

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Universität Würzburg
Lehrstuhl Anatomie III
Vorstand: Professor Dr. med. J. Waschke

Die Rolle des Zytoskeletts in der Pathogenese des Pemphigus vulgaris

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

vorgelegt von
Martin Gliem
aus Duisburg

Würzburg, Dezember 2011

Referent: Prof. Dr. med. Jens Waschke
Koreferent: Prof. Dr. med. Matthias Goebeler
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 28.09.2012

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Epidermis.....	1
1.2	Interzellularkontakte.....	2
1.3	Adhäsionskontakte.....	2
1.3.1	Adhärenskontakte.....	2
1.3.2	Desmosomen.....	4
1.4	Zytoskelettsysteme der Zelle.....	7
1.4.1	Mikrotubuli.....	8
1.4.2	Intermediärfilamente.....	9
1.4.3	Actinfilamente.....	13
1.5	Pemphigus.....	18
1.5.1	Klinik.....	18
1.5.2	Pathogenese.....	21
1.6	Fragestellung.....	24
2	Material und Methoden.....	26
2.1	Zellkultur.....	26
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	26
2.2.1	Konstrukte.....	27
2.2.2	Vermehrung und Reinigung der DNA.....	28
2.2.3	Transfektion.....	29
2.3	Aufreinigung der Patienten- und Kontroll-Antikörper.....	30
2.4	Antikörper und Testreagenzien.....	31
2.4.1	Primärantikörper.....	31
2.4.2	Sekundärantikörper.....	32
2.4.3	Farbstoff-gekoppelte Antikörper.....	32
2.4.4	Weitere Farbstoff-gekoppelte Substanzen.....	32
2.4.5	Testreagenzien.....	32
2.5	Indirekte Immunofluoreszenzmikroskopie.....	33
2.6	Proteinextraktion.....	35
2.7	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	35

2.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	36
2.9	Western Blot-Analysen	37
2.10	Immunodetektion von Proteinen	37
2.11	Triton-X-100-vermittelte Proteinextraktion	38
2.12	Dispase-basierter Keratinozyten-Dissoziations-Versuch	39
2.13	Bildaufnahme und –bearbeitung.....	39
2.14	Live Cell Imaging.....	40
2.15	Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP).....	40
2.16	Statistik	41
3	Ergebnisse	42
3.1	Zeitabhängigkeit der Effekte von PV-IgG auf humane Keratinozyten	42
3.1.1	Effekte auf das Zytoskelett.....	42
3.1.2	Effekte auf die Zell-Dissoziation.....	48
3.1.3	Effekte auf die Dynamik von ZK- und Actinfilamenten	50
3.2	Bedeutung von p38MAPK und E-Cadherin für die PV-IgG-induzierten Effekte	51
3.2.1	Bedeutung der p38MAPK für ZK-Retraktion und Zell-Dissoziation	51
3.2.2	Einfluss einer Zytokeratin-Überexpression auf die PV-IgG-induzierte Dsg3-Reorganisation, ZK-Retraktion und Zell-Dissoziation.....	53
3.2.3	Einfluss einer E-Cadherin-Überexpression auf die PV-IgG-induzierte Dsg3-Reorganisation, ZK-Retraktion und Zell-Dissoziation.....	55
3.2.4	Einfluss einer E-Cadherin-Überexpression auf die p38MAPK-Aktivierung bei PV	59
3.3	Bedeutung des Actin-Zytoskeletts für die PV-IgG-induzierten Effekte	62
3.3.1	Pharmakologische Modulation des Actin-Zytoskeletts	62
3.3.2	Überexpression von Actin	67
3.3.3	Actinabhängigkeit der RhoA-vermittelten Protektion bei PV	69
4	Diskussion	71
4.1	E-Cadherin moduliert für die PV-Pathogenese wichtige intrazelluläre Signalwege	71
4.2	Actinfilamente haben eine wichtige Rolle für die PV-Pathogenese.....	74

4.3	Die ZK-Retraktion könnte im Rahmen der PV-Pathogenese zur Zell-Dissoziation beitragen	78
4.4	Ausblick.....	83
5	Zusammenfassung.....	85
6	Literaturverzeichnis	87

1 Einleitung

1.1 Epidermis

Die Hautdecke, die den menschlichen Körper nach außen abgrenzt, besteht aus der Kutis und der darunterliegenden Subkutis. Die Kutis wird weiter untergliedert in die Dermis und die Epidermis, welche die oberflächlichste Schicht der Haut darstellt. Die Epidermis ist ein mehrschichtiges verhornendes Plattenepithel, dessen vorherrschender Zelltyp die Keratinozyten sind. Sie hat vor allem die Aufgabe, den Organismus nach außen hin abzugrenzen. Aus diesem Grunde besitzt sie eine große mechanische Stabilität. Doch auch gegenüber chemischen Einflüssen wirkt sie protektiv. Der so genannte Lipidverschluss verhindert nicht nur das Eindringen hydrophiler Stoffe von außen, sondern verhindert auch den transepidermalen Wasserverlust von innen nach außen. Durch Einlagerung von Rezeptoren ist die Epidermis darüber hinaus zur Wahrnehmung von Temperatur-, Schmerz- und Berührungsempfindungen fähig (Lüllmann-Rauch 2004).

