

Aus der Klinik und Poliklinik
für Haut- und Geschlechtskrankheiten
der Universität Würzburg
Direktorin: Prof. Dr. med. Eva-B. Bröcker

**Untersuchung der Pathogenität von Autoantikörpern beim bullösen
Pemphigoid unter Verwendung von kultivierten humanen
Keratinozyten**

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Barbara Wehr
aus Würzburg
Würzburg, im März 2007

Referent: Prof. Dr. Detlef Zillikens

Koreferentin: Prof. Dr. Eva-B. Bröcker

Dekan: Prof. Dr.M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 13.08.2007

Die Promovendin ist Ärztin.

*meinen Eltern
in Liebe und Dankbarkeit
gewidmet*

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

2. Fragestellung

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Patienten

3.1.2 Positiv- und Negativkontrollen

3.1.3 Keratinozytenkultur

3.1.4 Antikörper

3.2 Methoden

3.2.1 Bestimmung von Plasminogenaktivatoren und Plasminogenaktivatorinhibitor 1 in Zellkulturüberständen

3.2.2 Bestimmung von Gelatinase A und B in Zellkulturüberständen

3.2.3 Einfluß von Calcium auf basale humane Keratinozyten

4. Ergebnisse

4.1 Bestimmung von Plasminogenaktivatoren und Plasminogenaktivatorinhibitor 1
in Zellkulturüberständen

4.2 Bestimmung von Gelatinase A und B in Zellkulturüberständen

4.3 Einfluß von Calcium auf basale humane Keratinozyten

5. Diskussion

5.1 Bestimmung von Plasminogenaktivatoren und Plasminogenaktivatorinhibitor 1
in Zellkulturüberständen

5.2 Bestimmung von Gelatinase A und B in Zellkulturüberständen

5.3 Einfluß von Calcium auf basale humane Keratinozyten

6. Schlussfolgerung

7. Zusammenfassung

8. Literaturverzeichnis

9. Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung

Das bullöse Pemphigoid (BP) ist eine blasenbildende Autoimmundermatose des älteren Menschen (Schmidt et Zillikens, 2000; Zillikens et al, 2005). Mit 6 Neuerkrankungen pro 1 Mio Einwohner pro Jahr ist das BP mit Abstand der häufigste Vertreter dieser Krankheitsgruppe (Zillikens et al, 1995). Die Inzidenz der Erkrankung steigt ab dem 60. Lebensjahr deutlich an, wobei das männliche Geschlecht häufiger betroffen ist. In der Gruppe der über 90-jährigen Männer liegt die Inzidenz bei 400 jährlichen Neuerkrankungen pro 1 Mio Einwohner (Jung et al, 1999).

In der direkten Immunfluoreszenz periläsionaler Haut zeigen sich Ablagerungen von IgG und C3 an der dermo-epidermalen Junktionszone. In der indirekten Immunfluoreszenz auf mit 1M NaCl separierter humaner Haut können bei ca. 80% der Patienten zirkulierende Autoantikörper nachgewiesen werden, die v.a. der IgG-Subklasse 4, gefolgt von IgG1 und IgG 3 angehören (Kelly et al, 1989). Diese Autoantikörper sind gegen zwei hemidesmosomale Strukturproteine, BP180 und BP230, gerichtet (Zillikens, 1999). Die Mehrzahl der Patienten reagiert gegen beide Antigene, jedoch werden Fälle mit selektiver Reaktivität gegen eines der beiden Proteine beobachtet.

Bei BP230 handelt es sich um ein intrazelluläres Protein, das Bestandteil des hemidesmosomalen Plaques ist. Es gehört zur Familie der Plakine, weist große Homologie mit Plakin auf und stellt eine Verbindung zu den Intermediärfilamenten des Zytoskeletts her (Schmidt et al, 2000a). Seine Bedeutung wird v.a. im Zusammenhang mit durch Autoantikörper gegen BP180 vorgeschädigten Zellen gesehen (Hall et al, 1993).

BP180, auch Kollagen Typ XVII genannt, ist dagegen ein transmembranöses Glykoprotein mit Typ-II-Orientierung, d.h. der N-Terminus befindet sich intra-, der C-Terminus extrazellulär (Zillikens, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass dieses Molekül aus einem globulären Kopfteil, einem stabartigen zentralen Anteil und einem flexiblen Ende besteht (Hirako et al, 1996). Die intrazelluläre Domäne interagiert mit Proteinen des hemidesmosomalen Plaques der basalen Keratinozyten. Die extrazelluläre Domäne von BP180 besteht aus 15 unterbrochenen Kollagen-Domänen und 16 nicht-kollagenen Domänen. Die Ektodomäne durchzieht die Lamina lucida bis in die Lamina densa und biegt sich dann wieder in die Lamina lucida zurück (Nonaka et al, 2000). Die 16. direkt außerhalb der Zellmembran gelegene nicht-kollagene Domäne (NC16A) wurde in 5 Regionen zu je 15 Aminosäuren (AS) unterteilt (Zillikens et al, 1997). Sie wurde als eine immundominante Region von BP180 identifiziert. Ca. 90% der BP-Patienten bilden Autoantikörper gegen diese Region (Zillikens et al, 1997), 20% der Patienten hingegen gegen andere Epitope der Ektodomäne (Perriard et al, 1999). Die gegen NC16A gerichteten Antikörper gehören v.a. der IgG-Subklasse 4 und IgE an (Döpp et al, 2000).

Weitere Arbeiten zeigten, dass die Krankheitsaktivität der Patienten mit den Serumspiegeln der Autoantikörper gegen BP180 NC16A korreliert, nicht jedoch mit dem Autoantikörpertiter der indirekten Immunfluoreszenz auf NaCl-separierter Spalthaut (Schmidt et al, 2000b). Diese Beobachtung könnte dadurch erklärt werden, dass beim BP die Immunfluoreszenz-Reaktivität in erster Linie durch Antikörper gegen BP230 und nur zu einem geringeren Teil durch Antikörper gegen BP180 vermittelt wird (Pas et al, 1995).

Es gibt experimentelle Hinweise darauf, dass innerhalb basaler Keratinozyten BP180 in zwei Formen vorliegt. In der basalen-ventralen Plasmamembran ist BP180 an Keratinfilamente gebunden und zusammen mit BP230 am Aufbau der

Hemidesmosomen beteiligt. Desweiteren findet sich in der apiko-lateralen Plasmamembran eine Ansammlung von BP180, die nicht an Keratinfilamente gebunden zu sein scheint und als eine Art „Vorratslager“ betrachtet wird (Kitajima et al, 1992). Calcium ist ein „2nd-messenger“, dessen physiologische Effekte vor allem auf der posttranslationalen Modifikation von Proteinen oder Enzymaktivitäten beruhen (Jensen et al, 1990). Es ist essentiell für die Zellteilung und –differenzierung. Bei Keratinozyten liegt das Optimum der Calciumkonzentration für die Zellteilung bei 0,3 mM; maximale Stratifikation und Ausdifferenzierung werden bei 1,0 mM Calcium im Medium festgestellt (Boyce et al, 1983).

Neben der Bindung der Autoantikörper sind beim BP, anders als beim Pemphigus, weitere Faktoren für die subepidermale Spaltbildung verantwortlich. Hierzu zählen Komplementaktivierung, die Infiltration von Entzündungszellen und die Sekretion von Proteasen und Entzündungsmediatoren (Schmidt et al, 2000a). Zuerst beobachtet man eine Degranulation von Mastzellen in der Nähe der Basalmembran, gefolgt von der Einwanderung mononukleärer Zellen. Diese bestehen zum größten Teil aus T-Zellen, wobei das Verhältnis CD4/CD8 etwa 2:1 beträgt (Ambach et al, 1992). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die CD4-Zellen der Subklasse Th2 angehören, deren Zytokine Interleukin (IL)-4 und IL-5 in erster Linie für das konsekutive Einwandern von Eosinophilen und Neutrophilen verantwortlich gemacht werden. Die aus diesen Zellen freigesetzten Enzyme werden als Ursache für die Entzündungsreaktion betrachtet. In den Blasenflüssigkeiten von BP-Patienten fanden sich erhöhte Spiegel von Zytokinen z.B. TNF α (Zillikens et al, 1994; Ameglio et al, 1997), IFN γ (Ameglio et al, 1998), IL-1 β (Schmidt et al, 1996; Ameglio et al, 1998), IL-2 (Ameglio et al, 1998), IL-4 (Ameglio et al, 1998; Schmidt et al, 1996), IL-5 (Ameglio et al, 1998), IL-6, IL-8 (Ameglio et al, 1998; Schmidt et al, 1996), IL-10 (Schmidt et al, 1996) und sCD 23 (Schmidt et al, 1995), des weiteren vermehrt lösliche Rezeptoren für TNF α (Zentner et al, 1994) und IL-2 (Zillikens et al, 1994). Auch im Serum von Patienten wurden erhöhte

Interleukinwerte gemessen. Die Präsenz dieser Vielzahl von inflammatorischen Mediatoren könnte das Einwandern von Entzündungszellen triggern und somit ein Mikromilieu für die Sekretion von Proteasen herstellen. Es konnte bereits in zahlreichen Arbeiten gezeigt werden, dass die Freisetzung von Proteasen wichtig bei der Blasenentstehung des BP ist (Naito et al, 1982; Gammon et al, 1982; Liu et al, 1998; 1999; 2000). Neben Gelatinase B (Liu et al, 1998) und α 1-Antitrypsin (Liu et al, 2000), gab es auch bei Plasminogenaktivatoren (PA) Hinweise auf ihre Beteiligung an der Pathogenese des BP (Liu et al, 2005).

Unklar ist noch die Frage, welche Rolle basale Keratinozyten in diesem Entzündungsprozess spielen. Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass durch die Stimulation kultivierter humaner Keratinozyten mit Autoantikörpern gegen BP180 erhöhte Spiegel von IL-6 und IL-8, aber nicht von IL-1 α , IL-1 β , TNF α , IL-10 oder MCP-1 im Kulturmedium nachgewiesen werden konnten (Schmidt et al, 2000c), stellte sich die Frage nach der Sekretion von Proteasen durch diese Zellen.

2. Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Pathogenität der Autoantikörper von Patienten mit bullösem Pemphigoid (BP) zu untersuchen. Dabei konzentrierten wir uns vor allem auf die Reaktion kultivierter humaner Keratinozyten, die mit affinitätsaufgereinigtem IgG von BP-Patienten und gesunden Normalpersonen inkubiert wurden. Nach Stimulation durch verschiedene Untergruppen von Autoantikörpern bestimmten wir zunächst die Menge von Gewebstyp Plasminogenaktivator (t-PA), Urokinasetyp Plasminogenaktivator (u-PA) und Plasminogenaktivatorinhibitor-1 (PAI-1), sowie von Gelatinase A und B (Matrixmetalloproteinase (MMP) 2 und 9) in Zellkulturüberständen.

Im zweiten Teil der Arbeit gingen wir der Beobachtung nach, dass Calcium die Bildung von Desmosomen im Gegensatz zu Hemidesmosomen begünstigt. Nachdem BP180 Bestandteil von Hemidesmosomen ist, stellte sich uns die Frage, ob Calcium die Expression und Verteilung dieses Proteins in humanen Keratinozyten beeinflusst, und ob sich daraus strukturelle und funktionelle Konsequenzen für diese Zellen ergeben.

3. Material und Methoden

3.1.1 Patienten

Die Serumproben stammten von 5 BP-Patienten, bei denen vor Therapiebeginn mittels direkter Immunfluoreszenz periläsionaler Haut lineare Ablagerungen von IgG und C3 entlang der dermo-epidermalen Junctionszone festgestellt worden waren. In der indirekten Immunfluoreszenz auf mit 1 M NaCl Lösung gespaltener humaner Haut banden IgG Antikörper in Titerbereichen von 1: 640 bis 1: 2560 auf der epidermalen Seite. Im Immunoblott epidermaler Extrakte (Zillikens et al, 1996) reagierten alle Patientenserum ausschließlicly mit BP180, nicht jedoch mit BP230. Außerdem zeigten alle Patientenserum in der Western Blot Analyse (Zillikens et al, 1997) Reaktivität gegen den rekombinanten extrazellulären Anteil der 16. nicht-kollagenen (NC) Domäne von BP180 (BP180 NC16A). Auswahlkriterium waren hohe Spiegel an NC16A-Antikörpern. Bei allen Patienten wurden die Seren bei 300 U/min zentrifugiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -80° C aufbewahrt.

3.1.2 Positiv- und Negativkontrollen

Bei der Messung von t-PA, u-PA und PAI-1 in Keratinozytenüberständen wurden Seren von zwei Kaninchen, R2296 und R8009, die gegen rekombinantes humanes GST-BP180 NC16A 2-4 (Aminosäurenummern 507-562) (Balding et al, 1997; Sitaru et al, 2002) immunisiert worden waren, als Positivkontrollen verwendet. In den Immunfluoreszenzversuchen wurden diese ebenfalls eingesetzt.

Im Rahmen der Bestimmung von LAD-1, der löslichen Ektodomäne von BP180, verwendeten wir das Serum von einem Kaninchen (R136), welches mit einem rekombinanten C-terminalen Abschnitt von BP180, GST-BP180 4575 (Aminosäurenummern 1365-1413), immunisiert worden war.

In der Zymographie und den Western Blots von Gelatinase A und B diente ein 20-fach aufkonzentrierter HT-1080-Überstand (Zellen einer Fibrosarkom-Reihe) als Positivkontrolle.

Zur Bestimmung der Hintergrundspiegel dienten in allen Versuchen Keratinozytenüberstände, die nur mit Keratinocyte Growth Medium mit Hydrocortison (KGM+, Clonetics, La Jolla, CA, USA) inkubiert worden waren. Seren von gesunden Kontrollpersonen und von zwei nicht immunisierten Kaninchen wurden als Negativkontrollen benutzt.

3.1.3 Keratinozytenkultur

Die Isolation der Keratinozyten erfolgte aus neonatalen Vorhäuten, die uns freundlicherweise vom American Hospital Würzburg zur Verfügung gestellt wurden. Bis zur Weiterverarbeitung konnten die Vorhäute für maximal 48 Stunden unter sterilen Bedingungen in Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM; Clonetics, La Jolla, CA, USA) gelagert werden. Zunächst mussten die Vorhäute unter sterilen Bedingungen mit Phosphate Buffered Saline (PBS; 0,01 M Na₂HPO₄, 0,001 M NaH₂PO₄; (Merck, Darmstadt), 0,15 M NaCl, (pH7,2)) gewaschen und in Stücke von maximal 5x5mm geschnitten werden. Anschließend wurden die Präparate mit der Epidermis nach oben für 10-12 h bei 4°C in 0,25% Trypsin (Merck, Darmstadt) eingelegt, um die Epidermis von der Dermis zu separieren. Die abgelöste Epidermis wurde steril zerkleinert und in ein Gemisch aus 1 ml fetalem Kälberserum (FCS; Sigma, St Louis, USA) und 5 ml Keratinocyte Growth Medium ohne Hydrocortison (KGM-; Clonetics) gegeben. Anschließend wurden durch wiederholtes Resuspendieren interzelluläre Verbindungen der Keratinozyten gelöst, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Durch Zentrifugation für 10 min bei 1000 U/min konnte der Überstand entfernt werden. Nach Resuspension in 5 ml auf 37°C erwärmtem KGM- erfolgte die Übertragung der Zellen einer Vorhaut in eine 25 cm² Zellkulturflasche (Becton Dickinson, USA). Es folgte eine

Kultivation bei 37°C und 5% CO₂ bis zu einer Konfluenz von 70-80% und der Umsetzung im Verhältnis 1:3 in eine 75 cm² Zellkulturflasche (Beckton Dickinson, USA). Bei den nachfolgenden Versuchen kamen ausschließlich Keratinozyten der 3. Passage zur Anwendung.

Die 3. Passage juveniler Keratinozyten wurde auf Chamber Slides (Nunc, Wiesbaden) bis zu einer Dichte von 70-80% kultiviert. Jeweils 12 h vor Zugabe des Erstantikörpers erfolgte ein Mediumwechsel von KGM+ zu KGM- (Clonetics, La Jolla, CA, USA), um Wechselwirkungen mit der Produktion von Interleukinen (Kirnbauer et al, 1991) auszuschließen. KGM- weist eine Calciumkonzentration von 0,15 mmol/l auf und repräsentiert somit Kulturbedingungen bei einem niedrigen Calciumspiegel. Bei der Hälfte der Proben wurde die Calciumkonzentration des Mediums durch Zugabe von sterilem CaCl₂ (auf 1 ml KGM- 15 µl CaCl₂) auf 1,65 mmol/l erhöht.

3.1.4 Antikörper

Aufreinigung von Gesamt-IgG

Die IgG-Fraktion wurde aus zentrifugierten (10 min bei 3550 U/min) und durch Inkubation für 30 min bei 56°C Komplement-inaktivierten Seren gewonnen.

Gesamt-IgG wurde mittels Protein G Sepharose 4 Säulenchromatografie (Pharmacia AB, Uppsala, Schweden) (Schmidt et al, 2000c) aus humanen Seren isoliert. Die IgG-Aufreinigungen erreichten in der indirekten Immunfluoreszenz auf 1 M NaCl Spalthaut Titer von 1:640 bis 1:51280 und reagierten mit humanem BP180 NC16A in Verdünnungen von 1: 5000 bis 1: 50 000. Aus 2 BP-Seren wurden humane BP180-spezifische Antikörper mittels des AminoLink Plus Immobilisationskits (Pierce, Rockford, IL, USA) (Sitaru et al, 2002) affinitätsaufgereinigt. BP180 NC16A 2-4-spezifische Antikörper wurden mit 0,1 M Glycinpuffer (0,2 M Glycin*HCl, pH 2,8) eluiert und mit Tris-HCl (pH 9) neutralisiert. Zur vollständigen Entfernung dieser

Antikörper waren mindestens vier Aufreinigungsvorgänge nötig. Die Aufkonzentration des Eluats erfolgte bei 3200 U/min über eine Stunde in Ultrafree-30K Filtern (Milipore, Bedford, USA). Die IgG-Konzentration bestimmten wir photometrisch bei 320nm gegen PBS und mittels Bradford Protein Assay (BioRad, Hercules, CA, USA). Das Eluat mit den BP180 NC16A 2-4 spezifischen Antikörpern und der Flow-through mit der BP180 NC16A 2-4 depletierten IgG-Fraktion erreichten auf 1 M NaCl-separierter Spalthaut Titer von 1: 640 bis 1: 1280. Außerdem konnte mittels Immunoblot gezeigt werden, dass eluiertes IgG seine Reaktivität gegen BP180 NC16A behalten hatte. Wie im ELISA gezeigt werden konnte, waren alle IgG-Aufreinigungen frei von IL-8 Reaktivität.

