr. Paola Bruggeman sowie allen anderen Mitarbeitern der Anatomie. Ebenfalls vielen herzlichen Dank an die studentischen Mitarbeiter Fr. Marion Abele und Fr. Franziska König für die Unterstützung bei den Kryoschnitt-Experimenten.

Mein herzlicher Dank geht auch an die weiteren medizinischen Doktoranden Fr. Sabrina Burger, Fr. Nina Harke und Fr. Katharina Müller-Marschhausen. Ich werde die vielen schönen Stunden während und nach der Arbeit nicht vergessen.

Ich danke meinen Eltern, die mir dieses Studium und somit die Promotion ermöglicht haben.

Der größte Dank und Respekt gebührt aber meiner damaligen Freundin und jetzigen Frau Daniela, die mich immer bedingungs- und selbstlos unterstützt und auch die Zeiten häufiger und längerer laborbedingter Abwesenheit von Zuhause verständnisvoll und vorwurfsfrei mitgetragen hat.