Während ihrer Entwicklung wandern die Keratinozyten von der Basalmembran ausgehend kontinuierlich nach oben, um dann letztendlich als Hornschuppe abgestoßen zu werden. Während dieser Wanderung sind die Keratinozyten kontinuierlichen Umbauprozessen unterworfen, die zu charakteristischen morphologischen Veränderungen führen. Anhand dieser Veränderungen kann die Epidermis in 4 verschiedene Schichten eingeteilt werden. Die tiefste Schicht, welche direkt mit der Basalmembran verbunden ist, stellt das Stratum basale (Basalzellschicht) dar. Dort liegen die Stammzellen der Epidermis, die das Reservoir für die aufsteigenden Zellen bilden. Darauf folgt das Stratum spinosum (Stachelzellschicht), dessen Zellen durch eine Vermehrung von Desmosomen, in welche Zytokeratin-Bündel einstrahlen, ein stachelförmiges Aussehen annehmen. Die nächste Schicht bildet das Stratum granulosum (Körnerzellschicht). Namensgebend für diese Schicht sind so genannte Keratohyalingranula, welche Proteine wie Profilaggerin enthalten und den Verhornungsprozess einleiten. Abschließend folgt das Stratum corneum (Hornschicht), in dem es zu einer Auflösung von Kern und Organellen kommt und die nunmehr toten Hornzellen durch mechanische Einflüsse abgeschilfert werden (Lüllmann-Rauch 2004).

1.2 Interzellularkontakte

Für die Integrität eines Zellverbandes sind Interzellularkontakte von großer Bedeutung. Anhand Ihrer Hauptfunktionen werden diese in 3 Gruppen eingeteilt: Adhäsionskontakte, Kommunikationskontakte und Barrierekontakte. Der Hauptvertreter der Barrierekontakte sind die so genannten Zonulae occludentes oder Tight junctions, welche den Interzellularraum über spezielle Membranmoleküle wie z.B. Occludin oder Claudin fest verschließen. Dadurch haben diese Kontakte wesentliche Funktionen in der Regulation der Permeabilität und des elektrischen Widerstandes eines Gewebeverbandes, aber auch für die polare Differenzierung von Zellen. Aufgabe der Kommunikationskontakte ist es hingegen, Verbindungen zwischen den Zellen herzustellen. Dies geschieht im Wesentlichen über Nexus. Deren Hauptbestandteil, die Connexine, lagern sich seitlich aneinander und bilden transmembranöse Halbkanäle (Connexone). Durch Zusammenlagerung mit Connexonen gegenüberliegender Zellen, entstehen Kanäle, welche die Zellen direkt miteinander verbinden. Durch diese direkte Verbindung von Zellen ermöglichen Nexus eine metabolische und elektrische Kopplung von Zellen im Zellverband. Die Adhäsionskontakte stellen die dritte Gruppe der Interzellularkontakte dar (Drenckhahn 2008)

1.3 Adhäsionskontakte

Adhäsionskontakte haben die Hauptfunktion, die mechanische Stabilität der Zell-Zell-Kontakte zu gewährleisten. Die Adhäsionskontakte werden ihrerseits wiederum aufgrund struktureller Unterschiede in Desmosomen und Adhärenskontakte unterteilt. Trotz dieser Unterschiede haben beide einen ähnlichen Aufbau. Transmembranäre Zell-Adhäsionsproteine aus der Familie der Cadherine stellen die interzelluläre Adhäsion durch Bindung an Cadherine anderer Zellen her. Die Transmembranproteine wiederum werden über so genannte Plaqueproteine mit zytoskelettalen Komponenten verknüpft, welche dann ihrerseits die Zelle durch ihre dreidimensionale Anordnung stabilisieren (Drenckhahn 2008).

1.3.1 Adhärenskontakte

Die Adhärenskontakte werden basierend auf ihrer Anordnung an der Zellmembran weiter unterteilt in Punctum Adherens, Zonula adherens und Fascia adherens. Die

transmembranären Zell-Adhäsionsproteine der Adhärenskontakte stammen aus der Familie der klassischen Cadherine. Diese haben die Fähigkeit Ca^{2+} -abhängig mit anderen Cadherinen vorwiegend homophile Bindungen, d.h. Bindungen mit Cadherinen gleichen Typs, einzugehen und somit die Zellen fest zu verbinden. Je nach Zelltyp gibt es verschiedene Vertreter der klassischen Cadherine, wie z.B. E-Cadherin in Epithelzellen oder N-Cadherin in Myozyten und Neuronen. Über die zwischengeschalteten Plaqueproteine sind die Cadherine der Adhärenskontakte an Actinfilamente gebunden (Abb. 1).