3.2 Methoden

3.2.1 Bestimmung von Plasminogenaktivatoren und Plasminogenaktivator-Inhibitor-1

Tissue-type Plasminogenaktivator (t-PA) ELISA

Zur quantitativen Bestimmung von t-PA wandten wir den ELISA Imulyse-tPA (Biopool International, Umea, Schweden) an. Dieser arbeitete nach dem Prinzip des doppelten Antikörpers (Sandwich-Prinzip), d.h. die Mikrotiterplatten wurden mit anti-humanem t-PA beschichtet. Nach 16-18 h wurde die Hälfte der Mikrotiterplatte mit 150 µl Ziegenanti-human IgG (Prefill N), die andere Hälfte mit anti-human-t-PA IgG (Prefill A) gefüllt. In den Vertiefungen mit Prefill N konnten unspezifische Bindungen eingegangen während in Vertiefungen mit Prefill A das in Standards und Proben enthaltene t-PA gebunden wurde. Dazu erstellten wir durch Verdünnung des lyophilisierten Basisstandarts (500 ng einkettiger t-PA) mit dem im Kit enthaltenen PBS-EDTA-Tween Puffer (PET-Puffer), eine Verdünnungsreihe aus acht Standards im

Konzentrationsbereich von 0 ng/ml bis 30 ng/ml. Die Zellkulturüberstände kamen unverdünnt zum Einsatz. Nach einer Inkubationszeit von 3 h erfolgte die Zugabe des Zweitantikörpers in Form von 50 µl Meerrettichperoxidase-markiertem (HRP) anti-human-t-PA IgG. Im nächsten Schritt wurde 2 h später und nach 4-maligem Waschen mit PET-Puffer nicht gebundene Zweitantikörper entfernt und 200 µl Orthophenylendiamin di-HCL (O.P.D.) als Substrat zugefügt. Eine halbe Stunde später wurde die Reaktion durch 50 µl 4,5 M H₂SO₄ abgestoppt. Die Menge der Farbe, die durch die Oxidation des Substrats durch die Peroxidase entstand, war proportional zur gebundenen t-PA Menge. Die Werte der mit Prefill N beschichteten Vertiefungen mussten von den mit Prefill A beschichteten subtrahiert werden. Die Absorption wurde bei 492 nm (SLT SPECTRA Laborinstrumente, Österreich) gemessen. Der ELISA misst Konzentrationen von 1,5-30 ng/ml t-PA.

Coaset-ELISA

Die Bestimmung der Aktivität von t-PA wurde mit Hilfe des Assays COASET® t-PA der Firma Biogenics (Napa, USA) durchgeführt.

Plasminogen wird durch t-PA zu Plasmin aktiviert. Die Aktivationsrate ist in Anwesenheit von t-PA-Stimulator signifikant erhöht. Die t-PA-Menge wird anhand der amidolytischen Wirkung von Plasmin auf das chromogene Substrat S-2251 bestimmt. Die Freisetzung von p-Nitroanilin (pNA) wird bei 405 nm gemessen. Dabei besteht im Konzentrationsbereich von 0,25 IU/ml bis 10 IU/ml t-PA/ml Plasma eine lineare Korrelation zwischen der Absorptions- und der Konzentrationsänderung.

Zunächst wurde eine halbe Stunde vor Versuchsbeginn eine Mischung aus einem Teil Plasminogen, einem Teil S-2251 und drei Teilen Tris-Puffer erstellt und bei 2-8°C aufbewahrt. Zur Erstellung der Basisstandards wurden nach Herstellerangaben 100µl t-PA/PAI-freies Plasma, 200 µl Acetatpuffer und 20 µl 1 mol/l HCl gemischt und 10 min bei 20-25°C inkubiert. Die Ansäuerung diente dazu, die Inaktivierung von t-PA durch

PAI zu blockieren. Durch anschließende Zugabe von 20 µl 50 IU/ml t-PA und Transfer des Gemischs in 3,5 ml steriles Wasser wurde der Basisstandard von 10 IU/ml hergestellt. Für den Basisstandard von 0 IU/ml wurden der Mischung lediglich 20 µl Tris-Puffer zugefügt und 200 µl der Lösung in 7,0 ml steriles Wasser transferiert. Anschließend wurde eine Standardreihe von 0,25 – 2,5 IU/ml aus den beiden Basisstandards hergestellt. Nach Mischen wurde von den auf Eis aufbewahrten Proben eine Vorverdünnung aus 100 µl der jeweiligen Probe und 3,5 ml destilliertem Wasser gemacht. Verdünnung 1 wurde dann 1:2 mit 0 IU/ml Basisstandard gemischt. In die einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterplatten wurden jeweils 200 µl Probe oder Standard, 200 µl des Plasminogen-S2251-Tris-Puffer Gemischs und 100 µl t-PA-Stimulator Arbeitslösung gegeben. Für die Nullwerte wurde an Stelle des t-PA Stimulators 100 µl Tris-Puffer pipettiert. Nach wiederholtem Mischen wurden die Platten bei 37°C im Brutschrank für 4 h inkubiert. Es folgte die Zugabe von 100 µl 20%iger Essigsäure. Die Farbintensität wurde bei 405 nm (SLT SPECTRA Laborinstrumente, Österreich) bestimmt und die Nullwerte abgezogen.

Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (u-PA) ELISA

Die Bestimmung von u-PA erfolgte mit dem ELISA TintElize u-PA (Biopool, Umea, Schweden). Das Testprinzip folgte dem des t-PA-Assays. Initial mussten in die mit anti-human u-PA beschichteten Vertiefungen jeweils 100 µl PET-Puffer vorgelegt werden. Anschließend wurden aus PET-Puffer und dem Basisstandart 6 Standardverdünnungen im Konzentrationsbereich von 0 – 4,00 ng/ml hergestellt. Die Zellkulturüberstände setzten wir in einer Verdünnung mit demselben Puffer von 1:80 ein. Es folgte eine Inkubationszeit von 2 h. Die Sensitivitätsgrenze des Assays liegt bei 0,1 ng/ml.

Plasminogenaktivatorinhibitor (PAI) ELISA

Zur Bestimmung von PAI-1 in Keratinozytenüberständen verwendeten wir den ELISA TintElize PAI-1 (Biopool, Umea, Schweden). Der Coaliza PAI-1 ist ein Festphasen Enzym-Immunoassay zum Nachweis von Plasminogenaktivatorinhibitor-1 (PAI-1) in biologischen Flüssigkeiten. Mit monoklonalen anti-PAI-1 Antikörpern vorbeschichtete Mikrotiterplatten wurden mit je 220 µl Proben oder PAI-1 Standardlösungen pro Vertiefung in einer Verdünnung von 1:10 inkubiert. Als Verdüner diente ein vorgefertigter Phosphatpuffer mit stabilisierenden Proteinen und EDTA, konserviert mit 0,05% Kathon CG (Diluent S). Die sechs vorgefertigten Basisstandards wiesen Konzentrationen von 5–100 ng/ml auf. Bei diesem Reaktionsschritt wird der in den Proben/Standardlösungen vorhandene PAI-1 während einer Inkubationszeit von 60 min bei 37°C an die feste Phase gebunden. Ungebundene Substanzen wurden durch waschen der Mikrotiterplatten mit einer Waschlösung aus mit 0,17% Kathon CG konserviertem Phosphatpuffer entfernt. Im zweiten Reaktionsschritt wurden 200 µl Meerrettichperoxidase-markiertes (HRP) monoklonales anti-PAI-1 (Konjugat) in einer Verdünnung von 1:25 in die Mikrotiterplattenvertiefungen gegeben. Als Verdüner diente ein mit Proteinen stabilisierter und mit 0,05% Kathon CG konservierter Phosphatpuffer (Diluent K). Bei einer Inkubationszeit von 1 h bei 37°C bindet das Konjugat an die im ersten Reaktionsschritt gebildeten Antigen-Antikörperkomplexe. Ungebundenes Konjugat wurde durch 4-maliges Waschen mit Waschlösung entfernt. Zuletzt wurden 200 µl in Dimethylsulfoxid gelöstes Tetramethylbenzidin als Enzymsubstrat in einer Verdünnung von 1:100 zugegeben. Die Verdünnung erfolgte mittels eines Phosphat-Citratpuffers mit 0,006% H₂O₂ (Diluent S). Die Interaktion des gebundenen Enzyms und des Substrats lässt eine Blaufärbung entstehen, welche sich nach Abstoppen der Reaktion mit 50 µl 2 M H₂SO₄ in Gelb verwandelt. Die Absorptionmessung erfolgt bei 450 nm/690 nm (SLT SPECTRA Laborinstrumente, Österreich). Das Ausmaß der Farbentwicklung ist dem PAI-1 Gehalt der Probe/Standardlösung proportional. Die Sensitivitätsgrenze des Assays liegt bei 2,5 ng/ml.

RNA-Isolation und reverse Transkriptase-PCR

Die Isolation der m-RNA aus Keratinozyten erfolgte mit dem RNeasy Mini Easy Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) unter Verwendung der enthaltenen vorgefertigten Puffer. Das Prinzip des RNeasy basiert auf einer Kombination aus der Möglichkeit zur selektiven Bindung von Membranen auf Silikonbasis und der Geschwindigkeit der Mikrospintechnik. Mit Hilfe eines speziellen stark salzhaltigen Puffersystems können bis zu 100 µg RNA von einer Länge über 200 Basen an die Silikongelmembranen binden. Dadurch wird eine spezifische Anreicherung von mRNA sichergestellt, da die meisten RNA-Nukleotide unter 200 Basen, wie z.B. 5.8S rRNA, 5S rRNA oder tRNAs ausgeschlossen werden. Bei der Lyse und Homogenisierung biologischer Proben wird durch die Anwesenheit von Guanidin-Isothiocyanat (GITC) die sofortige Inaktivierung von RNAsen und damit die Isolation intakter RNA sichergestellt.

Im Versuch wurden die Zellen mit 350 µl RLT-Lysispuffer (mit 10 µl β-Mercaptoethanol pro ml Puffer) aus den je 24 Vertiefungen der Zellkulturplatten gelöst und in Eppendorfgefäße übertragen. Nach Zugabe von 0,5 µl PolyG zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurden die Zellen mechanisch homogenisiert. Das anschließende Hinzufügen von 350 µl 70%igem Ethanol (Bio Rad Laboratories, Hercules, USA) vor dem Transfer der Lösung auf die MiniSpin-Säule sollte angemessene Bindungskonditionen herstellen. Durch Zentrifugation (1 min bei 10 000 U/min) wurden überflüssige Bestandteile der Proben in ein 2 ml Sammelgefäß überführt und verworfen. Anschließend wurde die Säule einmal mit 700 µl RW1 Puffer und zweimal mit 500 µl RPE-Puffer, welcher durch 1:4 Verdünnung des gelieferten Konzentrats mit 95% Ethanol (Bio Rad Laboratories, Hercules, USA) hergestellt worden war gewaschen, um Verunreinigungen zu entfernen und in ein 1,5 ml Gefäß gegeben. Die RNA-Eluation erfolgte durch wiederholte Zugabe von 30 µl RNase-freiem Wasser direkt auf die RNeasy-Membran und Zentrifugation für 1 min bei 10000

U/min. Zur Übersetzung in cDNA wurde SuperScript II RT (Life Techn., Karlsruhe) verwendet. Pro 15 µl Probe kamen 35 µl Mastermix (342 µl RNase freies Wasser, 1360 µl 5*Puffer, 180 µl DTT, 90 µl dNTP, 90 µl Oligo dT, 90 µl Random, 108 µl Superscript II) zum Einsatz.

Auf diesem Weg konnten cDNA-Konzentrationen zwischen 74,9 µg/ml und 376,7 µg/ml erzielt werden. Die so gewonnene cDNA (5 µl) wurde benutzt, um das für t-PA codierende Segment (234 Basenpaare) und das für u-PA codierende Segment (276 Basenpaare) durch PCR zu vermehren. Die PCR wurde freundlicherweise von Dr. M. Tabengwa im Labor der Abteilung für kardiovaskuläre Erkrankungen der Universität von Alabama, Birmingham, AL, USA durchgeführt. Veränderungen der t-PA und u-PA mRNA Menge wurden im relativen Verhältnis zu GAPDH (Glyceraldehydphosphat-Dehydrogenase, einem im benachbarten DNA-Bereich codierten Enzym, das als interne Kontrolle verwendet wurde) mRNA ausgedrückt.

3.2.2 Bestimmung von Gelatinase A und B

Zymographie

Die zur Durchführung der Elektrophorese benötigten Reagenzien und Gerätschaften wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, von der Firma Bio Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) bezogen.

Für Proteine von 50-100 kDa wurden 7,5%ige Trenngele hergestellt. Pro Gel kamen hierzu 1,25 ml 1,5 M Tris/HCl pH 8,8, 50 µl 10% SDS (Merck, Darmstadt), 1,25 ml 30% (Bis)acrylamid (Roth, Karlsruhe), 2,22 ml Aqua bidest., 25 µl 10% Ammoniumpersulfat und 2,5 µl TEMED (beides Sigma, St Louis, USA) zum Einsatz. Zur Detektion der Gelatinasen wurden pro Trenngel 0,4 ml Gelatine (Sigma) nach Erhitzen im 60°C heißem Wasserbad zugegeben. Die 4%igen Sammelgele setzten sich aus je 1,25 ml 0,5M Tris/HCl pH 6,8, 50 µl 10% SDS (Merck), 0,65 ml 30%

(Bis)acrylamid (Roth), 3,05 ml Aqua bidest., 25 µl 10% Ammoniumpersulfat und 5µl TEMED (Sigma) zusammen. Zur Erstellung von 5-fach konzentriertem Laufpuffer wurden 15 g Tris, 72 g Glycerin und 5 g SDS (Merck) in einem Liter Aqua bidest. gelöst und mit HCl auf pH 8,3 eingestellt. Es kommt 1-fach konzentrierter Laufpuffer zum Einsatz. Bei 4°C wurde die Elektrophorese zunächst für 15 min bei 15 mA pro Gel durchgeführt, dann über 1 h bei 20 mA pro Gel. Anschließend wurden die Trenngele dreimal für 10 min in Waschpuffer 1 (12,5 ml Triton-X-100 in 500 ml Aqua bidest.) und zweimal für 10 min in Waschpuffer 2 (25 ml 1 M Tris/HCl pH 7,8, 2,5 ml 1 M CaCl₂ und 0,5 ml Triton-X-100 in 500 ml Aqua bidest) gewaschen. Nach Abgießen des Waschpuffers wurden die Gele über 45 min bei RT gefärbt. Dazu diente eine Mischung aus 0,5 g Coomassie Blau R250, 20 ml Eisessig, 80 ml Methanol und 100 ml Aqua bidest. Anschließend wurden die Zymogramme zweimal 10 min mit Entfärber, bestehend aus 30% Methanol, 10% Eisessig und 60% Aqua bidest., behandelt. Reste des Entfärbers wurden durch 15-minütiges Waschen mit Aqua bidest. entfernt, bevor die Gele getrocknet wurden. Als Resultat erhält man kräftig blau gefärbte Gele. Stellen, an denen Gelatinaseaktivität vorhanden ist, zeigen sich als farblose Banden. Somit erlaubt die Zymographie eine Aussage zu Vorhandensein und Aktivität der Gelatinasen, jedoch keine Quantifizierung derselben.

Sodiumdodecylsulfat-Polyakrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot von Gelatinase A und B

Es wurden 15%ige Sammelgele und 5%ige Trenngele hergestellt. Die benötigten Geräte und Substanzen stammten, wenn nicht anders bezeichnet, von Bio Rad Laboratories (Hercules). Die Zusammensetzung der Polyacrylamidgele war wie folgt: Trenngele: 15% Acrylamid, 0,375 M Tris-(hydromethyl)-aminomethan (Roth), 0,1% Sodiumdodecylsulfat (SDS, Merck), 0,1% Tetramethyldiamin (Sigma), 12µM Ammoniumpersulfat (pH 8,8) (beide Sigma); Sammelgele: 5% Acrylamid, 0,125 M

Tris-(hydromethyl)-aminomethan, 0,1% SDS, 0,2% Tetramethyldiamin, 24 μ M Ammoniumpersulfat (pH 6,8). Die Proben wurden 1:5 mit SDS-Lösung verdünnt eingesetzt. Als Positivkontrolle diente ein HT-1080-Überstand, als Marker wurde ein Kaleidoscope Prestained weight standard (Bio Rad) eingesetzt. Die Gelelektrophorese erfolgte über 2,5 h bei 30 mA pro Gel bei Raumtemperatur (RT); der Transfer auf Nitrozellulose bei 4°C, 30 V und 150 mA ca. 16 h in einem Transferpuffer aus 25 mM Tris-(hydromethyl)-aminomethan, 192 mM Glycin, 20% Methanol (Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland) bei pH 8,3. Der Transfererfolg konnte mittels Fast Green Färbung (Sigma) über 1 min bei RT überprüft werden.

Anschließend wurden die Nitrozellulosemembranen zur Blockierung unspezifischer Bindungen 4 h bei RT in eine 4% Lösung aus Magermilchpulver (Merck) in tris-buffered saline plus Tween-20 (TBST, Sigma) bei pH 7,5 präadsorbiert. Nach 30 min Waschen mit TBST erfolgte die Zugabe des Erstantikörpers. Es wurde ein monoklonaler Maus-anti-human Antikörper (Merck) mit Spezifität sowohl für die latente (72 kDa), als auch für die aktive (66 kDa) Form von Gelatinase A verwendet. Die Konzentration des Antikörpers betrug 1 μ g/ml verdünnt in TBST + 1% bovines Serumalbumin (BSA, Sigma). Der monoklonale Maus-anti-human MMP-9 Antikörper (Onkogene Research Products) mit Spezifität für die latente (92 kDa) und die aktive (78 kDa) Form von Gelatinase B wurde in einer Konzentration von 2 μ g/ml in TBST + 1% BSA eingesetzt. Die Inkubation dieser Antikörper erfolgte in getrennten Versuchen jeweils für 16 h bei 4°C. Nach 3-maligem Waschen der Nitrozellulose für 15 min mit TBST folgte die Zugabe von HRP-markiertem Kaninchen-anti-Maus IgG (DAKO, Glostrup, Dänemark) in der Verdünnung 1:10 000 mit TBST + 1% BSA. Nach einer Inkubationszeit des Zweitantikörpers von 2 h und wiederholtem 3-mal 10-minütigem Waschen mit TBST, wurden die Membranen mit Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB, Sigma) entwickelt.