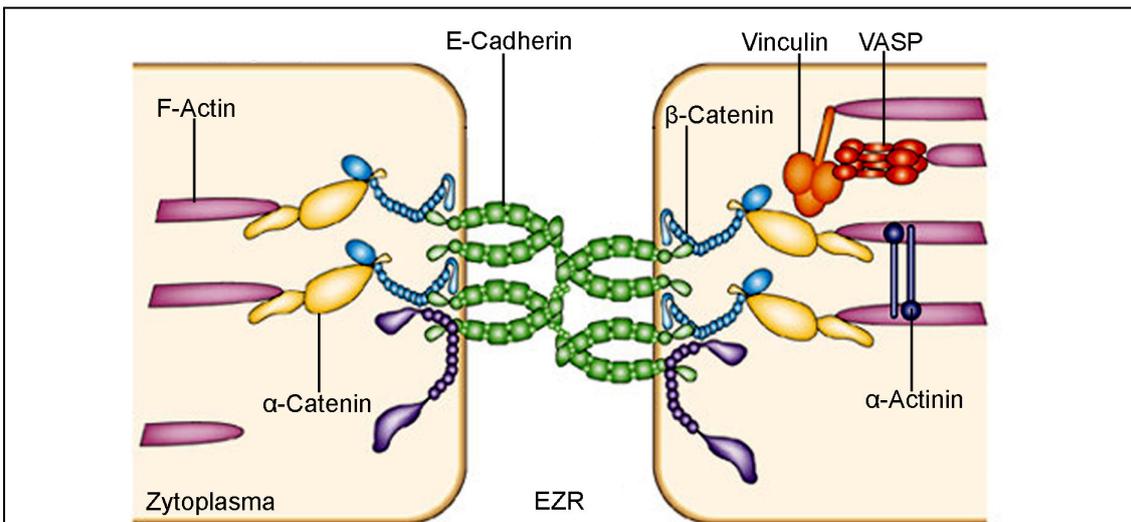


Abb. 1

Struktureller Aufbau der Adhärenskontakte der Epidermis

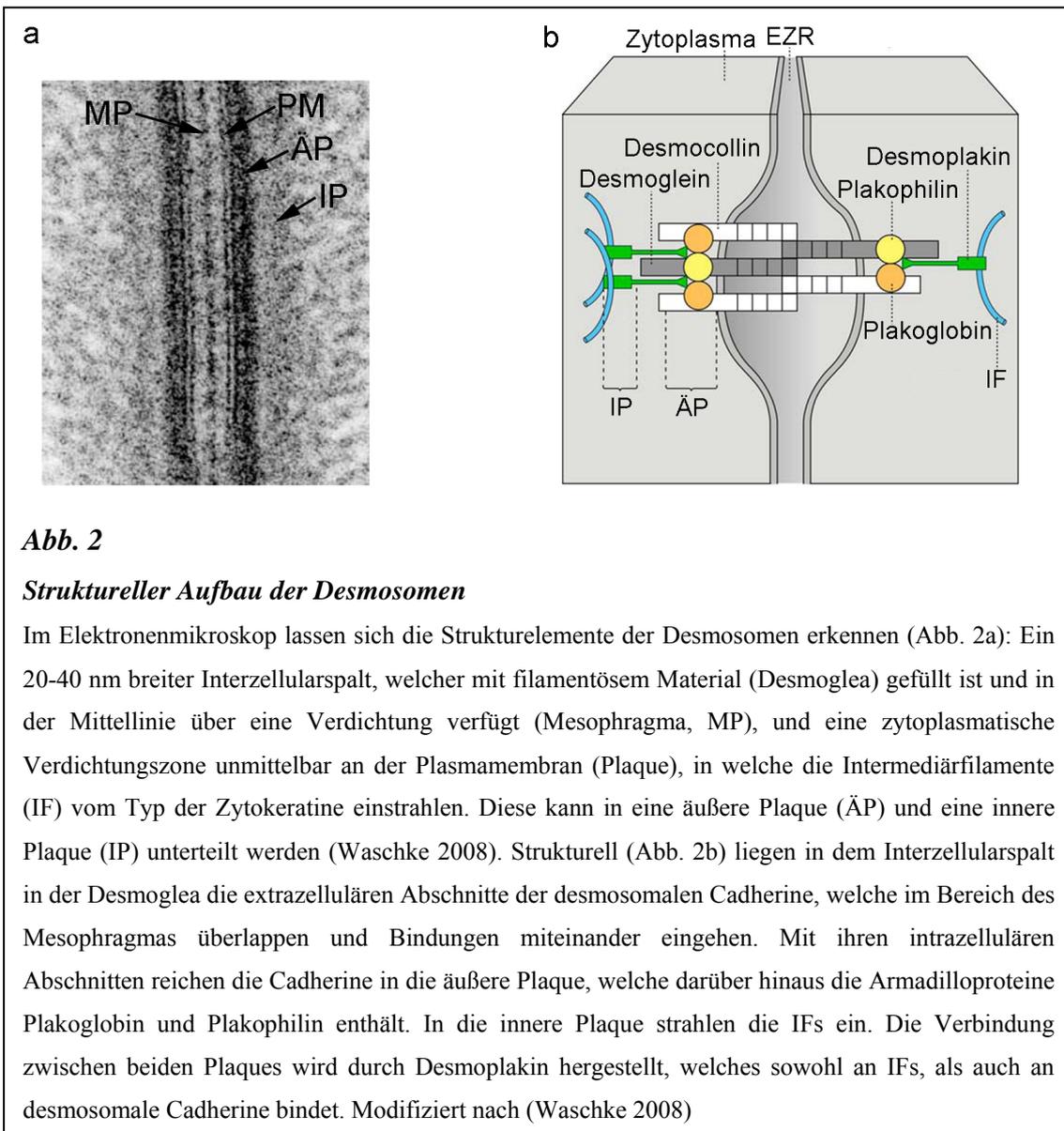
Die Verbindung der Zellen wird über E-Cadherin-Moleküle hergestellt, welche durch die Membran hindurch reichen und im Extrazellulärraum homophile Interaktionen miteinander eingehen. Durch Plaqueproteine werden die intrazellulären Abschnitte der Cadherine mit dem Actin-Zytoskelett verbunden. Dabei bindet β -Catenin direkt an die Cadherine. An dieses wiederum kann α -Catenin binden, um dann entweder direkt oder über zwischengeschaltete Actin-bindende Proteine, wie α -Actinin, Vinculin und VASP, an F-Actin zu binden. Modifiziert nach (Fuchs et al. 2002)

Die Adhärenskontakte sind essentiell für die Ausbildung intrazellulärer Kontakte und ein komplettes Fehlen dieser Strukturen ist mit dem Überleben der Zelle nicht vereinbar (Franke 2009). Es wird angenommen, dass Adhärenskontakte die ersten Interzellularkontakte sind, welche sich bei der Kontaktaufnahme von Zellen ausbilden. Diese führen im Zusammenspiel mit Actinfilamenten die Zellen aktiv aneinander, um dann in der Folge die Bildung weiterer Zellkontakte, wie z.B. den Desmosomen, zu

ermöglichen (McNeill et al. 1993; Yonemura et al. 1995; Angres et al. 1996; Adams et al. 1998; Vasioukhin et al. 2000; Yin et al. 2004).

1.3.2 Desmosomen

Besonders in mechanisch stark beanspruchten Geweben, wie z.B. der Herzmuskulatur oder in mehrschichtigen Epithelien wie der Epidermis, tritt neben die Adhärenskontakte mit den Desmosomen ein weiterer Vertreter der Adhäsionskontakte auf, welcher die mechanische Stabilität der Zell-Zell-Kontakte zusätzlich verstärkt.



Wie die Adhärenskontakte haben auch die Desmosomen einen Aufbau bestehend aus interzellulären Adhäsionsproteinen, Plaqueproteinen und assoziiertem Zytoskelett (Abb. 2).

Dennoch gibt es wesentliche strukturelle Unterschiede im Aufbau der Desmosomen (Abb. 2). Die interzellulären Haftproteine stammen aus der Familie der desmosomalen Cadherine, von denen sowohl die Desmogleine als auch die Desmocolline jeweils mehreren Unterformen (Dsg 1-4, Dsc 1-3) aufweisen. Ähnlich wie die klassischen Cadherine können auch die desmosomalen Cadherine Ca^{2+} -abhängig miteinander interagieren (Garrod 2010). Für die Bindung der Cadherine untereinander ist vor allem ein bestimmter Bereich der extrazellulären Domäne, die sogenannte EC 1 Domäne, von Bedeutung (Shapiro et al. 1995; Runswick et al. 2001; Tsunoda et al. 2003; Heupel et al. 2008). Interessanterweise scheinen die desmosomalen Cadherine sowohl homophile (Amagai et al. 1994; Syed et al. 2002; Waschke et al. 2005; Heupel et al. 2009), als auch heterophile Bindungen mit anderen desmosomalen Cadherinen einzugehen (Kowalczyk et al. 1996; Chitaev et al. 1998; Marcozzi et al. 1998; Syed et al. 2002; Spindler et al. 2009). Durch die Zusammenlagerung der desmosomalen Cadherine im Interzellulärspalt entsteht dort eine dichtere Zone, die so genannte Desmoglea. Nach dem Durchtritt durch die Zellmembran strahlen die Cadherine in die Plaquezone der Desmosomen ein. Dort können sie über spezifische Bindungsstellen mit anderen Plaqueproteinen interagieren. Dabei dient die so genannte juxtamembranäre Ankerzone vorwiegend der Bindung an Desmoplakin (Trojanovsky et al. 1994), wohingegen an der sich anschließenden Cadherin-typischen Sequenz Bindungen mit Plakoglobin und Plakophilin eingegangen werden können (Mathur et al. 1994; Trojanovsky et al. 1994). Die Plaquezone wird in eine Außen- und eine Innenzone unterteilt. Während in der äußeren Zone die intrazellulären Abschnitte der desmosomalen Cadherine und die mit ihnen assoziierten Plaqueproteine Plakoglobin und Plakophilin liegen, befinden sich in der inneren Zone Intermediärfilamente (IF), welche in die Desmosomen einstrahlen. Die Verbindung zwischen beiden Zonen wird durch Desmoplakin hergestellt. Dieses hat Bindungsstellen sowohl für die Plaqueproteine Plakoglobin und Plakophilin als auch für IFs. Durch diese Verbindung zwischen den desmosomalen Cadherinen auf der einen und dem Zytoskelett auf der anderen Seite hat Desmoplakin eine wichtige Rolle für die mechanische Stabilität der Zelle. Die Plaqueproteine der Außenzone Plakoglobin und

die Plakophiline gehören zu der Familie der Armadilloproteine und erfüllen wichtige Aufgaben für die Desmosomen. Plakoglobin hat zum einen wichtige Adapterfunktionen, indem es Bindungen mit Cadherinen auf der einen und Desmoplakin, Plakophilin und IFs auf der anderen Seite eingehen kann. Zum anderen scheint Plakoglobin aber auch eine wichtige Rolle für die Regulation des Zell-Zyklus und somit der Zellproliferation und Differenzierung zu spielen (Zhurinsky et al. 2000; Maeda et al. 2004). Plakophilin hingegen scheint für die Desmosomen-Bildung und die damit verbundene Regulation der Zytoskelett-Dynamik wichtig zu sein (Bass-Zubek et al. 2009), indem es unter anderem durch Regulation der Actin-Dynamik (Bass-Zubek et al. 2008; Bass-Zubek et al. 2009) an der Rekrutierung desmosomaler Proteine an die Zellmembran beteiligt ist (Kowalczyk et al. 1999; Hatzfeld et al. 2000; Wahl 2005). Plakophilin ist in zahlreiche interzelluläre Signalwege, wie z.B. der Rho-GTPasen, eingebunden, welche somit über Plakophilin Einfluss auf die interzelluläre Adhäsion und das Zytoskelett nehmen können (Bass-Zubek et al. 2009).

Interessanterweise zeigen die desmosomalen Proteine, wie z.B. die Desmocadherine in Abhängigkeit vom Gewebetyp unterschiedliche Verteilungsmuster. Während Dsg 2 und Dsc 2 in nahezu allen Geweben, die Desmosomen enthalten, vorkommen, sind Dsg/Dsc 1 und 3 hauptsächlich in mehrschichtigen Epithelien wie z.B. der Epidermis zu finden. Doch auch innerhalb der Epidermis gibt es differente Verteilungsmuster. Das Paar aus Dsg/Dsc 1 ist verstärkt in oberflächlichen Schichten exprimiert, wohingegen Dsg/Dsc 3 in basalen Bereichen dominiert (Garrod et al. 2002). Die genaue funktionelle Bedeutung dieser speziellen Verteilungsmuster ist noch unklar, scheint aber unter anderem in der Morphogenese (Runswick et al. 2001) und der Differenzierung von Zellen (Garrod 1996; Chidgey et al. 1997; Ishii et al. 2001) eine wichtige Rolle zu spielen.