3.1.3 Einfluß von Calcium auf basale humane Keratinozyten

Interleukin-8 ELISA

Der quantitative Nachweis von IL-8 in Keratinozyten-Überständen erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers (Biosource, Fleurus, Belgien). Zusätzlich benötigte Chemikalien wurden, falls nicht anders bezeichnet, von der Firma Sigma (St. Louis, USA) bezogen. Alle Proben wurden 4-fach eingesetzt.

Dieser Assay arbeitet nach dem Prinzip des doppelten Antikörpers (Sandwich-Prinzip), d.h. das Beschichten der Platte erfolgte für 12-18 h vor Versuchsbeginn mit einer Mischung aus 10 ml PBS (pH 7,4) und 20 µl Coating Antikörper, von der 100 µl in jede Mikrotiterplattenvertiefung pipettiert wurden. Nach dreimaligen Waschen mit jeweils 200 µl Waschpuffer (500 ml PBS+ 500 µl Tween) wurden 300 µl Blockierungslösung (500 ml PBS + 2,5 g BSA, pH 7,4) zugegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Zwischenzeitlich wurde durch Mischen des lyophilisierten Basisstandards mit Assay Diluent (500 ml PBS + 2,5 g BSA + 500 µl Tween20, pH 7,4) eine Standardverdünnungsreihe von 0-1000 pg/ml hergestellt, und die Proben 1:4 ebenfalls mit dem Diluent verdünnt. Nach der Inkubationszeit und fünfmaligem Waschen wurden 100 µl Standards bzw. Proben hinzugefügt. Direkt im Anschluss hieran wurden 50 µl des in 800 µl PBS gelösten und 1:4 mit Assay Diluent verdünnten Detektions-Antikörpers zugegeben und 2 h auf dem Schüttler inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Enzymmarkierung mit je 100 µl einer Mischung aus 10 ml PBS und 4 µl Streptavidin-HRP. Nach 30 min Inkubation und abschließendem Waschen erfolgte die Zugabe von je 100 µl des chromogenen Substrats S2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNa * 2HCl) und nach 30 min Inkubation im Dunkeln für das Abstoppen 50 µl 2 M H₂SO₄. Das Ergebnis wurde bei 405 nm mittels eines elektronischen Spektralphotometers (SLT SPECTRA) abgelesen. Das Sensitivitätslimit des Assays liegt bei 5,0 pg/ml.

Immunfluoreszenz und konfokale Lasermikroskopie kultivierter Keratinozyten

Für die folgenden Versuche wurde jeweils die dritte Passage neonataler Keratinozyten verwendet, in welcher die eine Hälfte der Zellen für 12 h dem Einfluß eines Mediums mit einem Calciumgehalt von 1,65 mM ausgesetzt wurde, während die zweite Hälfte weiterhin in Standardmedium mit 0,15 mM Calcium inkubiert wurde. Um durch unterschiedliche Wachstumsraten potentiell unterschiedliche Zellzahlen in den einzelnen Kulturgefäßen zu berücksichtigen, wurden alle Versuche mindestens 3-fach durchgeführt, wobei außerdem auf die Verwendung von Keratinozyten unterschiedlicher Spender geachtet wurde. Nach 12 h erfolgte unter sterilen Bedingungen die Zugabe der IgG-Fractionen in einer Konzentration von 4 mg/ml für Gesamt-IgG und 2 mg/ml für NC16A-spezifisches IgG. Pro Inkubationskammer wurden 200 µl der IgG-Lösung eingesetzt. Jede Probe wurde vierfach aufgetragen und in 0,15 mM und 1,65 mM Calciummedium für 30 min oder 12 h inkubiert. Zur Entfernung nicht gebundenen IgGs war es nötig die Zellen vor der Fixierung dreimal mit Tris-buffered Saline plus Tween 20 (TBST) zu waschen. Die Fixierung erfolgte für 20 min bei -20°C mit Methanol. Nach wiederholtem Waschen mit TBST konnte der Zweitantikörper aufgetragen werden. Hierbei handelte es sich um FITC-markiertes Schwein-anti-Kaninchen IgG in einer Verdünnung von 1:20 mit TBST bzw. FITC-markiertes Ziege-anti-human IgG (beide Dako, Hamburg) in einer Verdünnung von 1:100 mit TBST. Die Inkubationszeit von 30 min erfolgte im Dunkeln, bevor mit TBST gewaschen wurde. Die Herstellung mikroskopierfähiger Präparate erfolgte durch Ablösen der Kammern und Eindecken mit 20%iger Glycerinlösung. Nach lichtmikroskopischer Überprüfung konnten die Zellen mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops (Leica Mikrosysteme, Bensheim) unter Verwendung der Software Scanware (Scanware Electronics, Bickenbach) ausgewertet werden.

Bei diesem Verfahren werden nur Strukturen abgebildet, die sich unmittelbar in der Brennebene des Mikroskopobjektivs befinden. In unseren Versuchen wurde ein 40.0/1.00 Öbobjektiv verwendet. Der Laserstrahl wird vor und nach Auftreffen auf das Objekt jeweils durch eine Lochblende (Pinhole) geleitet. Dabei ist vor allem der Durchmesser des zweiten Pinholes, welches die Lichtstrahlen, die nicht aus einer definierten Schichtdicke stammen zurückhält, für die Schärfe des Bildes ausschlaggebend.

Zur überlagerungsfreien Darstellung der Zellstrukturen erwies sich in unseren Versuchen ein Pinhole von 80 nm als optimal. Die Schichtdicke der Abbildungen betrug maximal 5 μm in Abhängigkeit von der Wellenlänge des Laserstrahls, der Apertur des verwendeten Objektivs und der Größe des Pinholes. In den Versuchen wurde die Proteinverteilung im gesamten Volumen der Keratinozyten gescannt, wobei der Abstand zwischen den Schichten in Abhängigkeit vom Durchmesser der betrachteten Zelle zwischen 0,5 und 3 μm betrug. Die dargestellten Bildausschnitte hatten im Durchschnitt eine Seitenlänge von 40 μm , bzw. von 200 μm bei den Negativkontrollen und wurden digital abgespeichert.

Herstellung von Keratinozytenextrakten und Western Blot

Zur Bestimmung der Menge von BP180 in den zur Immunfluoreszenz verwandten Zellen wurden normale humane epidermale Keratinozyten (NHEK) in Kultur genommen. Nach 24 h wurden die Zellen in 2% Natriumdodecylsulfat, 5% β -Mercaptoethanol, 2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid und 2 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA) in 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8) lysiert (sämtliche Chemikalien Sigma, St. Louis, USA) und mittels 6% SDS-PAGE fraktioniert bevor sie elektrophoretisch auf Nitrozellulosemembranen transferiert wurden (Kromminga et al, 2004). Die Blockierung unspezifischer Bindungen erfolgte für 17 h bei 4°C auf dem Taumler mittels 5%iger Magermilchlösung. Kaninchenseren kamen 1:1000,

Patientenseren und Negativkontrollen 1:100 mit PBS (154 mM NaCl, 20 mM KH₂PO₄, pH 7,6) verdünnt zum Einsatz. Die Inkubation erfolgte für 3,5 h bei RT auf einem Schüttler. Die Blots wurden mit TBST gewaschen und mit Meerrettichperoxidase-markiertem Ziege-anti-Kaninchen IgG bzw. Kaninchen-anti-Human IgG (Dianova, Hamburg) in einer Verdünnung von 1:500 für 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Die Entwicklung der Blots erfolgte nach Waschen mit TBST mittels 3,3 Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB, Merck, Darmstadt). Die Stärke der Banden wird densitometrisch mittels Image J Software (National Institute of Health, USA) ausgewertet.

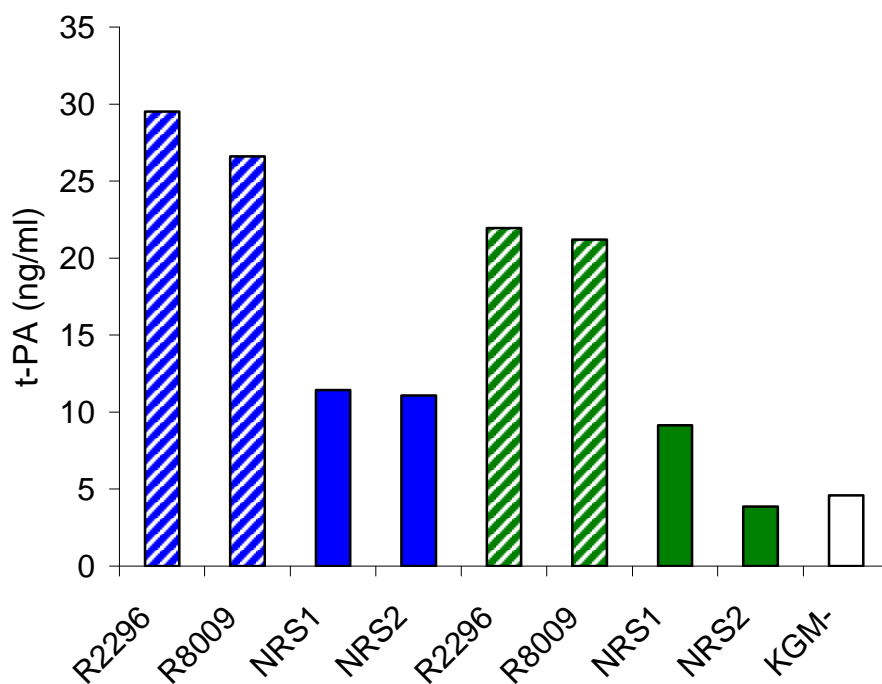
4. Ergebnisse

4.1 Bestimmung von Plasminogenaktivatoren und Plasminogenaktivatorinhibitor 1 in Überständen kultivierter humaner Keratinozyten

Gewebstyp Plasminogenaktivator (t-PA)

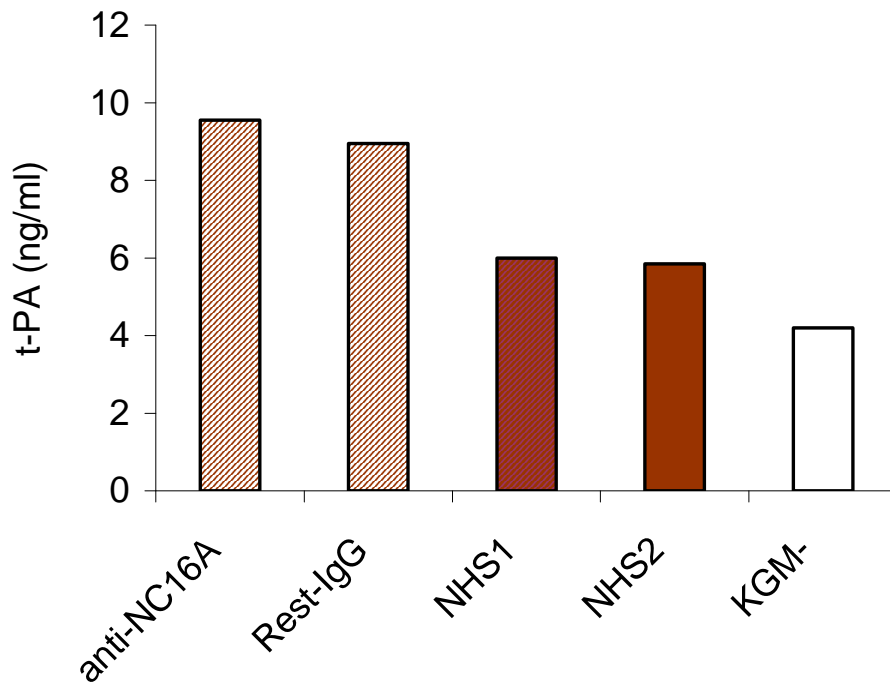
Die dritte Passage NHEK wurde bis 70-80% Konfluenz kultiviert und mit 4 mg/ml IgG eines BP-Patienten oder einer gesunden Kontrollperson inkubiert. Nach 6, 9, und 12 h konnten signifikant erhöhte t-PA-Spiegel in den Zellkulturüberständen nach Inkubation mit BP-IgG im Vergleich zu normal IgG gemessen werden. Das Maximum der t-PA Freisetzung fand sich nach 9 h, wohingegen nach 3 bzw. 24 h keine erhöhten t-PA Spiegel gezeigt werden konnten. Die folgenden Experimente wurden daher mit einer Inkubationszeit von 9 h durchgeführt. Die Stimulation erfolgte mit der IgG-Fraktion zweier gegen NC16A immunisierter Kaninchen, R2296 und R8009, mit einer IgG-Konzentration von 4 mg/ml und 8 mg/ml. Als Negativkontrollen dienten zwei gesunde Kaninchen (normales Kaninchen/rabbit Serum, NRS), sowie der Zellkulturüberstand ohne IgG-Zugabe (KGM-). (Abb. 1)

In einer zweiten Versuchsreihe wurden Keratinozyten mit der anti-NC16A-Fraktion eines BP-Patienten in einer Konzentration von 2 mg/ml inkubiert und mit der anti-NC16A depletierten IgG-Fraktion desselben Patienten verglichen. Als Negativkontrollen dienten die IgG-Fractionen gesunder Probanden (normales humanes Serum, NHS) und der Zellkulturüberstand ohne Zugabe von IgG (KGM-). (Abb. 2) In allen Fällen konnte eine signifikante Erhöhung der t-PA-Sekretion nach Stimulation durch Antikörper gegen NC16A im Vergleich zu der Kontrollgruppe gemessen werden.



Erhöhte Sekretion von t-PA aus NHEK nach Inkubation mit Kaninchen Antikörpern gegen die humane BP180 NC16A Domäne im Vergleich zu Inkubation mit präimmunisierten Kaninchen und Zellkulturüberständen ohne Zugabe von Kaninchen IgG

Abbildung 1. Die schraffierten Balken zeigen die t-PA-Menge in Keratinozytenüberständen nach Inkubation mit IgG zweier gegen humanes BP180 immunisierter Kaninchen (R2296, R8009). Daneben die Spiegel in Keratinozytenüberständen nach Inkubation mit der IgG-Fraktion aus dem Serum nicht immunisierter Kaninchen (NRS1, NRS2). Der weiße Balken stellt die t-PA-Menge im Zellkulturüberstand von NHEK ohne Zugabe von IgG (KGM-) dar. Links entspricht einer Antikörperkonzentration von 8 mg/ml, rechts einer Antikörperkonzentration von 4 mg/ml.



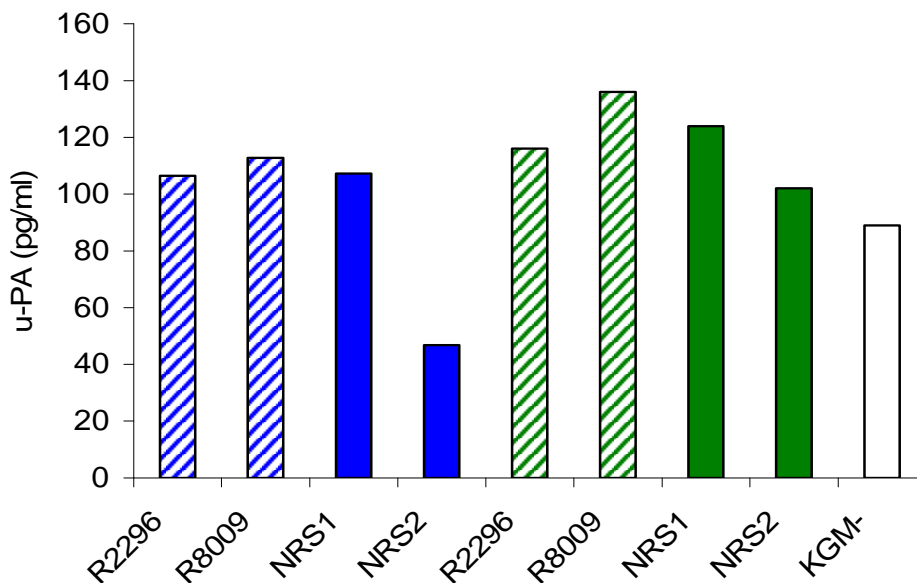
Erhöhte Sekretion von t-PA aus NHEK nach Inkubation mit Antikörpern von BP-Patienten gegen die humane BP180 NC16A Domäne und der von diesen Antikörpern depletierten IgG-Fraktion im Vergleich zu IgG von gesunden Probanden und Zellkulturüberstand ohne Zugabe von humanem IgG

Abbildung 2. Die schraffierten Balken zeigen die t-PA-Menge in Keratinozytenüberständen nach Inkubation IgG gegen BP180 NC16A eines Patienten mit bullösem Pemphigoid (anti-NC16A), sowie der anti-BP180 NC16A depletierten IgG-Fraktion (Rest-IgG) dieses Patienten. Daneben die t-PA-Spiegel in Keratinozytenüberständen nach Inkubation mit IgG gesunder Probanden (NHS1, NHS2). Der weiße Balken stellt die t-PA-Menge im Zellkulturüberstand von NHEK ohne Zugabe von IgG (KGM-) dar. Die Antikörperkonzentration betrug 2 mg/ml.