Desmosomen sind entgegen früheren Annahmen hoch dynamisch und unterliegen einem ständigem Auf- und Abbau. Die einzelnen Prozesse sind jedoch noch nicht vollends verstanden. Dennoch ist unstrittig, dass die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration eine wichtige Rolle für die Neubildung von Desmosomen spielt, da sich Desmosomen erst ab einer Konzentration von $> 0,1$ mM bilden können (Hennings et al. 1983; Pasdar et al. 1988; Pasdar et al. 1989; Pasdar et al. 1995). Weiterhin scheinen aber auch, wie oben beschrieben, Adhärenskontakte und das Actinfilament-System für die Bildung von Desmosomen wichtig zu sein, indem sie die Zellmembranen aktiv so nah

zusammenführen, dass sich Desmosomen ausbilden können. Darüber hinaus ist Actin aber auch an der Translokation von Desmoplakin im Komplex mit IFs zur Membran beteiligt (Godsel et al. 2005) und hat somit auch direkten Einfluss auf die Desmosomen-Bildung. Die desmosomalen Cadherine hingegen scheinen in Vesikeln durch Mikrotubulus-abhängigen Transport zur Zellmembran zu gelangen (Pasdar et al. 1988; Green et al. 2007). Die Bedeutung der Assoziation von IFs mit Desmoplakin während der Desmosomen-Bildung hingegen ist unklar. Vermutlich können sich Desmosomen zwar in Abwesenheit funktionstüchtiger IFs bilden (Huen et al. 2002; Green et al. 2007), für die Erlangung der vollständigen Zell-Zell-Adhäsion wird jedoch die Assoziation von IFs und Desmoplakin benötigt (Huen et al. 2002). Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass IFs möglicherweise regulatorisch in den Prozess der Neubildung eingreifen können (Godsel et al. 2005).

Die Dynamik der Desmosomen erfordert eine exakte Regulation. Diese geschieht unter anderem durch die Einbindung der Desmosomen in zahlreiche intrazelluläre Signalwege, wie z.B. Proteinkinase C (PKC) (Sheu et al. 1989; van Hengel et al. 1997; Wallis et al. 2000; Green et al. 2007). Weiterhin scheint durch die enge Assoziation mit zytoskelettalen Komponenten wahrscheinlich, dass auch das Zytoskelett eine wichtige Rolle für die Regulation der Desmosomen spielt. Diese komplexe Regulation macht deutlich, dass Desmosomen Funktionen haben, welche über einfache statische mechanische Aufgaben hinausgehen. So sind Desmosomen vermutlich auch an zentralen zellulären Prozessen, wie etwa der Morphogenese oder der Regulation von Wachstum (Eshkind et al. 2002) und Differenzierung von Zellen (Allen et al. 1996; Chidgey et al. 2001; Elias et al. 2001; Merritt et al. 2002; Hardman et al. 2005; Brennan et al. 2007) beteiligt.

1.4 Zytoskelettsysteme der Zelle

Die Grundsubstanz der Zelle besteht aus dem Zytoplasma, welches durch die Zytoplasmamembran von der Umgebung abgegrenzt wird. Da das Zytoplasma eine visköse Substanz ist, könnte diese Struktur ohne weitere Bestandteile keine definierte Form aufrechterhalten. Aus diesem Grunde verfügen alle Zellen über ein Zytoskelettsystem, welches der Zelle mechanische Stabilität vermitteln kann. Darüber hinaus vermittelt das Zytoskelett aber auch Vorgänge wie Bewegung oder Zellteilung,

die für das Überleben der Zelle essentiell sind. Im Allgemeinen unterscheidet man 3 zytoplasmatische Zytoskelettsysteme, welche ursprünglich unabhängig ihrer Funktionen anhand ihrer Größe in drei verschiedenen Gruppen eingeteilt wurden: 1. Mikrotubuli mit einem Filamentdurchmesser von 25 nm, 2. IFs mit einem Filamentdurchmesser von 8-10 nm und 3. Actinfilamente mit einem Filamentdurchmesser von 7 nm. Doch die Komponenten unterscheiden sich nicht nur in ihrer Größe, sondern auch in ihrem Aufbau und ihren Aufgaben deutlich voneinander (Drenckhahn 2008).

1.4.1 Mikrotubuli

Die Mikrotubuli spielen eine wichtige Rolle in zentralen Abläufen der Zelle. So bilden sie z.B. den Spindelapparat in der M-Phase des Zellzyklus aus, welcher für die Verteilung der Chromosomen während der Zellteilung und somit das Überleben der Zelle essentiell ist. Die Bedeutung der Mikrotubuli für die zelluläre Adhäsion hingegen ist bis heute unklar. Es erscheint gesichert, dass es direkte Verbindungen zwischen den Mikrotubuli und den Adhärenskontakten gibt (Meng et al. 2008). Allerdings wird die Bedeutung der Mikrotubuli für die Integrität bzw. den Auf- und Abbau von Adhärenskontakten kontrovers beurteilt. So gibt es zahlreiche Publikationen, welche sowohl eine positive (Waterman-Storer et al. 2000; Meng et al. 2008), als auch eine negative Beeinflussung (Kee et al. 2001; Ivanov et al. 2006; Lorenowicz et al. 2007) durch die Mikrotubuli sehen. Ähnlich verhält es sich auch mit der Rolle der Mikrotubuli für die Desmosomen. Auf der einen Seite gibt es Befunde, welche den Mikrotubuli keine wesentliche Rolle für die desmosomale Adhäsion zuschreiben (Pasdar et al. 1992), während andere zeigen, dass Mikrotubuli durch den Transport von Dsg und Dsc zur Zellmembran zumindest indirekt an der Bildung von Desmosomen beteiligt sind (Green et al. 2007). Im Bezug auf die Pemphigus vulgaris (PV)-Pathogenese existiert lediglich eine Beschreibung von leichten Veränderungen nach Zugabe von PV-IgG (Kitajima et al. 1986). Da sich auch in unseren Vorversuchen keine wesentlichen Veränderungen der Mikrotubuli durch eine Inkubation mit PV-IgG zeigten, konzentriert sich diese Arbeit im Folgenden auf die beiden anderen Zytoskelettkomponenten