Urokinasetyp Plasminogenaktivator (u-PA)

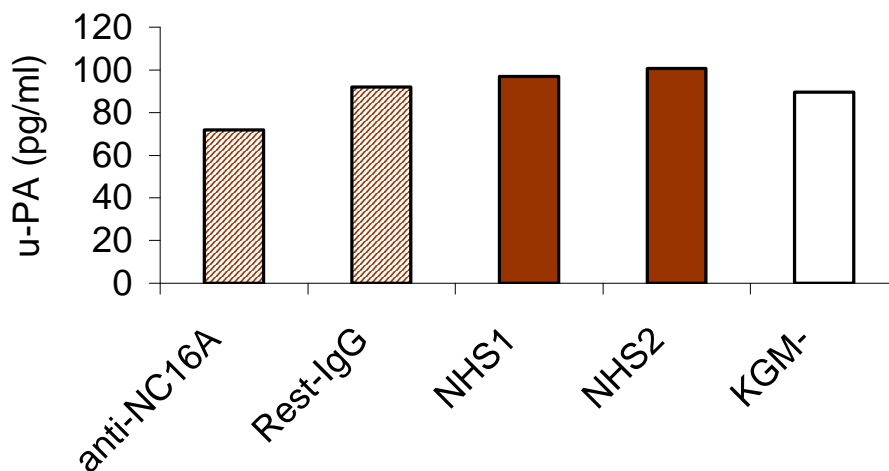
NHEK wurden analog zu den Versuchen mit t-PA kultiviert. Die eingesetzten Antikörper, sowie deren Konzentrationen entsprachen ebenfalls den Bedingungen, unter

denen t-PA gemessen wurde. Auch in diesem Versuch betrug die Inkubationszeit 9 h. Im Gegensatz zu den für t-PA ermittelten Daten konnte bei u-PA im gleichen Versuch in den Zellkulturüberständen keine erhöhten Werte gemessen werden. (Abb.3, Abb. 4)



Sekretion von u-PA aus NHEK nach Inkubation mit Kaninchen Antikörpern gegen die humane BP180 NC16A Domäne im Vergleich zu Inkubation mit präimmunisierten Kaninchen und Zellkulturüberständen ohne Zugabe von Kaninchen IgG

Abbildung 3. Die schraffierten Balken zeigen die u-PA-Menge in Keratinozytenüberständen nach Inkubation mit IgG zweier gegen humanes BP180 immunisierter Kaninchen (R2296, R8009). Daneben die Spiegel in Keratinozytenüberständen nach Inkubation mit der IgG-Fraktion aus dem Serum nicht immunisierter Kaninchen (NRS1, NRS2). Der weiße Balken stellt die u-PA-Menge im Zellkulturüberstand ohne Zugabe von Kaninchen IgG (KGM-) dar. Links entspricht einer Antikörperkonzentration von 8 mg/ml, rechts einer Antikörperkonzentration von 4 mg/ml.

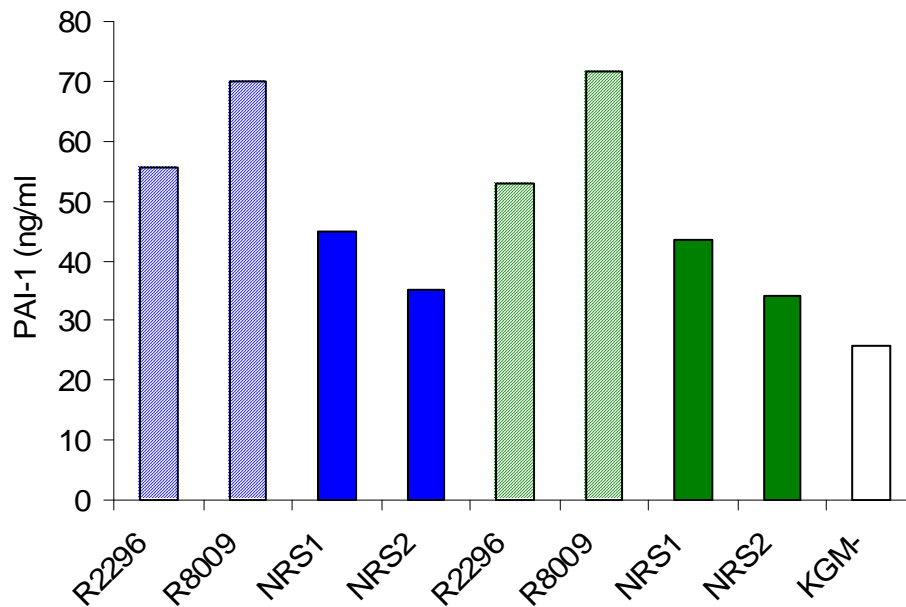


Sekretion von u-PA aus NHEK nach Inkubation mit Antikörpern von BP-Patienten gegen die humane BP180 NC16A Domäne und der von diesen Antikörpern depletierten IgG-Fraktion im Vergleich zu IgG von gesunden Probanden und Zellkulturüberstand ohne Zugabe von humanem IgG

Abbildung 4. Die schraffierten Balken zeigen die u-PA-Menge in Keratinozytenüberständen nach Inkubation IgG gegen BP180 NC16A eines Patienten mit bullösem Pemphigoid (anti-NC16A), sowie der anti-BP180 NC16A depletierten IgG-Fraktion (Rest-IgG). Daneben die u-PA-Spiegel in Keratinozytenüberständen nach Inkubation mit IgG gesunder Probanden (NHS1, NHS2). Der weiße Balken stellt die u-PA-Menge im Zellkulturüberstand ohne Zugabe von humanem IgG (KGM-) dar. Die Antikörperkonzentration betrug 2 mg/ml.

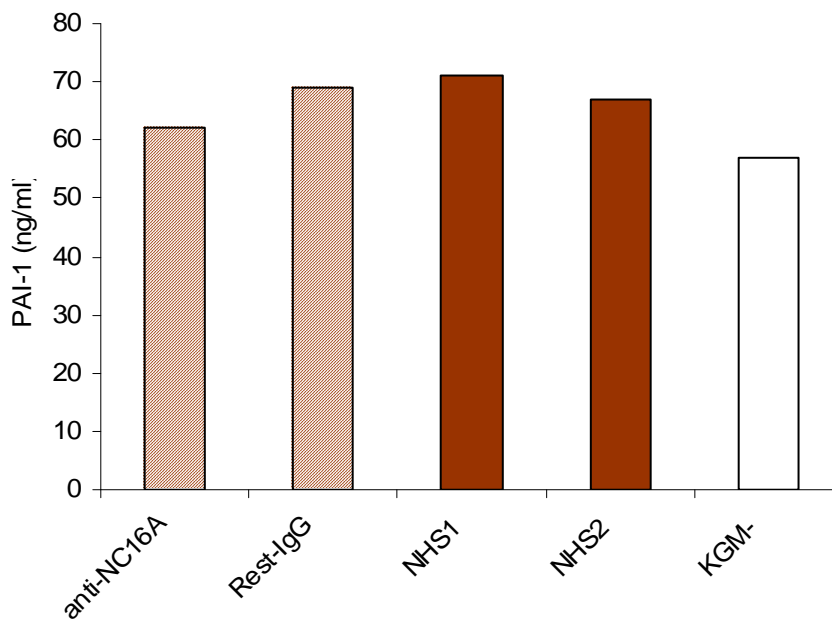
Plasminogenaktivatorinhibitor 1 (PAI 1)

Parallel zur Bestimmung von t-PA bzw. u-PA wurde unter analogen Versuchsbedingungen PAI 1 in Überständen kultivierter NHEK gemessen. (Abb. 5, Abb. 6)



Sekretion von PAI 1 aus NHEK nach Inkubation mit Kaninchen Antikörpern gegen die humane BP180 NC16A Domäne im Vergleich zu Inkubation mit präimmunisierten Kaninchen und Zellkulturüberständen ohne Zugabe von Kaninchen IgG

Abbildung 5. Die schraffierten Balken zeigen die PAI-1-Menge in Keratinozytenüberständen nach Inkubation mit IgG zweier gegen humanes BP180 immunisierter Kaninchen (R2296, R8009). Daneben die Spiegel in Keratinozytenüberständen nach Inkubation mit der IgG-Fraktion aus dem Serum nicht immunisierter Kaninchen (NRS1, NRS2). Der weiße Balken stellt die PAI-1-Menge im Zellkulturüberstand ohne Zugabe von Kaninchen IgG (KGM-) dar. Links entspricht einer Antikörperkonzentration von 8 mg/ml, rechts einer Antikörperkonzentration von 4 mg/ml.



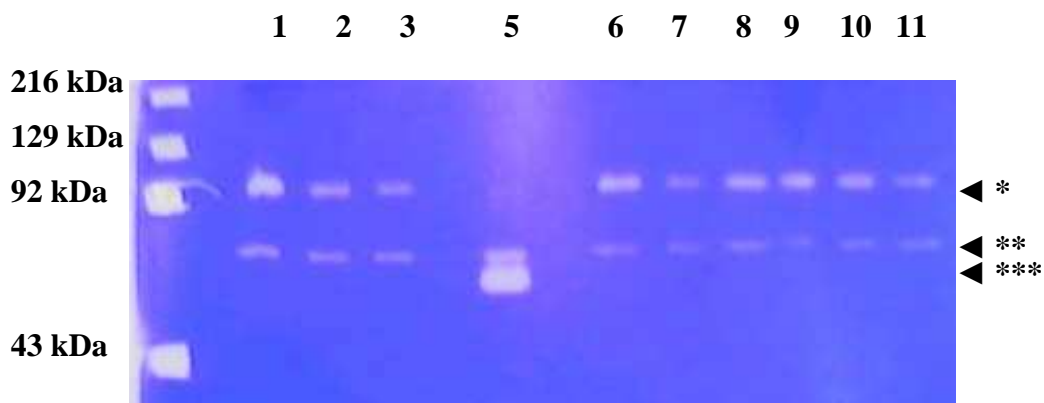
Sekretion von PAI 1 aus NHEK nach Inkubation mit Antikörpern von BP-Patienten gegen die humane BP180 NC16A Domäne und der von diesen Antikörpern depletierten IgG-Fraktion im Vergleich zu IgG von gesunden Probanden und Zellkulturüberstand ohne Zugabe von humanem IgG

Abbildung 6. Die schraffierten Balken zeigen die PAI-1-Menge in Keratinozytenüberständen nach Inkubation IgG gegen BP180 NC16A eines Patienten mit bullösem Pemphigoid (anti-NC16A), sowie der anti-BP180 NC16A depletierten IgG-Fraktion (Rest-IgG) desselben Patienten. Daneben die PAI-1-Spiegel in Keratinozytenüberständen nach Inkubation mit IgG gesunder Probanden (NHS1, NHS2). Der weiße Balken stellt die PAI-1-Menge im Zellkulturüberstand ohne Zugabe von humanem IgG (KGM-) dar. Die Antikörperkonzentration betrug 2 mg/ml.

4.2 Bestimmung von Gelatinase A und B in Überständen kultivierter NHEK

In einem Vorversuch wurden NHEK mit der IgG-Fraktion eines BP-Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollperson inkubiert. Nach 1¹/₂, 3, 6, 9, 12, 24, 36 und

48 h wurden mittels Zymographie Gelatinase A und B in Zellkulturüberständen gemessen. Eine erhöhte Nachweisbarkeit jeweils der inaktiven Form von Gelatinase A und B fand sich von 9 bis 48 h. Wie **Abbildung 7** zeigt, konnte jedoch kein Unterschied bezüglich der Gelatinasenkonzentrationen in den Keratinozytenüberständen nach Stimulation mit Patienten IgG im Vergleich zu normalem IgG beobachtet werden.



Freisetzung von Gelatinase A und B aus NHEK nach Inkubation mit Kaninchen Antikörpern gegen die humane BP180 NC16A Dömäne im Vergleich zu präimmunisierten Kaninchenseren und Zellkulturüberständen ohne Zugabe von Kaninchen IgG

Abbildung 7. Folgende NHEK-Überstände wurden untersucht: Spur 1 ein Keratinozyten-Überstand nach 6 h Inkubation mit R2296 IgG, einem gegen NC16A immunisierten Kaninchen; Spur 2, 6 h Inkubation mit präimmunisiertem Kaninchen IgG und Spur 3, nach 6 h Inkubation ohne IgG (KGM-). Analog wurden die Proben in den Spuren 6 bis 8 nach einer Inkubationszeit von 9 h und in 9 bis 11 nach 12 h aufgetragen. Als Positivkontrolle diente ein 80-fach aufkonzentrierter HT1080-Überstand (Spur 5). Nach Stimulation mit R2296 IgG konnten zwar die inaktiven 72 (***) bzw. 83 kDa (*) schweren, jedoch nicht die aktiven 66 (***) bzw. 92 kDa schweren Formen von Gelatinase A und B nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte kein Unterschied zwischen den mit R2296 IgG inkubierten NHEK und sowohl dem präimmunisierten Kaninchen, als auch KGM- gezeigt werden.

In einem dritten Experiment wurden NHEK mit der IgG-Fraktion von 3 BP-Patienten, sowie der von 2 gesunden Probanden stimuliert. Bei einem BP-Patienten wurde der Versuch zusätzlich mit anti-NC16A und der von anti-NC16A befreiten IgG-Fraktion durchgeführt. Die Ergebnisse entsprachen denen der Versuche mit gegenüber BP180 NC16A immunisierten Kaninchen (Daten nicht gezeigt.)

In der Folge wurden von ausgewählten Versuchen zum genauen quantitativen Nachweis der Matrixmetalloproteinasen Western Blots durchgeführt. Hier wurden NHEK-Überstände nach 9 h Inkubation getestet. Die in der Zymographie dargestellten Formen der Gelatinasen befanden sich jedoch ohne Ausnahme unterhalb der Nachweisgrenze (Daten nicht gezeigt.)

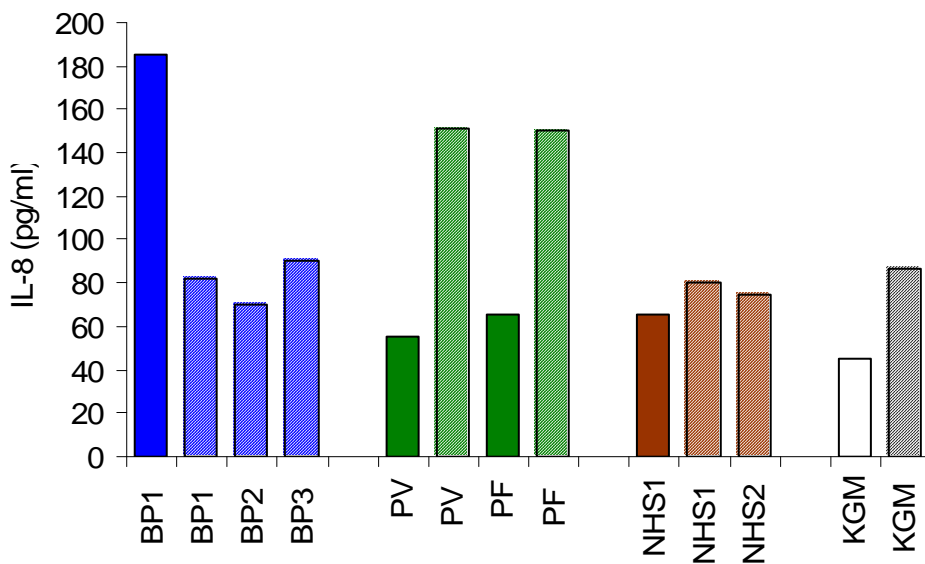
4.3 Einfluß von Calcium auf kultivierte humane Keratinozyten

IL-8 in Keratinozyten-Überständen unter Calciumeinfluß

Die dritte Passage juveniler humaner Keratinozyten wurde bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert. Zwölf Stunden vor Versuchsbeginn wurde bei einem Teil der Zellen die Calciumkonzentration im Medium von 0,15 mM auf 1,65 mM erhöht. Die Stimulation erfolgte mit 4 mg/ml BP IgG. Zusätzlich wurden die IgG-Fractionen von

Patienten mit Pemphigus vulgaris (PV) und Pemphigus foliaceus (PF) getestet. Als Negativkontrolle diente die IgG-Fraktion gesunder Probanden (NHS). Zur Bestimmung der Hintergrundspiegel wurde ein Teil der Zellen nicht mit Antikörpern stimuliert (KGM). Nach einer Inkubationszeit von 9 h wurde IL-8 in den Keratinozyten-Überständen mittels ELISA bestimmt.

Bei Zellen, die BP-IgG inkubiert worden waren, zeigte sich bei 0,15 mM Calcium nach dieser Zeit eine 2,5-fache Erhöhung des IL-8 Spiegels im Vergleich zu NHS IgG. Bei Zellen, die hingegen einer Calciumkonzentration von 1,65 mM ausgesetzt worden waren, konnte keine erhöhte IL-8-Menge im Vergleich zu NHS IgG festgestellt werden. (Abb. 8) Gleichzeitig wurden in den mit Pemphigus-IgG stimulierten NHEK-Überständen in hohem Calcium (1,65 mM) größere Mengen IL-8 gemessen, was zeigt, dass diese Zellen auch unter der höheren Calciumkonzentration zur Freisetzung dieses Zytokins in der Lage sind.

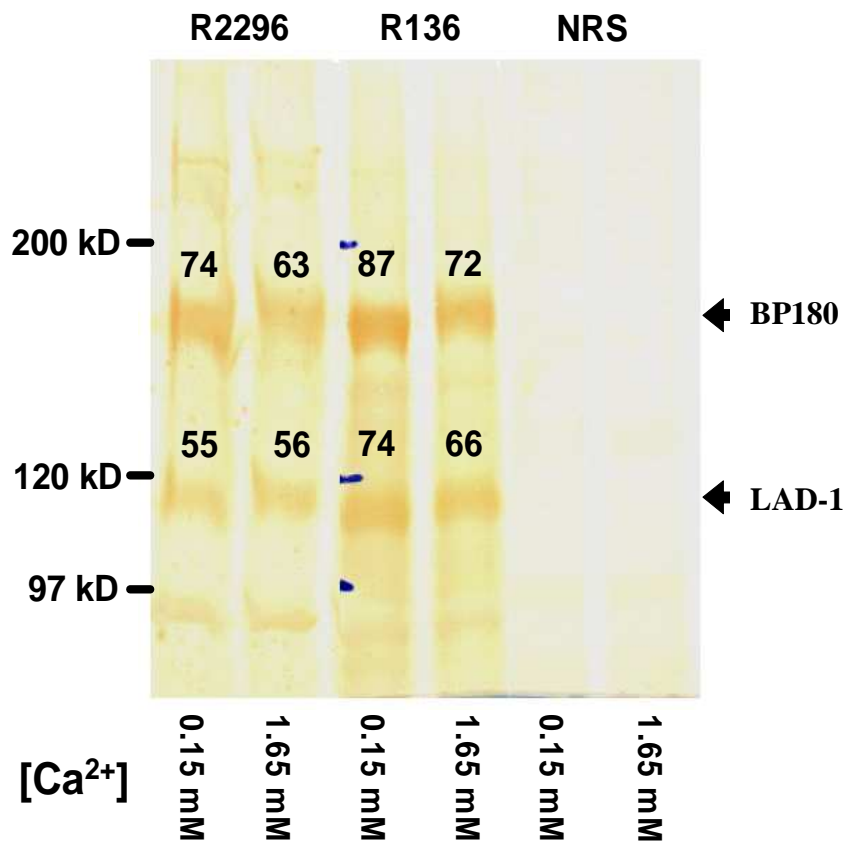


Freisetzung von IL-8 aus NHEK nach Inkubation mit humanem BP IgG in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration im Vergleich zur Inkubation mit humanem Pemphigus IgG, der IgG-Fraktion gesunder Probanden und NHEK-Überständen ohne Zugabe von IgG

Abbildung 8. Einfarbige Balken repräsentieren die IL-8-Menge in Keratinozytenüberständen bei einer Calciumkonzentration von 0,15 mM. Bei den schraffierten Säulen betrug die Calciumkonzentration des Mediums 1,65 mM. Die IL-8-Mengen nach Stimulation mit der IgG-Fraktion eines Patienten mit bullösem Pemphigoid (BP 1, 2, 3) sind links dargestellt, daneben die nach Stimulation mit Pemphigus-IgG (PV für Pemphigus vulgaris; PF für Pemphigus foliaceus). Zur Negativkontrolle sind IL-8-Spiegel in Keratinozytenüberständen, die mit dem IgG gesunder Probanden (NHS1, NHS2) inkubiert worden waren, aufgeführt. Hintergrundspiegel, d.h. die IL-8-Menge in Zellkulturüberständen ohne Zugabe von IgG sind ganz rechts dargestellt.

BP-180 Western-Blot

NHEK wurden für 12 h mit 4 mg/ml IgG von immunisierten Kaninchen inkubiert. Verwendet wurden Seren von Kaninchen R2296, das mit der humanen BP180 NC16A Domäne immunisiert wurde und R136, welches mit einem rekombinanten C-terminalen Abschnitt von BP180 (AS 1365-1413) immunisiert wurde. Der Calciumgehalt des Kulturmediums betrug 0,15 oder 1,65 mM. Nach Herstellung von Keratinozytenextrakten wurde der BP180-Gehalt in den unterschiedlich kultivierten Zellpopulationen bestimmt. Hierbei zeigte sich eine geringgradig höhere Expression von BP180 in niedrigem Calcium. (Abb. 9)



Höhere Expression von BP180 in normalen humanen epidermalen Keratinozyten (NHEK) bei niedriger (0,15 mM) Calciumkonzentration im Medium

Abbildung 8. Bei NHEK, die mit niedrigem Calcium (0,15mM) kultiviert worden waren, konnte im Vergleich zu NHEK, die in hohem Calcium (1,65mM) kultiviert worden waren, eine geringgradig höhere Expression von BP180 beobachtet werden. Zur Detektion wurden Kaninchen Antikörper gegen die humane BP180 NC16A Domäne (R2296) und gegen einen C-terminalen Abschnitt (R136), sowie präimmunes Kaninchenserum verwendet. Die mittlere Pixel Intensität (Image I Software) ist neben den Banden ausgewiesen. Die Migrationspositionen des Molekulargewichtsstandarts sind auf der linken Seite, die Positionen von BP180 und LAD-1 rechts dargestellt. Das Muster wurde in Versuchen mit NHEK von zwei unterschiedlichen Spendern gesehen.

Indirekte Immunfluoreszenz (IIF) kultivierter Keratinozyten

Insgesamt wurden 14 Versuche durchgeführt, von denen 11 eine spezifische Fluoreszenz zeigten und in die nachfolgende Auswertung eingingen. In 9 Experimenten wurden neben Kaninchen-anti-human BP180 NC16A IgG auch IgG von 2 BP-Patienten, sowie humanes anti-BP180 NC16A IgG und die anti-NC16A depletiertes IgG verwendet. Die Antikörper wurden in allen Versuchen doppelt eingesetzt, wodurch sich unter Berücksichtigung der Zahl mit der entsprechenden Probe durchgeführten Immunfluoreszenzen, die Gesamtzahl n der ausgewerteten Bilder ergibt.

Grundsätzlich wurden von uns verschiedene Fluoreszenzmuster beobachtet. Zum einen sahen wir die für das BP typische membranöse Fluoreszenz (MF) basaler Keratinozyten. Daneben konnten intrazelluläre, punktförmige Anreicherungen spezifischer Fluoreszenz (Pkt) beobachtet werden, die alleine oder in Kombination mit der erwähnten MF auftraten. An Zellen, die mit der aufgereinigten anti-NC16A-Fraktion von BP-Patienten inkubiert worden waren, zeigte sich dieses Muster in aller Regel jedoch nicht. Schließlich stellte sich eine intrazelluläre, der Cytoplasmamembran anliegende ringförmige Anordnung spezifischer, punktförmiger Fluoreszenz (Ring) dar, die ebenfalls alleine oder in Kombination mit der MF auftreten konnte.

Neben verschiedenen Verteilungsmustern der Fluoreszenz zeigten sich bei der Auswertung der Versuche auch Unterschiede in der Stärke der membranösen Fluoreszenz. Diese nahm sowohl mit steigendem Calciumgehalt im Nährmedium, als auch mit steigender Inkubationszeit unabhängig vom Calciumgehalt ab (**Tabelle 1**).

Es konnten keine Unterschiede in der Fluoreszenz im Bezug auf verschiedene BP-Seren festgestellt werden. In der konfokalen Lasermikroskopie fanden sich keine Unterschiede in den Mustern unterschiedlicher Zellebenen (suprabasal, mittig, apikall) (Daten nicht gezeigt).

Die als Negativkontrollen verwendeten normalen humanen Seren (NHS) und normalen Kaninchen Seren (NRS), sowie nicht mit Autoantikörpern inkubierte Zellen zeigten

keine Fluoreszenz (Daten nicht gezeigt). Bei den Serumproben kamen falsch positive Ergebnisse mit einer Häufigkeit von 1:20 vor.

Die im Anschluß folgenden **Abbildungen 10 und 11** zeigen die Fluoreszenzmuster der Konfokallaser-Mikroskopie.

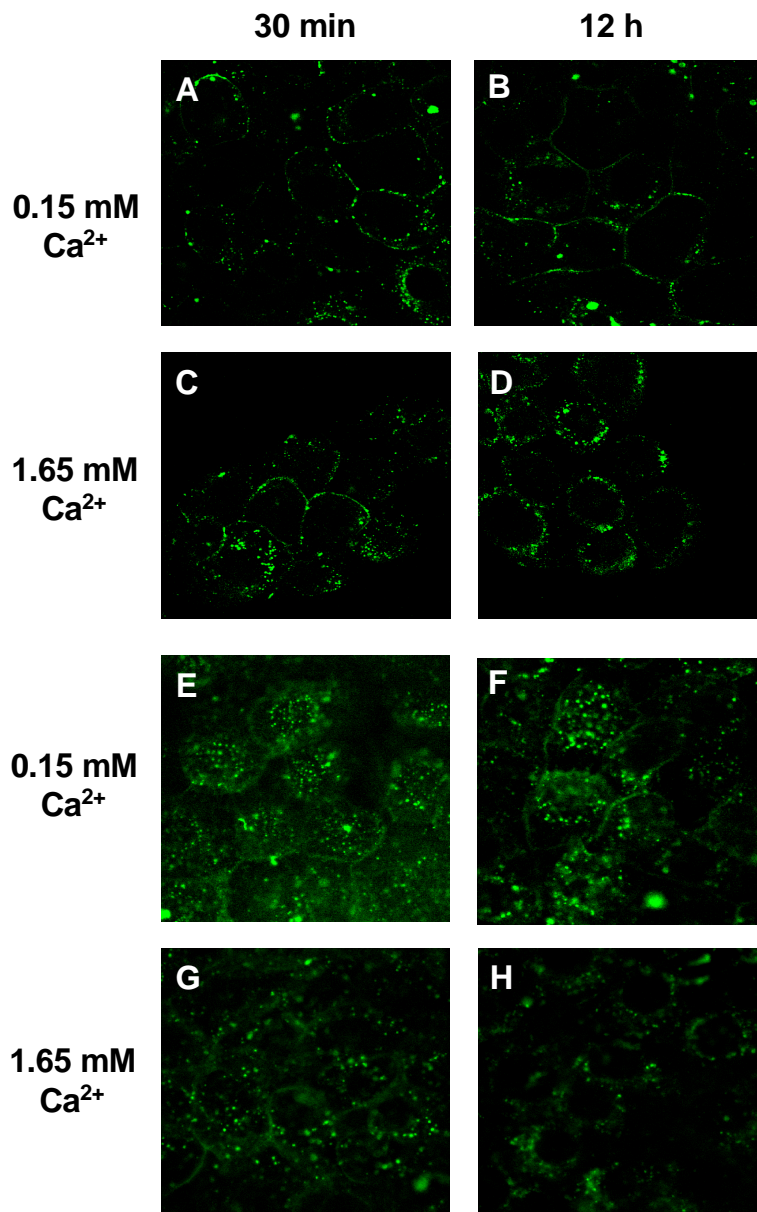
Häufigkeit der beobachteten Fluoreszenzmuster von NHEK in Abhängigkeit von Inkubationszeit und Calciumkonzentration des Mediums

Tabelle1. Nach einer Inkubationszeit von 30 min zeigten die Zellen in der Regel eine membranöse Fluoreszenz (MF), oft in Kombination mit intrazellulären punktförmigen Anreicherungen (Pkt). Zu diesem Zeitpunkt konnte kein Unterschied des Fluoreszenzmusters in Abhängigkeit vom Calciumgehalt des Mediums festgestellt werden. Nach einer Inkubationszeit von 12 h konnte in Proben mit hohem Calciumgehalt die für das bullöse Pemphigoid typische membranöse Fluoreszenz nicht mehr nachgewiesen werden, stattdessen fand sich eine intrazytoplasmatisches ringförmiges Fluoreszenzmuster (Ring). In Proben mit niedriger Calciumkonzentration trat die membranöse Fluoreszenz zwar seltener auf, konnte jedoch noch in mehr als der Hälfte der Fälle beobachtet werden.

Lichtmikroskopische Auswertung	Gesamt-IgG von R2296/8009 n ² =22	Gesamt-IgG von BP ³ -Patienten n=18	Humanes anti-NC16A IgG n=18	Humanes anti-NC16A depletiertes IgG n=18
Fluoreszenzmuster	MF Pkt Ring	MF Pkt Ring	MF Pkt Ring	MF Pkt Ring
0,15mM CaCl ₂ 30 Minuten	16 12 4	16 14 2	16 0 0	12 12 0
1,65mM CaCl ₂ 30 Minuten	20 20 0	14 14 0	14 0 0	14 14 0
0,15mM CaCl ₂ 12 Stunden	13 6 7	11 10 1	12 0 3	10 9 1
1,65mM CaCl ₂ 12 Stunden	2 12 4	4 14 0	0 18 0	2 16 0

¹ R2296/R8009= gegen BP180 NC16A immunisierte Kaninchen

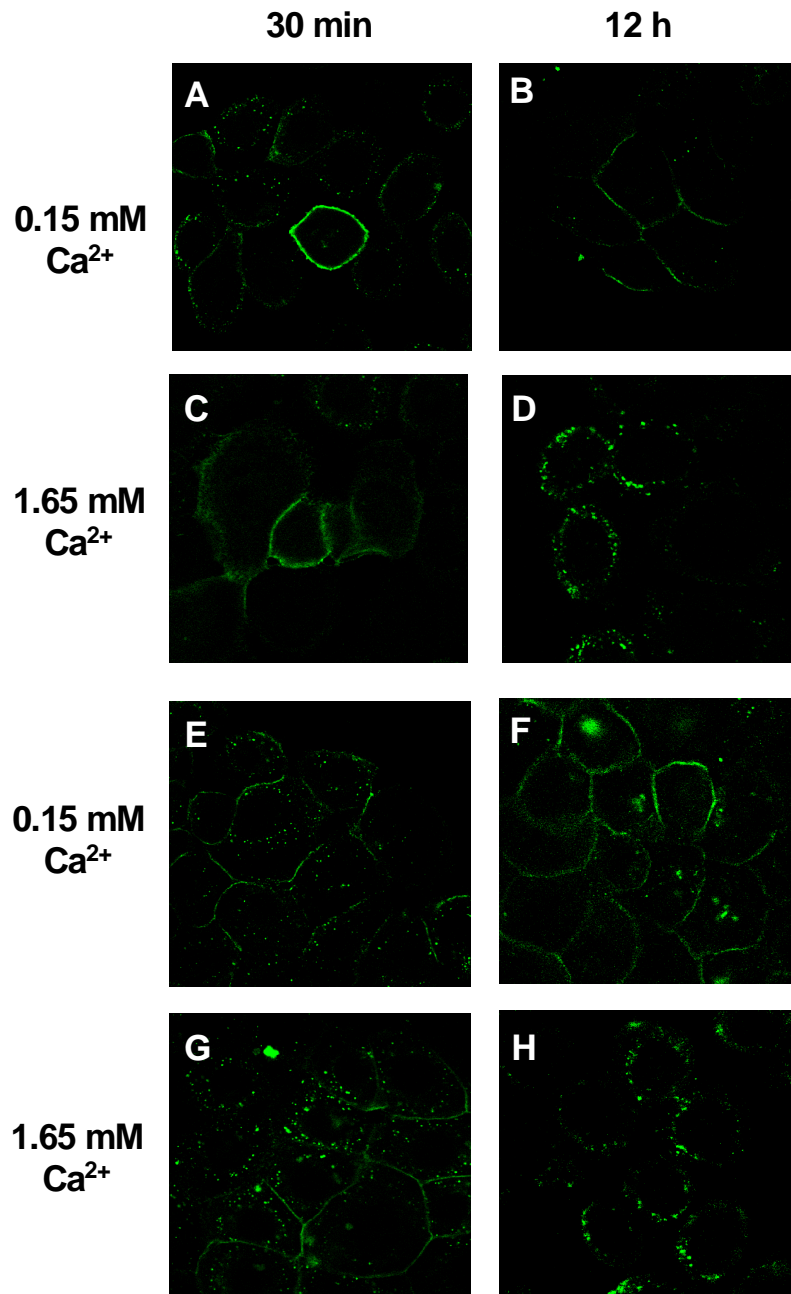
² n=Gesamtzahl der Proben



³ BP= bullöses Pemphigoid

Verteilung von BP180 in NHEK nach Inkubation mit anti-BP180 IgG eines BP-Patienten und eines immunisierten Kaninchens in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und dem Calciumgehalt des Mediums

Abbildung 9. Indirekte Immunfluoreszenz humaner Keratinozyten nach Inkubation mit IgG eines Patienten mit bullösem Pemphigoid (Bilder A-D) bzw. mit der IgG-Fraktion eines gegen BP180 NC16A immunisierten Kaninchens R2296 (Bilder E-H). In beiden Fällen zeigt sich nach 30 min kein Unterschied im Fluoreszenzmuster zwischen 0,15 mM und 1,65 mM Calcium (Bilder A, C, E, G). Der Hauptanteil der Fluoreszenz liegt linear in der Zellmembran. Nach 12 h hingegen beobachtet man in hohem Calcium eine Aufnahme des Proteins aus der Zellwand ins Zellinnere. Die Plasmamembran ist nicht mehr angefärbt, stattdessen sieht man punktförmige, teilweise ringförmig angeordnete Fluoreszenz im Zytoplasma (Bilder D und H). Bei 0,15 mM Calcium hingegen ist auch nach 12 h kein Unterschied festzustellen (Bilder B, F).



Verteilung von BP180 in NHEK nach Inkubation mit anti-BP180 NC16A IgG eines BP Patienten und der anti-BP180 NC16A depletierten IgG-Fraktion desselben Patienten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und vom Calciumgehalt des Mediums

Abbildung 10. Indirekte Immunfluoreszenz humaner Keratinozyten nach Inkubation mit humanem anti-BP180 NC16A (Bilder A-D) bzw. mit der anti-BP180 NC16A depletierten IgG-Fraktion eines Patienten mit bullösem Pemphigoid (Bilder E-H). Unabhängig von der Calciumkonzentration kann man nach Inkubation mit humanem anti-BP180 NC16A bei einer Inkubationszeit von 30 min eine membranöse Fluoreszenz erkennen (Bilder A und C). Nach einer Inkubationszeit von 12 h ist bei einer Calciumkonzentration von 0,15 mM die membranöse Fluoreszenz noch deutlich zu erkennen (Bild B). Die Keratinozyten, die unter 1,65 mM Calcium kultiviert wurden unterscheiden sich nach 12 h deutlich von den anderen. Hier lässt sich in der Zellwand kein NC16A mehr nachweisen. Stattdessen finden sich häufig ringförmig angeordnete fluoreszierende Punkte im Zellinneren (Bild D).

In den Bildern E bis H sind Keratinozyten dargestellt, die mit der anti-NC16A depletierten IgG-Fraktion eines BP-Patienten inkubiert wurden. Die auch hier deutlich zu erkennende Fluoreszenz lässt den Schluss zu, dass das Serum des Patienten Antikörper enthält, die mit anderen Domänen von BP180 reagieren. Hier wiederholt sich die Beobachtung, die bei der Stimulation mit anti-NC16A gemacht werden konnte. Nach einer Inkubationszeit von 30 min erkennt man eine deutliche ununterbrochene membranöse Fluoreszenz unabhängig vom Calciumspiegel (Bilder E und G). Nach 12 h lässt sich bei niedrigem Calcium weiter BP180 in der Zellmembran nachweisen (Bild F), wohingegen das Protein in hohem Calcium aus der Zellwand verschwunden ist und punktförmig im Zellinneren vorliegt (Bild H). Folglich ist das Zustandekommen dieses Musters unabhängig vom angegriffenen Epitop.