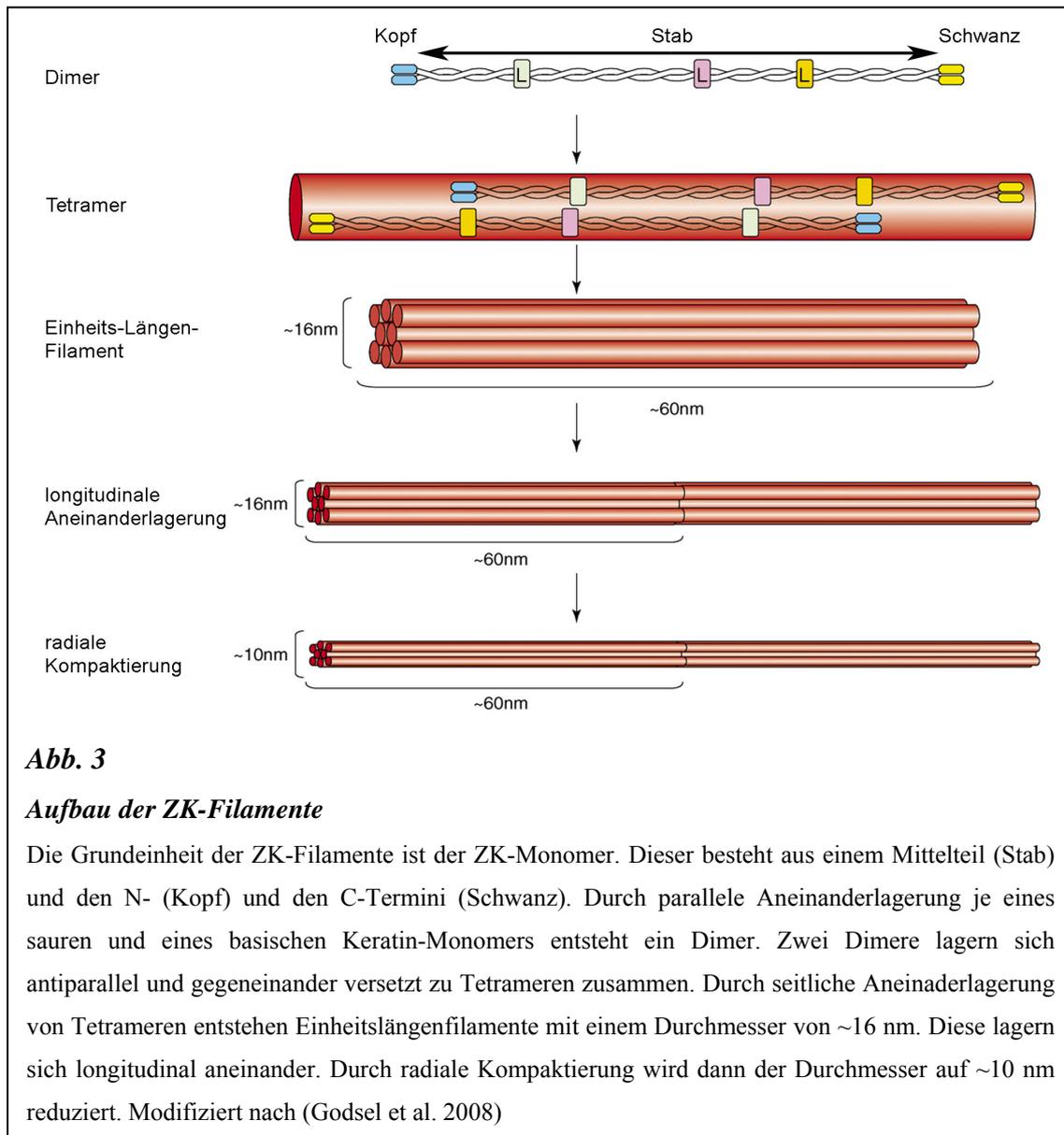
1.4.2 Intermediärfilamente

1.4.2.1 Aufbau

Der Name „Intermediärfilamente“ (IF) hat seinen Ursprung darin, dass sie in Bezug auf ihre Größe mit einem Durchmesser von ca. 10 nm zwischen Mikrotubuli und Actinfilamenten anzusiedeln sind. Doch nicht nur in Bezug auf ihre Größe besitzen IFs einige Eigenschaften, welche sie von den beiden anderen zytoplasmatischen Zytoskelettsystemen unterscheiden. So verfügen sie weder über einen polaren Aufbau, noch über die Fähigkeit Nukleotide zu binden und zu hydrolysieren, wie es für Mikrotubuli und Actin der Fall ist. Darüber hinaus weisen IFs eine große strukturelle Diversität auf. So sind momentan über 70 Gene bekannt (Godsel et al. 2008), welche für Proteine der IFs kodieren. Innerhalb der IFs gibt es 5 Untergruppen. Dabei bilden die Zytokeratine (ZK) mit dem sauren Typ I Keratin und dem basischen Typ II Keratin die ersten beiden Gruppen. Diese sind nahezu exklusiv in Keratinozyten zu finden und sind daher Marker für die Identifikation epithelialer Zellen. Auch für Verteilungsmuster anderer IFs gilt, dass sie spezifisch für bestimmte Zellen sind, so dass diese auch als Visitenkarte der Zelle bezeichnet werden (Oshima 2007). Doch auch innerhalb der Epithelien gibt es weitere Unterschiede der ZK-Muster, welche die Zellen voneinander differenzieren. Ein gutes Beispiel stellt die Verteilung der Zytokeratine der Epidermis dar. Während basale Zellen durch das ZK-Paar 5 und 14 gekennzeichnet sind, vollzieht sich während der Differenzierung ein Wandel hin zu ZK 1 und 10 im Stratum spinosum. Doch trotz der Diversität verfügen alle IFs über eine konservierte Struktur. Der Grundbaustein aller IFs ist das einzelne IF-Molekül. Dieses ist im Gegensatz zu den globulären Actin- und Mikrotubuli-Monomeren ein filamentäres, α -helikal gewundenes Protein. Der Monomer besteht aus zwei Abschnitten: einem α -helikal gewundenen Mittelteil, welcher aus einer hoch konservierten Struktur besteht und den N- und C-Termini, welche im Gegensatz dazu über eine hohe Diversität verfügen und darüber hinaus zahlreichen post-translationalen Veränderungen unterworfen sind. Zwei Monomere lagern sich parallel zu einem Dimer zusammen. Während dies bei den meisten IFs mit einem Molekül gleichen Typs geschieht (Homopolymer), lagern sich im Falle der ZK-Filamente jeweils ein saures Typ I und ein basisches Typ II Keratin zu einem Heteropolymer zusammen. Die einzelnen Dimere sind wiederum um 50%

1. Einleitung

zueinander versetzt zu Tetrameren zusammengelagert. Obgleich der genaue Mechanismus der weiteren Polymerisation unklar ist, scheint es sich um einen Prozess zu handeln, welcher in 3 Schritten abläuft (Abb. 3) (Chang et al. 2004). Zunächst lagern sich Tetramere zu so genannten Einheitslängensfilamenten seitlich aneinander. Diese sind in der Regel 16 nm im Durchmesser und 60 nm lang. Im zweiten Schritt lagern sich diese longitudinal zu mehreren hundert nm langen Filamenten aneinander. Im dritten und letzten Schritt werden diese Filamente dann kompaktiert, um dann letztendlich nur noch einen Durchmesser von 10 nm zu besitzen (Godsel et al. 2008).