5. Diskussion

5.1 Bestimmung von tissue-type Plasminogenaktivator, urokinase-type Plasminogenaktivator und Plasminogenaktivatorinhibitor 1 in Überständen kultivierter humaner Keratinozyten

Beim bullösen Pemphigoid (BP) ist die Bindung der Autoantikörper an ihre Zielantigene für die Blasenbildung alleine nicht ausreichend, sondern muß durch die Aktivierung des Komplementsystems und die Einwanderung von Entzündungszellen in die Hautläsionen begleitet werden. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem die Freisetzung von Proteasen wichtig bei der Blasenentstehung ist (Naito et al, 1982; Gammon et al, 1982; Liu et al, 1998; 1999; 2000). Neben Gelatinase B (Liu et al, 1998) und α 1-Antitrypsin (Liu et al, 2000), gab es auch bei Plasminogenaktivatoren (PA) Hinweise auf ihre Beteiligung an der Pathogenese des BP. Plasminogenaktivator wandelt das Proenzym Plasminogen in die Breitspektrumproteinase Plasmin um. Durch die weite Verbreitung und hohe Konzentration von Plasminogen und die relative Unspezifität von Plasmin, repräsentiert das PA-Plasminogen-System ein breites Reservoir an potentieller proteolytischer Aktivität, die eine breite Anzahl physiologischer und pathologischer Prozesse beeinflussen kann.

Es gibt zwei Formen von PA, den Urokinase-Typ (u-PA) und den Gewebe-Typ (t-PA), welche Produkte verschiedener Gene sind und keine immunologische Kreuzreaktion zeigen. Die Regulation dieser Enzyme ist durch das Mitwirken von mindestens drei Inhibitoren und verschiedenen Formen einkettiger PA-Vorläufer sehr komplex (Dano et al, 1982; Saksela et al, 1985). T-PA ist nur in Interaktion mit Fibrin (Hoylaerts et al, 1982) und möglicherweise anderen Matrixproteinen aktiv (Silverstein et al, 1985). U-PA wird als inaktive und gegen Inhibitoren unempfindliche Vorläuferform sezerniert. Nach dem Umbau in die aktive Form ist u-PA anfällig für die Komplexbildung mit endogenen Inhibitoren (Dano et al, 1982; Saksela et al, 1985).

In der Blasenflüssigkeit von BP-Patienten wurde eine erhöhte Plasminogenaktivität gefunden (Kramer et al, 1993) und t-PA im Gegensatz zu u-PA Expression in läsionaler, nicht aber in nicht betroffener Haut von BP-Patienten oder in Haut gesunder Probanden, immunhistochemisch festgestellt (Gissler et al, 1992; Venning et al, 1993).

Des Weiteren wurde eine erhöhte Aktivität von t-PA, nicht aber u-PA gemessen und sowohl mit unbeteiligter Epidermis von BP-Patienten, als auch mit der Epidermis gesunder Kontrollpersonen verglichen (Jensen et al, 1988). In der Haut gesunder Probanden und in nicht befallenen Hautarealen von Patienten mit BP und anderen Dermatosen geht die dominierende PA-Aktivität von u-PA und nur zu einem kleinen Teil von t-PA aus. Im Gegensatz dazu stammt die PA-Hauptaktivität in läsionaler Haut bei Patienten mit BP und anderen Dermatosen größtenteils von t-PA und nur zu einem kleinen Teil von u-PA. Auch auf mRNA Ebene waren erhöhte Spiegel von t-PA in Keratinozyten aus BP-Läsionen vorhanden, aber nicht in Keratinozyten nicht-betroffener Haut oder Haut normaler Kontrollpersonen (Baird et al, 1990). Eigene Beobachtungen zeigten in der Blasenflüssigkeit von BP-Patienten im Vergleich mit Saugblasen gesunder Probanden und Blasen von Patienten mit toxischer epidermaler Nekrolyse (TEN) erhöhte Mengen von t-PA und Plasmin, nicht aber von u-PA (Schmidt et al, 2004). Die TEN-Blasen dienen als Beispiel für eine nicht infektiöse Erkrankung, die zwar immunologisch entsteht, aber nicht mit zirkulierenden Autoantikörpern assoziiert ist.

Zudem sind im Tiermodell PA-knock-out Mäuse nicht mehr in der Lage nach Injektion von Antikörpern gegen BP180 Blasen zu bilden (Liu et al, 2000). Alle diese Befunde weisen auf eine Bedeutung des PA-Systems in der Pathogenese des BP hin.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob das PA-System durch das Binden von anti-BP180 Antikörpern an ihren Rezeptor an der Zelloberfläche beeinflusst werden kann. Nachdem bereits bekannt war, dass humane Keratinozyten in der Lage sind, sowohl t-PA, als auch u-PA zu produzieren (Jensen et al, 1990) interessierte uns, ob das PA-System direkt durch das Binden der Antikörper gegen BP180 an ihren Rezeptor

an der Zelloberfläche aktiviert wird. Zu diesem Zweck benutzten wir ein kürzlich etabliertes experimentelles System, in dem kultivierte normale humane epidermale Keratinozyten (NHEK) mit affinitäts-aufgereinigtem IgG von BP-Patienten oder mit gegen rekombinante Fragmente von humanem BP180 immunisierten Kaninchen, inkubiert wurden. Mit Hilfe dieses Keratinozytenmodells konnten wir in früheren Experimenten beobachten, dass Autoantikörper gegen die NC16A Domäne von BP180 zur Expression und Freisetzung von IL-6 und IL-8 führen (Schmidt et al, 2000). Wir entwickelten dieses experimentelle Modell weiter und behandelten NHEK mit aufgereinigtem IgG von drei BP-Patienten. Dabei konnten in den Zellkulturüberständen erhöhte Spiegel von t-PA, nicht aber von u-PA nach Stimulation mit BP-IgG gemessen werden. Die Spezifität dieses Fundes konnte durch die Tatsache verifiziert werden, dass Keratinozyten von Patienten mit generalisierter atrophischer benigner Epidermiolysis bullosa (GABEB), die kein BP180 exprimieren nach Stimulation mit Antikörpern gegen BP180 keine erhöhte Freisetzung von t-PA zeigten. Zur Kontrolle führten wir den Nachweis, dass GABEB Keratinozyten zur Produktion großer Mengen von t-PA in der Lage waren. Die PA-Spiegel in den Zellkulturüberständen unbehandelter Zellen spiegeln, wie bereits in der Vergangenheit beschrieben, die physiologische Sekretion von t-PA und u-PA von NHEK wider (Jensen et al, 1990). Interessanterweise waren die Hintergrundspiegel von u-PA gleichermaßen nach der Inkubation von NHEK mit reinem Medium, normalem IgG und BP-IgG wesentlich höher als die von t-PA. Diese Beobachtung korreliert mit der Tatsache, dass u-PA sowohl in NHEK, die in niedrigem Calcium kultiviert wurden, als auch in normaler humaner Epidermis in viel größeren Mengen exprimiert wird (Jensen et al, 1988;1990; Baird et al, 1990).

Die Tatsache, dass auch die anti-NC16A depletierte IgG-Fraktion zu einem erhöhten t-PA-Spiegel in Keratinozyten-Überständen führte, deutet darauf hin, dass auch Antikörper gegen Epitope außerhalb der NC16A Domäne zu t-PA Freisetzung führen.

Bezüglich der Aktivität von t-PA und u-PA lässt sich sagen, dass in unseren Versuchen beide Proteasen enzymatisch aktiv waren. Dennoch war die t-PA Aktivität in den mit

BP-IgG behandelten Kulturüberständen von NHEK nicht größer als in den mit normalem IgG oder nur mit Medium inkubierten Überständen. Dieser Unterschied könnte durch die Anwesenheit von PAI-1, dem natürlichen Inhibitor von t-PA, erklärt werden, der in allen Überständen nachgewiesen werden konnte.

In einem weiterführenden Versuch konnten wir anhand erhöhter mRNA Spiegel für t-PA, nicht aber für u-PA nach der Stimulation von NHEK mit anti-BP180 zeigen, dass die Freisetzung von t-PA als Antwort auf das Binden von Antikörpern gegen BP180 zumindest teilweise auf eine Signaltransduktionskette zurückgeführt werden kann, die zu einer vermehrten t-PA Synthese führt. Nachdem die Freisetzung von Proteasen bisher inflammatorischen Zellen, die in die BP-Läsionen einwandern zugeschrieben wurde (Naito et al, 1982; Gammon et al, 1982; Liu et al, 1998; 2000), deuten unsere Ergebnisse auf ein zweites, früheres Geschehen hin, in dem die Freisetzung von t-PA aus Keratinozyten wenige Stunden nach Binden der Autoantikörper, eine Rolle innehat. Von daher scheinen die Keratinozyten eine aktive Rolle im Prozess der Blasenbildung beim BP zu spielen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unsere Daten an Stellen der Blasenbildung beim BP hohe Spiegel für t-PA zeigen. Das Binden von anti-BP180 Antikörpern an ihr Antigen an der Zelloberfläche bewirkt eine erhöhte Sekretion von t-PA, nicht aber von u-PA aus kultivierten NHEK. Außerdem vermittelt es eine Signaltransduktion, die zu erhöhten mRNA Spiegeln für t-PA, nicht aber für u-PA, in diesen Zellen führt. Unsere Ergebnisse legen sowohl eine aktive Rolle der Keratinozyten, als auch eine Beeinflussung durch das PA-System bei der Blasenbildung des BP nahe.

5.2 Bestimmung von Gelatinase A und B in Zellkulturüberständen von humanen Keratinozyten

Bei den Matrixmetalloproteinasen (MMP) handelt es sich um eine Gruppe Zink-abhängiger Endopeptidasen, die sich in die Untergruppen der Kollagenasen, der

Gelatinasen, der Stromalysine und der Membrantyp-MMPs unterteilen lässt. Auf der einen Seite spielen sie bei physiologischen Vorgängen, die mit Gewebsabbau einhergehen, wie z. B. Gewebsdifferenzierung, Wundheilung und Angiogenese, eine große Rolle. Auf der anderen Seite sind sie an der Entstehung zahlreicher Krankheiten mit pathologisch gesteigertem Gewebeabbau, wie rheumatoider Arthritis, multipler Sklerose, sowie Tumorzellinvasion und Metastasierung beteiligt. Auch bei blasenbildenden Dermatosen lassen sich MMPs nachweisen. So wurden MMPs in Blasenflüssigkeiten von Patienten mit bullösem Erysipel, Pompholyx und BP gefunden (Kähäri et al, 1997).

Unsere Untersuchungen konzentrierten sich nun auf Gruppe der Gelatinasen, die im Wesentlichen aus zwei Mitgliedern besteht. Die 72-kDa Gelatinase A (MMP-2) kann als aktive 66 kDa und als inaktive 72 kDa Form vorliegen. In der Haut wird sie von Keratinozyten und dermalen Fibroblasten produziert. Die 92-kDa Gelatinase B (MMP-9) kann ebenfalls als aktive 92 kDa und inaktive 83 kDa Form vorliegen. MMP-9 wird von Keratinozyten produziert und in den Granula von Neutrophilen und Eosinophilen gespeichert (Katz et al, 1998). Außerdem finden sich erhöhte Gelatinase B Spiegel in Eosinophilen an Stellen der Blasenbildung bei BP-Patienten (Stahle-Bäckdahl et al, 1994). Von Gelatinase A ist bekannt, dass sie Kollagen Typ I spaltet. Gelatinase B hingegen kann die Kollagene Typ I, II und V angreifen, daneben weiß man, dass MMP-9 die extrazelluläre Domäne des 180 kDa BP Antigen 2 (BP180, Typ XVII Kollagen) spaltet. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass v.a. Gelatinase B bei der Pathogenese des BP eine Rolle spielt. Wie groß der pathogenetische Einfluß von MMP-9 ist, veranschaulicht das Tiermodell von Liu et al. 1998, in dem sie zeigten, dass Gelatinase B knock-out Mäuse gegen experimentelles BP resistent sind.

Aufgrund der oben erwähnten Beobachtungen, prüften wir in der vorliegenden Arbeit die Hypothese, ob es beim Binden der Autoantikörper an BP-180 zu einer initialen Freisetzung von Gelatinase A und/oder B kommt, die als Trigger für die Produktion von MMPs wirkt.

Anhand der vorliegenden Resultate ließ sich diese Theorie jedoch nicht bestätigen. In unseren Untersuchungen konnten wir geringe Mengen der inaktiven Formen von Gelatinase A und B in KC-Überständen nachweisen. Allerdings konnten wir keinen quantitativen Unterschied bezüglich der Mengen an Matrixmetalloproteinasen im Vergleich von mit anti-BP180 inkubierten kultivierten NHEK und NHEK nach Inkubation mit normalem IgG oder ohne Zugabe von IgG feststellen. Bei den gemessenen Mengen der Gelatinasen handelt es sich wahrscheinlich um Bestandteile einer basalen Sekretion der NHEK und nicht um die Folge des Einflusses von Autoantikörpern. Allerdings ist anzumerken, dass aufgrund der sehr geringen Menge der nachgewiesenen Gelatinasen eine exakte Quantifizierung nicht möglich war. Bezüglich der aktiven Formen von Gelatinase A und B stellten wir fest, dass diese in den KC-Überständen prinzipiell nicht nachweisbar waren.

5.3 Einfluß von Calcium auf die Expression und Verteilung von BP180 in kultivierten humanen Keratinozyten

Das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten (KC) in der menschlichen Epidermis ist ein komplexes, von zahlreichen extrazellulären Regulatoren abhängiges System. So werden Wachstum und Reifung von NHEK unter anderem von epidermal growth factor (EGF), tumor growth factor α (TGF α), keratinocyte growth factor (KGF), IL-6, IL-1 α und Retinoiden kontrolliert. Während TGF α proliferativ wirkt, ist TGF β als negativer Wachstumsregulator anzusehen (Fuchs et al, 1990). Calcium wiederum ist ein 2nd-messenger, der vorwiegend physiologisch auf die posttranslationale Modifikation von Proteinen und Enzymaktivitäten einwirkt (Jensen et al, 1990). Studien zeigen, dass Calcium das Gleichgewicht zu Gunsten der Differenzierung verschiebt. Eine hohe Calciumkonzentration in NHEK stimuliert z.B. Phospholipase A und Transglutaminase, was zu einer vermehrten Freisetzung von

Prostaglandinen und Verhornungsprozessen führt. In einem in vitro Modell zeigte sich, dass KC von Mäusen bei Calciumkonzentrationen von 0,02-0,1 mM einschichtig wachsen, eine hohe Proliferationsrate aufweisen, kaum Verhornung zeigen und schließlich an Stelle von Desmosomen durch Gap-Junctions miteinander verbunden sind. Bei Calciumkonzentrationen im Bereich von 1,2-1,8 mM hingegen wuchsen die Zellen in 4-6 Schichten und zeigten Merkmale differenzierter KC wie z.B. Verhornung. Die erste Veränderung bei Erhöhung des Calciumspiegels ist die asymmetrische Formation von Desmosomen, welche bereits 5 min nach Calciumzugabe sichtbar war (Hennings et al, 1983). Für humane KC konnten analoge Beobachtungen gemacht werden. Schließlich erwies sich eine Calciumkonzentration von 0,3 mM als Optimum bezüglich der Zellteilung. Maximale Stratifikation und Ausdifferenzierung wurden bei 1,0 mM Calciumgehalt im Medium festgestellt (Boyce et al, 1983). Dieser Effekt lässt sich möglicherweise durch die unterschiedliche Expression der Desmogleine 1 und 3, Strukturkomponenten des epidermalen Desmosoms, das die Interaktion zwischen benachbarten KC vermittelt, erklären: unter hohem Calcium ist die Expression von Desmoglein 1 und 3 höher als in niedrigem Calcium (Denning et al, 1998). Auch spielt Calcium eine Rolle in der Expression hemidesmosomaler Proteine, einschließlich $\alpha 6\beta 4$ Integrin, BP230 und BP180 (De Luca et al, 1992; Kitajima et al, 1992; 1994; Matsuoka et al, 2001).

Die Beobachtungen, dass Calcium die Differenzierung von KC und die Ausbildung von Desmosomen begünstigt, legen nahe, dass dies auch Auswirkungen auf die Bildung und Lokalisation von Hemidesmosomen und hemidesmosomalen Proteinen hat. BP-180, das Hauptantigen des BP liegt in zwei Formen in basalen Keratinozyten vor. In der apikolateralen Plasmamembran, wo es nicht an Keratinfilamente gebunden ist und in der basalen, ventralen Zellmembran an Keratinfilamente gebunden, wo es zusammen mit BP-230 in vivo Bestandteil von Hemidesmosomen ist, bzw. in vitro am Aufbau Hemidesmosomen ähnlicher Strukturen beteiligt ist. Zusätzliche Untersuchungen bei einer DJM-Zellreihe zeigten, dass BP-180 in hohem Calcium (1,65 mM) in der basalen

Plasmamembran eine ringförmige Struktur aus groben Punkten bildet. In niedrigem Calcium hingegen wurde eine homogene Verteilung feinerer Punkte beobachtet. Calciumzugabe führte zur Reduzierung der BP180 positiven Areale um mehr als 50% innerhalb von 10-15 min. Im Lauf von 4 h begann sich eine ringförmige Struktur, wie sie bei mit hohem Calciumgehalt (1,65 mM) kultivierten Zellen beobachtet worden war, zu bilden, die nach 24 h vollständig ausgebildet war. Bei konfluenten Zellen war die Ringform nicht darstellbar, stattdessen zeigte sich in niedrigem Calcium (0,15 mM) ein grobfleckiges Muster (Kitajima et al, 1992). Auch bei NHEK konnte nicht exakt die gleiche ringförmige Struktur dargestellt werden. Jedoch war ebenfalls eine Vergrößerung der Fluoreszenzpunkte unter Calciumeinfluss darstellbar. In einigen der Zellen konnte bei hohem Calcium (1,65 mM) eine Polarisation der Fluoreszenz bis hin zu Ringstrukturen ähnlich denen der DJM-Zellen nachgewiesen werden. Eine Veränderung des Calciumgehalts hatte auch hier eine Reduktion und Umverteilung von BP180 an der ventralen Plasmamembran zur Folge (Kitajima et al, 1992). Weitere Studien mit DJM-Zellen konnten zeigen, dass es nach Inkubation mit BP-Seren zu einer Reduktion des apiko-lateralen BP180 Anteils kommt, wonach BP180 in Form von Immunkomplexen intrazellulär nachweisbar ist. In der Folge von Calciumstimulation kommt es jedoch nicht wie oben beschrieben zu einer zeitabhängigen Ringbildung in der ventralen Plasmamembran. Dieser Vorgang ist auf die Internalisation von einem Teil des BP180 „Vorrats“ zurückzuführen, der in der Konsequenz bei der Neubildung hemidesmosomaler Strukturen fehlt. Dies hat zur Folge, dass die Adhärenz schon durch kleine Traumata zerstört werden kann, was möglicherweise zur Blasenbildung des BP beiträgt (Kitajima et al, 1994). Der Nachweis der Internalisation konnte auch in vivo in läsionaler und periläsionaler Haut von BP-Patienten, nicht aber in unbefallener Haut und in der Haut gesunder Probanden bestätigt werden (Kitajima et al, 1998). Auch bei Einsatz von Antikörpern gegen die BP 180 NC16A-Domäne, die in 90% der Fälle das Hauptepitop des BP ist, zeigte bei DJM-Zellen ähnliche Effekte (Kitajima et al, 2000).

Die bisherigen Daten bezüglich des Einflusses von Calcium auf die zelluläre Verteilung von BP180 nach Inkubation der Zellen mit BP180 spezifischen Antikörpern bezogen sich größtenteils auf Versuche mit einer DJM-Zelllinie. Unsere aktuelle Studie untersuchte zunächst, ob diese Beobachtungen auch für NHEK gelten. Außerdem konnte in früheren Arbeiten keine Aussage darüber gemacht werden, ob die Umverteilung von BP180 unter Calciumeinfluss und nach Stimulation mit anti-BP180 funktionelle Konsequenzen hat. Auch dieser Fragestellung gingen wir in unseren aktuellen Versuchen nach.

Von IL-8 wird nach Versuchen im Modell mit neonatalen Mäusen angenommen, dass es an der Pathogenese der Blasenbildung des BP beteiligt ist (Liu et al, 1997; 2000). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Antikörper gegen BP180 eine Signaltransduktionskette in Gang setzen, die zur Expression und Freisetzung von IL-8 aus NHEK führen (Schmidt et al, 2000; 2001). Die Möglichkeit zur Signaltransduktion durch anti-BP180 Antikörper wurde von Suzuki et al 2002 bekräftigt. Allerdings werden weitere Informationen benötigt, um die frühen Ereignisse nach dem Binden der Autoantikörper gegen BP180 an ihre Rezeptoren an der Zelloberfläche zu verstehen.

Zur Klärung der funktionellen Relevanz des Einflusses von Calcium auf Zellen im Zusammenspiel mit Autoantikörpern gegen BP180 waren in einer ersten Versuchsreihe NHEK mit anti-BP180 Antikörpern stimuliert worden. Nach 9 h Inkubationszeit mit 4 mg BP IgG/ml stiegen die IL-8 mRNA Level um das 2,5-fache im Vergleich zu Inkubation mit normalen IgG an (Schmidt et al, 2000). In diesem Fall waren die NHEK unter 0,15 mM Calcium kultiviert worden. In der vorliegenden Arbeit konnte nach Zugabe von Calcium keine signifikant erhöhte IL-8 Freisetzung gemessen werden. Durch die Stimulation der unter hohem Calciumgehalt kultivierten Keratinozyten mit Pemphigus-IgG, woraufhin es zur Freisetzung erhöhter IL-8-Mengen kam, konnten wir zeigen, dass diese Zellen prinzipiell in der Lage sind Interleukine zu produzieren. Bei der mangelnden Freisetzung von IL-8 durch NHEK, die in Medium mit hohem

Calciumgehalt (1,65 mM) kultiviert worden waren nach Inkubation mit anti-BP180 IgG, handelt es sich also um ein BP180-spezifisches Phänomen.

Der Effekt von Pemphigus-IgG auf NHEK unter niedrigem und hohem Calcium ist ausführlich untersucht (Kitajima et al, 1987; Sato et al, 2000), allerdings finden sich keine Daten über die Freisetzung von Zytokinen. Unsere Beobachtung von erhöhter Freisetzung von IL-8 in hohem, nicht jedoch in niedrigem Calcium, deckt sich mit der Tatsache, dass nur unter hohem Calcium Desmosomen gebildet werden und Desmoglein 1 und 3, die Zielantigene von Pemphigusseren in signifikanter Menge exprimiert werden (Stanley et al, 1982; Denning et al, 1998).

Im Umkehrschluss lässt sich aus der Beobachtung, dass NHEK nur in niedrigem Calcium vermehrt IL-8 freisetzen folgern, dass der Einfluß von Calcium funktionelle Konsequenzen für NHEK im Rahmen der Pathogenese des BP hat.

Nun versuchten wir den Angriffspunkt von Calcium in NHEK nach Binden von Antikörpern gegen BP180 genauer zu identifizieren. Wir zeigten, dass es in Abhängigkeit vom Calciumgehalt des Mediums zu einer unterschiedlichen Verteilung von BP180 nach 12 h Inkubation mit anti-BP180 IgG kommt. Die in niedrigem Calcium (0,15 mM) unabhängig von der Inkubationszeit beobachtete membranöse Fluoreszenz konnte durch die Konfokalaufnahmen in der apiko-lateralen Plasmamembran lokalisiert werden. Es ist also anzunehmen, dass die membranöse Fluoreszenz dem nicht mit Keratinfilamenten assoziierten BP180 „Vorrat“ entspricht. Unter Einfluß von Calcium kam es nach 12 h zu einem vollständigen Verschwinden der membranösen Fluoreszenz. Stattdessen zeigte sich eine Zusammenlagerung von BP180 in Form kleiner Plaques in Ringform intrazytoplasmatisch in der Nähe der Plasmamembran. Daneben konnte in der basalen-ventralen Plasmamembran, also im Bereich der am Aufbau der Hemidesmosomen beteiligten BP180-Menge, eine Vergrößerung des Musters unter Calcium- und Antikörpereinfluss dargestellt werden. Auch das basale, mit Keratinfilamenten assoziierte BP180 ist also von den Veränderungen betroffen. Nach diesen Beobachtungen gingen wir davon aus, dass die Unfähigkeit von NHEK in hohem

Calcium nach Inkubation mit gegen BP180 spezifischen Antikörpern IL-8 freizusetzen von der veränderten zellulären Verteilung von BP180 ausgeht.

Interessanterweise konnten wir durch die Überprüfung der BP180 Menge in Keratinozytenextrakten aus beiden Kulturen mittels Western-Blot aber auch zeigen, dass es in niedrigem Calcium zu einer geringgradig höheren Expression von BP180 in NHEK kommt. Bei der in hohem Calcium verminderten Proteinmenge in NHEK könnte es sich also auch um einen die Funktionalität der Zelle einschränkenden Faktor handeln. Diese Beobachtung führte zu der Überlegung nach weiteren Angriffspunkten von Calcium. Alternativ ist es denkbar, dass es unter dem Einfluß von Calcium zur Störung der Signaltransduktion von BP180, die durch das Binden von BP180 spezifischen Autoantikörpern in Gang gesetzt wird kommt. Diese Ansicht deckt sich mit einem Bericht über vorübergehende Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration in DJM1-Zellen nach Inkubation mit Antikörpern gegen BP180 (Suzuki et al, 2002).

Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass die Expression von BP180 in humanen KC kein statisches Geschehen ist, sondern sowohl von Calcium, als auch von gegen BP180 spezifischen Autoantikörpern beeinflusst wird. Die Beobachtung, dass die zelluläre Verteilung und Menge von BP180 funktionelle Relevanz haben könnte, bringt uns einen Schritt näher zum Verständnis des epidermalen Hemidesmosoms und spielt möglicherweise eine Rolle in der Pathogenese blasenbildender Autoimmundermatosen, die mit Antikörpern gegen BP180 assoziiert sind.

6. Schlussfolgerung

Unsere Untersuchungen legen nahe, dass durch Autoantikörper pathogene Immunmechanismen in Keratinozyten ausgelöst werden, die zur Blasenbildung des BP beitragen.

Neben eingewanderten Eosinophilen, Neutrophilen, T-Zellen und Makrophagen, setzten auch die Keratinozyten vor Ort Zytokine und Proteasen frei. Bei experimentellem, murinem BP konnte das u.a. für t-PA und IL-8 gezeigt werden (Liu et al, 1995, 2000). Im Rahmen unseres Keratinozytenmodells wurde die Produktion von Interleukinen und Proteasen an kultivierten neonatalen NHEK gemessen. Bei den Untersuchungen bezüglich der Matrixmetalloproteinasen (MMP) konnten wir geringe Mengen der inaktiven Formen von MMP-2 und MMP-9 nachweisen. Hierbei handelte es sich jedoch lediglich um Enzyme, die im Rahmen einer basalen Sekretion durch die Keratinozyten freigesetzt werden. Eine erhöhte Freisetzung nach Stimulation mit Autoantikörpern konnte nicht gezeigt werden. Bezüglich des Plasminogenaktivatoren-Systems bestimmten wir die Freisetzung von t-PA, u-PA und PAI-1 in kultivierten NHEK. Während u-PA nach Inkubation mit BP-IgG nicht vermehrt aus Keratinozyten freigesetzt wurde, sind die gemessenen erhöhten t-PA-Spiegel möglicherweise ein wichtiger Schritt bei der Blasenbildung.

Bei Calcium handelt es sich um einen für die Differenzierung und Proliferation essentiellen Faktor. Unter Calciumeinfluß kommt es im Rahmen physiologischer Prozesse zu einer Verminderung von BP180 in der Plasmamembran von Keratinozyten. Bei gleichzeitiger Stimulation mit Autoantikörpern konnten wir das vollständige Verschwinden von BP180 aus der apiko-lateralen Zellwand beobachten. Dieser Vorgang ist als Summationseffekt von Calcium und dem Binden von Autoantikörpern an BP180 zu werten. Während Calcium im Rahmen physiologischer Umstrukturierungen zur Reduktion von BP180 in der Plasmamembran führt, legt die von uns beobachtete intrazelluläre Fluoreszenz eine Internalisation von BP180 nach

Binden der Antikörper nahe. Treten beide Effekte gleichzeitig auf, kommt es im Zeitverlauf zum vollständigen Verschwinden von BP180 aus der Plasmamembran. Nachdem es unter calciumreichen Bedingungen zu einer verminderten Freisetzung von IL-8 kommt, scheint das Zusammenwirken von Calcium und Autoantikörpern neben der strukturellen auch eine funktionelle Relevanz zu haben. Unsere Ergebnisse der erhöhten Freisetzung von t-PA und die Calcium-Abhängigkeit der vermehrten Sekretion von IL-8 aus kultivierten NHEK nach Inkubation mit BP-IgG unterstreichen die Bedeutung der KC in der Pathogenese des BP. Sie untermauern zudem die Relevanz von anti-BP180 Antikörpern bei der Blasenbildung des BP.

7. Zusammenfassung

Das bullöse Pemphigoid (BP) ist eine subepidermal blasenbildende Autoimmundermatose mit Autoantikörpern gegen die hemidesmosomalen Proteine BP180 und BP230. Die pathogenetische Relevanz von Antikörpern gegen BP180 wurde zuvor sowohl in vivo als auch in vitro nachgewiesen. Außerdem war gezeigt worden, dass Plasminogenaktivator (PA) und Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9) knock-out Mäuse nicht mehr in der Lage sind, nach Injektion von anti-BP180 Antikörpern subepidermale Blasen auszubilden. Patienten mit BP weisen erhöhte Spiegel von tissue-type PA, nicht aber von urokinase-type PA, in läsionaler Haut und Blasenflüssigkeiten auf. Der Nachweis von erhöhten mRNA Spiegeln von t-PA in Keratinozyten aus BP-Läsionen legte diese Zellen als Quelle für die t-PA Produktion nahe. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit gingen wir daher der Frage nach, ob die Bindung von anti-BP180 IgG an ihren Oberflächenrezeptor auf kultivierten normalen epidermalen Keratinozyten (NHEK) zur Freisetzung von Plasminogenaktivatoren und Matrixmetalloproteinasen führt.

In Überständen kultivierter NHEK fanden wir nach Stimulation mit IgG von BP-Patienten bzw. Kaninchen, die mit humanem BP180 NC16A immunisiert worden waren, erhöhte Spiegel von t-PA, nicht aber von u-PA. Die Tatsache, dass in weiteren Untersuchungen mittels ELISA keine erhöhte Plasminogenaktivität nachgewiesen werden konnte, lässt sich möglicherweise durch die erhöhten Spiegel von Plasminogenaktivatorinhibitor 1 (PAI-1) erklären.

Anders als bei t-PA beobachteten wir nach Inkubation mit anti-BP180 Antikörpern eine nur minimale Freisetzung von MMP-2 und MMP-9 aus NHEK. Beide Proteasen waren in der Zymographie darstellbar, nicht aber mittels Western-Blot, was durch die unterschiedliche Sensitivität der Verfahren erklärbar ist. Es ist somit denkbar, dass es sich bei den in Keratinozyten-Überständen nachweisbaren MMP-2- und MMP-9-

Konzentrationen um das Ergebnis einer basalen Sekretion handelt, die durch die Bindung der BP180-spezifischen Autoantikörper nicht beeinflusst werden.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit basiert auf der Beobachtung an kultivierten DJM-1 Zellen, einer Spinaliomzelllinie, dass die Expression von BP180 sowohl durch die Calciumkonzentration als auch durch die Bindung von BP180-spezifischen Antikörpern beeinflusst wird. Wir untersuchten NHEK mit Hilfe der Konfokallasermikroskopie und zeigten, dass nach Inkubation mit normalem IgG BP180 unabhängig vom Calciumgehalt, hauptsächlich an der Zelloberfläche exprimiert wird. Nach 12 h Inkubation mit BP180-spezifischen Antikörpern kam es jedoch zu einer starken Verminderung von BP180 in der Cytoplasmamembran und einer punktförmigen BP180-Anfärbung entlang der inneren Zellmembran. Wenn die Keratinozyten unter niedrigen Calciumbedingungen kultiviert wurden, zeigte sich eine geringgradig höhere Expression von BP180. In der Folge gingen wir der Frage nach, ob die beobachtete veränderte BP180-Expression unter Calciumeinfluß zu funktionellen Konsequenzen für die Zellen führt. Unsere Versuche zeigten eine verminderte Freisetzung von IL-8 aus unter niedrigen Calciumbedingungen kultivierten NHEK nach Stimulation mit BP-IgG. Da wir zeigen konnten, dass die Zellen prinzipiell in der Lage waren, IL-8 zu produzieren, schlossen wir, dass möglicherweise die durch Calcium beeinflusste zelluläre Verteilung von BP180 für die unterschiedliche IL-8 Freisetzung aus den Keratinozyten verantwortlich ist.

Zusammenfassend haben wir gezeigt, dass es durch die Bindung von BP180-spezifischen Antikörper zur Freisetzung von t-PA, nicht jedoch von u-PA aus kultivierten NHEK kommt, und dass die BP180-vermittelte Freisetzung von IL-8 aus Keratinozyten von der extrazellulären Calciumkonzentration abhängt. Somit scheint der Keratinozyt nicht nur passiver Träger der Zielantigene zu sein, sondern vielmehr eine aktive Rolle in der Pathogenese des BP zu spielen.

8. Literaturverzeichnis

Ambach A, Zillikens D, Klingert B, Hartmann AA, Burg G. Immunphänotypisierung des mononukleären Infiltrats beim bullösen Pemphigoid. *Hautarzt* 1992; 43: 81-85

Ameglio F, D'Auria L, Cordiali-Fei P, Mussi A, Valenzano L, D'Agosto G, Ferraro C, Bonifati C, Giacalone B. Bullous Pemphigoid and pemphigus vulgaris: correlated behaviour of serum VEGF, sE-selectin and TNF-alpha levels. *J Biol Regul Homeost Agent* 1997; 11: 148-153

Ameglio F, D'Auria L, Bonifati C, Ferraro C, Mastroianni A, Giacalone B. Cytokine pattern in blister fluid and serum of patients with bullous pemphigoid: relationship with disease intensity. *Br J Dermatol* 1998, 138: 611-614

Baird J, Lazarus GS, Belin D, Vassalli JD, Busso N, Gubler P, Jensen PJ. mRNA for tissue-type plasminogen activator is present in lesional epidermis from patients with psoriasis, pemphigus, or bullous pemphigoid, but is not detected in normal epidermis. *J Invest Dermatol* 1990; 95: 548-552

Balding SD, Diaz LA, Giudice GJ. A recombinant form of the human BP180 ectodomain forms a collagen-like, homotrimeric complex. *Biochemistry* 1997; 36: 8821-8830

Boyce ST, Ham RG. Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J Invest Dermatol* 1983; 81: 33-40

Dano K, Dabelsteen E, Nielsen LS, Kaltoft K, Wilson EL, Zeuthen J. Plasminogen activating enzyme in cultured glioblastoma cells. An immunofluorescence study with monoclonal antibody. *J Histochem Cytochem* 1982; 30: 1165-1170

De Luca M, Pellegrini G, Bondanza S, Cremona O, Savoia P, Cancedda R, Marchisio PC. The control of polarized integrin topography and the organization of adhesion-related cytoskeleton in normal human epidermal keratinocytes depend upon number of passages in culture and ionic environment. *Exp Cell Res* 1992, 202: 142-150

Denning MF, Guy SG, Ellerbroek SM, Norvell SM, Kowalczyk AP, Green KJ. The expression of desmoglein isoforms in cultured human keratinocytes is regulated by calcium, serum, and protein kinase C. *Exp Cell Res* 1998; 239: 50-59

Döpp R, Schmidt E, Chimanovitch I, Bröcker EB, Zillikens D. IgG4 and IgE are the major immunoglobulins targeting the NC16A domain of BP180 in bullous pemphigoid: serum levels of these immunoglobulins reflect disease activity. *J Am Acad Dermatol* 2000; 42: 577-583

Fuchs E. Epidermal differentiation: The bare essentials. *J Cell Biol* 1990; 111: 2807-2814

Gammon WR, Merrit CC, Lewis DM, Sams WM Jr, Carlo JR, Wheeler CE Jr. An in vitro model of immune complex-mediated basement membrane zone separation caused by pemphigoid antibodies, leukocytes, and complement. *J Invest Dermatol* 1982; 78: 285-290

Giudice GJ, Emery DJ, Zelickson BD, Anhalt GJ, Liu Z, Diaz LA. Bullous pemphigoid and herpes gestationis autoantibodies recognize a common non-collagenous site on the BP180 ectodomain. *J Immunol* 1993; 151: 5742-5750

Giudice GJ, Emery DJ, Diaz LA. Cloning and primary structural analysis of the bullous pemphigoid autoantigen BP180. *J Invest Dermatol* 1992; 99: 243-250

Gissler HM, Simon MM, Kramer MD. Enhanced association of plasminogen/plasmin with lesional epidermis of bullous pemphigoid. *Br J Dermatol* 1992; 127: 272-277