Über die genauen Mechanismen der Neubildung und des Umsatzes von ZK-Filamenten herrscht Unklarheit, doch vermutlich kommt den Actinfilamenten eine wichtige Rolle

zu (Green et al. 1987; Weber et al. 2002). Diese scheinen insbesondere an der Neubildung von ZK-Filamenten im Zusammenspiel mit Adhäsionskontakten beteiligt zu sein (Helfand et al. 2004; Windoffer et al. 2006). Doch auch für den Umsatz bestehender ZK-Filamente fand sich eine wichtige Rolle der Actinfilamente, indem sie neue Partikel über Actin-abhängigen Transport zum Ort ihres Einbaus in bestehende Filamente transportieren (Kolsch et al. 2009). Weiterhin hat für die Regulation des ZK-Netzwerkes aber auch, wie unten weiter ausgeführt, die Phosphorylierung der Filamente eine große Bedeutung.

1.4.2.2 Funktion

Die am längsten bekannte und wesentlichste Aufgabe des ZK-Filamentsystems besteht in der mechanischen Stabilisierung der Zelle. Aus diesem Grunde bilden ZK-Filamente ein dichtes Netzwerk, welches die Zelle durchzieht. Die immense Bedeutung der ZK-Filamente für die Stabilität der Zelle wird besonders bei Mutationen, welche zu Defekten in ZKs führen, deutlich (Omary et al. 2004). Ein eindrucksvolles Beispiel hierfür stellt die Hauterkrankung Epidermolysis bullosa simplex dar (Fuchs 1994). Bei dieser Erkrankung kommt es zur Blasenbildung im Bereich der Basalzellen der Epidermis insbesondere in mechanisch stark beanspruchten Körperregionen. Pathogenetisch liegt der Erkrankung eine Mutation der ZK 5 und 14 zu Grunde, was den exklusiven Befall der Basalzellen erklärt, da diese Keratine das wesentliche Keratinpaar der Basalzellen darstellen. Als eine Folge der Mutation akkumulieren die funktionslosen ZKs als Aggregate im Zytoplasma und die Zellen verlieren ihre Resistenz gegenüber mechanischem Stress, so dass bereits geringe mechanische Alterationen zu Zytolyse und Blasenbildung führen können. Weitere Beispiele für die zentrale Rolle der ZK-Filamente für die Stabilität der Zelle stammen aus Experimenten mit transgenen Mäusen mit funktionslosem ZK 14-Protein. In diesen Mäusen war die Vulnerabilität gegen mechanischen Stress und die Blasenbildung erhöht, so dass die Mäuse dem Phänotyp der Epidermolysis bullosa simplex ähnelten (Vassar et al. 1991). Allerdings ist auffällig, dass Mutationen in ZK-Genen im Gegensatz zu Actin oder Mikrotubulus-Genen nicht letal sind. Keratine scheinen also keine essentiellen Funktionen für das Überleben der Zelle zu haben. Eine wichtige mechanischen Funktion der ZK-Filamente stellt deren Befestigung an Desmosomen und