Hall RP, Murray JC, McCord MM, Rico MJ, Streilein RD. Rabbits immunized with a peptide encoded for by the 230-kD bullous pemphigoid antigen cDNA develop an enhanced inflammatory response to UVB irradiation: a potential animal model for bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 1993; 101: 9-14

Hennings H, Holbrook KA. Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture. *Exp Cell Res* 1983; 43: 127-142

Hirako Y, Usukura J, Nishizawa Y, Owaribe K. Demonstration of the molecular shape of BP180, an 180kDa Bullous Pemphigoid antigen and its potential for trimmer formation. *J Biol Chem* 1996; 271: 13739-13745

Hoylaerts M, Rijken DC, Lijnen HR, Collen D. Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *J Biol Chem* 1982; 257: 2912-2919

Jensen PJ, Baird J, Morioka S, Lessin S, Lazarus GS. Epidermal plasminogen activator is abnormal in cutaneous lesions. *J Invest Dermatol* 1988; 90: 777-782

Jensen PJ, John M, Baird J. Urokinase and tissue type plasminogen activators in human keratinocyte culture. *Exp Cell Res* 1990; 187: 162-169

Jensen PK, Norgard JO, Knudsen C, Nielsen V, Bolund L. Effects of extra- and intracellular calcium concentration on DNA replication, lateral growth, and differentiation of human epidermal cells in culture. *Virchows Archiv B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1990; 59: 17-25

Jung M, Kippes W, Messer G, Zillikens D, Rzany B. Increased risk of bullous pemphigoid in male and very old patients: A population-based study on incidence. *J Am Acad Dermatol* 1999; 41: 266-268

Kähäri VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* 1997; 6: 199-213

Katz AB, Taichman LB. A partial catalog of proteins secreted by epidermal keratinocytes in culture. *J Invest Dermatol* 1999; 112: 818-821

Kelly SE, Cerio R, Bhogal BS, Black MM. The distribution of IgG subclasses in pemphigoid gestationis: PG factor is an IgG1 antibody. *J Invest Dermatol* 1989; 92: 695-698

Kitajima Y, Owaribe K, Nishizawa Y, Jokura Y, Yaoita H. Phorbol ester- and calcium-induced reorganization of 180-kDa bullous pemphigoid antigen on the ventral surface of cultured human keratinocytes as studied by immunofluorescence and immunoelectron microscopy. *Exp Cell Res* 1992; 203: 17-24

Kitajima Y, Suzuki M, Johkura Y. Localized bullous pemphigoid: report of a case with an immunofluorescence and electron microscopical studies on the lesional distribution of 180-KD bullous pemphigoid antigen, beta 4 integrin, and type VII collagen. *J Dermatol* 1993, 20: 406-412

Kitajima Y, Hirako Y, Owaribe K, Mori S, Yaoita H. Antibody-binding to the 180-kD bullous pemphigoid antigens at the lateral cell surface causes their internalization and inhibits their assembly at the basal cell surface in cultured keratinocytes. *J Dermatol* 1994; 21: 838-846

Kitajima Y, Hirako Y, Owaribe K, Yaoita H. A possible cell-biologic mechanism involved in blister formation of bullous pemphigoid: Anti-BP180-kD BPA antibody is an initiator. *Dermatology* 1994; 189: 46-49

Kitajima Y. Adhesion molecules in the pathophysiology of bullous diseases. *Eur J Dermatol* 1996; 6: 399-405

Kitajima Y, Nojiri M, Yamada T. Internalization of the 180 kDa bullous pemphigoid antigen as immune complexes in basal keratinocytes: an important early event in blister formation in bullous pemphigoid. *Br J Dermatol* 1998; 138: 71-76

Kitajima Y, Aoyama Y, Seishima M. 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* 1999; 4: 137-144

Kitajima Y. Blistering mechanisms in bullous pemphigoid after binding of autoantibodies to the antigen. *Korean J Invest Dermatol* 2000; 7: 78-86

Kramer MD, Reinartz J. The presence of plasmin/ α 2-antiplasmin complexes in skin blister fluid indicates plasmin generation in lesional skin. *J Clin Invest* 1993; 92: 978-983

Kramer MD, Schaefer B, Reinartz J. Plasminogen activation by human keratinocytes: molecular pathways and cell-biological consequences. *Biological Chemistry* 1995; 376: 131-141

Liu Z, Diaz LA, Troy JL, Taylor AF, Emery DJ, Fairley JA, Giudice GJ. A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. *J Clin Invest* 1993; 92: 2480-2488

Liu Z, Shipley M, Vu TH, Zhou X, Diaz LA, Werb Z, Senior RM. Gelatinase B-deficient mice are resistant to experimental bullous pemphigoid. *J Exp Med* 1998; 188: 475-482

Liu Z, Shapiro SD, Zhou X, Twining SS, Senior RM, Giudice GJ, Fairley JA, Diaz LA. A critical role of neutrophil elastase in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest* 2000; 105: 113-123

Liu Z, Zhou X, Shapiro SD, Shipley M, Twining SS, Diaz LA, Senior RM, Werb Z. The serpin α 1-proteinase inhibitor is a critical substrate for gelatinase B/MMP-9 in vivo. *Cell* 2000; 102: 647-655

Liu Z, Li N, Diaz LA, Shipley M, Senior RM, Werb Z. Synergy between a plasminogen cascade and MMP-9 in autoimmune disease. *J Clin Invest* 2005; 115: 879-887

Matsuoka Y, Yamada T, Seishima M, Hirako Y, Owaribe K, Kitajima Y. Transient translocation of hemidesmosomal bullous pemphigoid antigen 1 from cytosol to membrane fractions by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate treatment and calcium-switch in a human carcinoma cell line. *J Dermatol Sci* 2001; 27: 206-214

Naito K, Morioka S, Ogawa H. The pathogenic mechanisms of blister formation in bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 1982; 79: 303-306

Pas HH, Jong MCJM de, Jonkmann MF, Heeres K, Slijper-Pal IJ, van der Meer JB. Bullous pemphigoid: serum antibody titre and antigen specificity. *Exp Dermatol* 1995; 4: 372-376

Perriard J, Jaunin F, Favre B, Büdinger L, Hertl M, Saurat JH, Borradori L. IgG autoantibodies from bullous pemphigoid (BP) patients bind antigenic sites on both the extracellular and the intracellular domains of the BP antigen 180. *J Invest Dermatol* 1999; 112: 141-147

Saksela O. Plasminogen activation and regulation of pericellular proteolysis. *Biochem Biophys Acta* 1985; 823: 35-65

Sato M, Aoyama Y, Kitajima Y. Assembly pathway of desmoglein 3 to desmosomes and its perturbation by pemphigus vulgaris-IgG in cultured keratinocytes, as revealed by time-lapsed labelling immunoelectron microscopy. *Lab Invest* 2000; 80: 1583-1592

Schmidt E, Bröcker EB, Zillikens D. High levels of soluble CD23 in blister fluid of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 1995; 131: 966-967

Schmidt E, Bastian B, Dummer R, Tony HP, Bröcker EB, Zillikens D. Detection of elevated levels of IL-4, IL-6, and IL-10 in blister fluid of bullous pemphigoid. Arch Dermatol Res 1996; 288: 353-357

Schmidt E, Mittnacht A, Schömig H, Dummer R, Bröcker EB, Zillikens D. Detection of IL-1 α , IL-1 β , and IL-1 receptor antagonist in blister fluid of bullous pemphigoid. J Dermatol Sci 1996; 11: 142-147

Schmidt E, Ambach A, Bastian B, Bröcker EB, Zillikens D. Elevated levels of interleukin-8 in blister fluid of bullous pemphigoid compared with suction blisters of healthy controls. J Am Acad Dermatol 1996; 34: 310-312

Schmidt E, Zillikens D. Autoimmune and inherited subepidermal blistering disease: advances in clinic and laboratory. Adv Dermatol 2000; 16: 113-157

Schmidt E, Bröcker EB, Zillikens D. Neue Aspekte zur Pathogenese des bullösen Pemphigoids. Hautarzt 2000(a); 51: 637-645

Schmidt E, Obe K, Bröcker EB, Zillikens D. Serum levels of autoantibodies to BP 180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid. Arch Dermatol 2000(b); 136: 174-178

Schmidt E, Reimer S, Kruse N, Jainta S, Bröcker EB, Marinkovich P, Giudice G, Zillikens D. Autoantibodies to BP180 associated with bullous pemphigoid release Interleukin-6 and Interleukin-8 from cultured human keratinocytes. J Invest Dermatol 2000(c); 842-848

Schmidt E, Reimers S, Kruse N, Bröcker EB, Zillikens D. The IL-8 release from cultured human keratinocytes, mediated by antibodies to bullous pemphigoid autoantigen 180, is inhibited by dapsone. *Clin Exp Immunol* 2001; 124: 157-162

Schmidt E, Wehr B, Tabengwa EM, Reimer S, Marinkovich MP, Bröcker EB, Zillikens D. Tissue-type, but not urokinase-type, plasminogen activator is released after binding of autoantibodies to bullous pemphigoid antigen 180 in human keratinocytes. *Clin Exp Immunol* 2004; 135: 497-504

Schmidt E, Wehr B, Wolff K, Sitaru C, Bröcker EB, Zillikens D. Localisation of bullous pemphigoid antigen 180 (BP180) in cultured human keratinocytes: Functionally relevant modification by calcium. *Arch Dermatol Res* 2006; 298: 283-290

Silverstein RL, Nachman RL, Leung LL, Harpel PC. Activation of immobilized plasminogen by tissue activator. Multimolecular complex formation. *J Biol Chem* 1985; 260: 10346-10352

Sitaru C, Schmidt E, Petermann S, Munteanu LS, Bröcker EB, Zillikens D. Autoantibodies to BP180 induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 664-671

Stahle-Bäckdahl M, Inoue M, Giudice GJ, Parks WC. 92-kD gelatinase is produced by eosinophiles at the site of blister formation in bullous pemphigoid and cleaves the extracellular domain of recombinant 180-kD bullous pemphigoid autoantigen. *J Clin Invest* 1994; 93: 2022-2030

Stanley JR, Hawley-Nelson P, Yuspa SH, Shevack EM, Katz SI. Characterization of bullous pemphigoid antigen: a unique basement membrane protein of stratified epithelia. *Cell* 1981; 24: 897-903

Stanley JR, Yuspa SH. Specific epidermal protein markers are modulated during calcium-induced terminal differentiation. *J Cell Biol* 1983; 96: 1809-14

Suzuki M, Murata S, Yaoita H, Nakagawa H. An antibody to BP180-kDa antigen is able to induce an increase of intracellular calcium concentration in DJM-1 (human squamous cell carcinoma) cells. *Autoimmunity* 2002; 35: 271-276

Venning VA, Wojnarowska, F, Cederholm-Williams S. An immunohistochemical study of the distribution of plasminogen and plasminogen activators in bullous pemphigoid. *Clin Exp Dermatol* 1993; 18: 119-123

Zentner A, Rendl J, Grelle I, Dummer R, Bröcker EB, Zillikens D. Elevated levels of soluble tumor necrosis factor receptor I in blister fluid of bullous pemphigoid and suction blisters. *Arch Dermatol Res* 1994; 286: 355-357

Zillikens D, Schuessler M, Dummer R, Porzolt F, Hartmann AA, Burg G. Tumor necrosis factor in blister fluids of bullous pemphigoid. *Eur J Dermatol* 1992; 2: 429-431

Zillikens D, Ambach A, Schuessler M, Dummer R, Hartmann AA, Burg G. The interleukin-2 receptor in lesions and serum of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol Res* 1992; 284: 141-145

Zillikens D, Wever S, Roth A, Weidenthaler-Barth B, Hashimoto T, Bröcker EB. Incidence of autoimmune subepidermal blistering diseases in a region of central Germany. *Arch Dermatol* 1995; 131: 957-958

Zillikens D, Giudice GJ, Diaz LA. Bullous pemphigoid. An autoimmune blistering disease of the elderly. *J Geriatr Dermatol* 1996; 4: 35-41

Zillikens D, Kawahara Y, Ishiko A, Shimizu H, Mayer J, Rank CV, Liu Z, Giudice GJ, Tran HH, Marinkovich MP, Bröcker EB, Hashimoto T. A novel subepidermal blistering disease with autoantibodies to a 200-kDa antigen of the basement membrane zone. *J Invest Dermatol* 1996; 109: 1333-1338

Zillikens D, Rose PA, Balding SD. Tight clustering of extracellular BP180 epitopes recognized by bullous pemphigoid autoantibodies. *J Invest Dermatol* 1997; 109: 573-579

Zillikens D, Mascaro JM, Rose PA. A highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of circulating anti-BP180 autoantibodies in patients with bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 1997; 109: 679-683

Zillikens D, Giudice GJ. BP180/type XVII collagen: Its role in acquired and inherited disorders of the dermal-epidermal junction. *Arch Dermatol Res* 1999; 291: 187-194

Zillikens D. Acquired skin disease of hemidesmosomes. *J Dermatol Sci* 1999; 20: 134-154

Zillikens D. Bullöse Autoimmundermatosen. In: Dermatologie und Venerologie, Hrsg: Braun-Falco O, Plewig G, Wolff H, Burgdorf W, Landthaler M; Springer Heidelberg, 5.Auflage 2005; pp 607-638

9. Anhang

9.1 Abkürzungen

AG	Antigen
AK	Antikörper
BP	bullöses Pemphigoid
bzw.	beziehungsweise
C	Complement
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD	cluster of differentiation
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
DIF	direkte Immunfluoreszenz
DJM-Zellen	Zellreihe eines Sichelzellkarzinoms
EGF	epidermal growth factor
HRP	horseradish peroxidase
IgG	Immunglobulin G
IIF	indirekte Immunfluoreszenz
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
KGF	keratinocyte growth factor
KGM	keratinocyte growth medium
MF	membranöse Fluoreszenz
mg/ml	Milligramm pro Milliliter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure

MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NC	non-collagenous
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
NHEK	normale humane epidermale Keratinozyten
NHS	normales humanes Serum
NRS	normal rabbit serum
PAI-1	Plasminogenaktivator-Inhibitor-1
PBS	phosphate buffered saline
PET	PBS-EDTA-Tween
PF	Pemphigus foliaceus
pg/ml	Picogramm pro Milliliter
Pkt	intrazelluläre punktförmige Fluoreszenz
PNA	p-Nitroanillin
PV	Pemphigus vulgaris
Ring	intrazelluläre ringförmige punktuelle Verdichtungen der Fluoreszenz
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
TBST	tris buffered saline plus tween
TGF	transforming growth factor
TH	T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
t-PA	tissue-type plasminogenaktivator
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
u-PA	urokinase-type plasminogenaktivator
v.a.	vor allem
WB	Western Blot

9.2 Eigene Veröffentlichungen

Auszüge aus dieser Arbeit wurden in folgenden Originalarbeiten veröffentlicht:

Schmidt E, Wehr B, Tabengwa EM, Reimer S, Marinkovich MP, Bröcker EB, Zillikens D. Tissue-type, but not urokinase-type, plasminogen activator is released after binding of autoantibodies to bullous pemphigoid antigen 180 in human keratinocytes. Clin Exp Immunol 2004; 135: 497-504

Schmidt E, Wehr B, Wolff K, Sitaru C, Bröcker EB, Zillikens D. Localisation of bullous pemphigoid antigen 180 (BP180) in cultured human keratinocytes: Functionally relevant modification by calcium. Arch Dermatol Res 2006; 298: 283-290

Auszüge dieser Arbeit wurden außerdem in folgendem Abstract veröffentlicht und als Poster präsentiert:

Schmidt E, Wehr B, Sitaru C, Hirako Y, Bröcker E-B, Zillikens D. Localisation of bullous pemphigoid antigen 180 (BP180) in cultured human keratinocytes: functionally relevant modification by the binding of BP180-specific antibodies. 30. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, 27.02.-01.03.2003, Frankfurt. Arch Dermatol Res 2003, 294: 512

Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. E.-B. Bröcker dafür, dass ich die Möglichkeit hatte, diese Arbeit an der Klinik und Poliklinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten der Universität Würzburg durchzuführen.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. D. Zillikens möchte ich herzlich danken, dass er mir diese Arbeit anvertraut hat und mir wann immer nötig mit fachlichen und methodischen Ratschlägen zur Seite stand.

Auch möchte ich Herrn Dr. med. Dr. rer. nat. Enno Schmidt für die regelmäßige und ausführliche Betreuung, sowohl beim praktischen Teil dieser Arbeit, als auch bei der anschließenden Ausarbeitung danken.

Ein besonderes Dankeschön möchte ich Frau Dr. Katarina Wolf sagen, für die Einarbeitung und die sehr zeitintensive Hilfe bei den Konfokalaufnahmen.

Herrn Dr. Cassian Sitaru möchte ich für die Durchführung des BP180 Western Blots danken und dafür, dass er trotz zahlreicher eigener Projekte, stets ein offenes Ohr für fachliche Fragen meinerseits hatte.

Mein Dank gilt auch dem Team des Immunfluoreszenzlabors, für seine allzeitige Hilfsbereitschaft in praktischen Fragen und die herzliche Arbeitsatmosphäre.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Barbara Wehr
Geburtsdatum 04.04.1978
Geburtsort Würzburg
Familienstand verheiratet, 1 Kind

Schulbildung

09/1984 – 07/1988 Grundschule Marktbreit
09/1988 – 06/1997 Gymnasium Marktbreit
Abschluss: Abitur
kleines Latinum

Hochschulbildung

11/1997 – 10/2004 Studium der Humanmedizin Julius-Maximilians-Universität
Würzburg

praktisches Jahr

05/2003-08/2003 Chirurgie: Universitätsklinikum Würzburg
Regionalspital Thusis, Schweiz

08/2003-11/2003 Innere Medizin: Endokrinologie, Kardiologie, Gastroenterologie
Universitätsklinik Würzburg

12/2003-03/2004 Gynäkologie Universitätsfrauenklinik Würzburg

Examina

09/1999 ärztliche Vorprüfung
08/2000 1. Staatsexamen
03/2003 2. Staatsexamen
05/2004 3. Staatsexamen

10/2004 Approbation als Ärztin

06/2004-09/2005 Elternzeit
seit 09/2005 Assistenzärztin der Gynäkologie und Geburtshilfe
Praxisgemeinschaft Dr Kellermann/Hernas u. Markt Krankenhaus
Werneck

Werneck, den 31.03.2007