Hemidesmosomen dar, über welche die ZK-Filamente einen wesentlichen Beitrag für die Stabilität der Zell-Zell- bzw. Zell-Substratkontakte leisten. Für die Verbindung der ZK-Filamente zu den Zell-Zell-Kontakten werden spezifische Adapterproteine benötigt. Insbesondere Desmoplakin, welches über seine Bindung zu Plakoglobin und Plakophilin ZK-Filamente an Desmosomen anheftet (Bornslaeger et al. 1996), hat eine wichtige Aufgabe für die mechanische Stabilität der Epidermis (Vasioukhin et al. 2001; Huen et al. 2002). Die Bedeutung der Assoziation von ZK-Filamenten und Desmosomen für die Neubildung und den Erhalt der Desmosomen an der Membran ist hingegen vermutlich gering (Baribault et al. 1991; Bornslaeger et al. 1996; Vasioukhin et al. 2001; Huen et al. 2002). Daneben gibt es weitere Funktionen, welche über mechanische Funktionen hinausgehen. So scheinen ZK-Filamente auch für den Widerstand gegen nicht-mechanischen Stress wichtig zu sein. Dabei spielt die Interaktion mit Stress-Kinasen, wie etwa der p38MAPK, eine wichtige Rolle (Feng et al. 1999; Ku et al. 2002). Diese sind durch spezifische Phosphorylierungen darüber hinaus wesentlich an der Regulation der ZK-Filamente beteiligt (Omary et al. 1998); (Ku et al. 2002; Woll et al. 2007). Dies könnte insbesondere bei komplexen zellulären Abläufen, bei denen eine große Dynamik des Zytoskeletts notwendig ist, von Bedeutung sein. Demnach wurde z.B. für Prozesse der Wundheilung oder der Zellmigration nicht nur eine p38MAPK-Aktivierung gefunden (Klekotka et al. 2001; Sharma et al. 2003; Stoll et al. 2003; Harper et al. 2005), sondern auch Umorganisationen des ZK-Filamentsystems (DePianto et al. 2004; Kim et al. 2006). Dies legt den Schluss nahe, dass hier die p38MAPK-induzierte Umorganisation der ZK-Filamente von Bedeutung sein könnte (Woll et al. 2007). Doch ZK-Filamente sind nicht nur das Ziel intrazellulärer Signalwege, sondern sie wirken auch selbst regulatorisch auf diese ein, indem sie Signalmoleküle binden und damit Einfluss auf deren Verteilung in der Zelle gewinnen (Liao et al. 1996; Ku et al. 1998; Chang et al. 2004; Perlson et al. 2005). Außerdem weisen ZK-Filamente enge Verbindungen zu den beiden anderen Zytoskelettsystemen auf, so dass man heute vermutet, dass ZK-Filamente entscheidend an der Abstimmung der Kommunikation zwischen den einzelnen Zytoskelett-Komponenten beteiligt sind (Chang et al. 2004).

1.4.3 Actinfilamente

1.4.3.1 Aufbau

Die Grundstruktur der Actinfilamente besteht aus dem 43 kDa großen, globulären Actinmolekül, auch G-Actin genannt. Es existieren 6 verschiedene G-Actin Isoformen. Diese werden anhand unterschiedlicher Wanderung in der isoelektrischen Fokussierung in 3 Subgruppen unterteilt α -, β - und γ -Actin. Unterschiedliche Gewebe verfügen über verschiedene Actin-Isoform-Muster. Während die α -Isoformen im Wesentlichen in Muskelzellen vorkommen, sind β - und γ -Actine die Hauptvertreter in den übrigen Körperzellen (Tondeleir et al. 2009).

Die einzelnen G-Actinmoleküle haben die Fähigkeit, sich zu langen doppelsträngigen, α -helikal gewundenen Filamenten zusammenzulagern, dem so genannten filamentösen (F)-Actin (Abb. 4). Die Initiation neuer Filamente, die so genannte Nukleation, ist ein energetisch ungünstiger Vorgang. Aus diesem Grunde bedarf es zusätzlicher Faktoren, welche die Nukleation fördern. Grundsätzlich gibt es 2 unterschiedliche Ausgangspunkte zur Neubildung eines Filamentes. Zum einen können neue Filamente an der Seite bereits bestehender Filamente entstehen. Dieser Vorgang wird im Wesentlichen durch den Arp2/3-Komplex gesteuert (Soderling 2009; Campellone et al. 2010). Zum anderen können Filamente aber auch direkt de novo ohne Kontakt zu bereits bestehenden Filamenten gebildet werden, was durch das Protein Filamin ermöglicht wird. Nach der Nukleation lagern sich die einzelnen Actinmoleküle regelmäßig aneinander. Dies führt dazu, dass innerhalb der Filamente alle Actinmoleküle in eine Richtung orientiert sind, so dass ein polarer Aufbau der Actinfilamente mit einem definierten Plus- und Minus-Ende resultiert. Ähnlich wie Mikrotubuli sind auch Actinfilamente einem ständigem Auf- und Abbau unterworfen. Diese dynamischen Prozesse finden vor allem an den Enden der Filamente statt. Während die Filamente am Plus-Ende schnell wachsen, ist das Minus-Ende langsam wachsend. Dies führt dazu, dass die einzelnen G-Actinmoleküle durch das Filament vom Plus- zum Minus-Ende wandern. Dieser Prozess wird auch Tretmühlenmechanismus genannt. Die einzelnen Actinmoleküle verfügen über eine intrinsische ATPase Funktion und spalten ATP zu ADP + Phosphat. Die aus diesem Prozess resultierende Energie fördert die Polymerisation zu F-Actin.

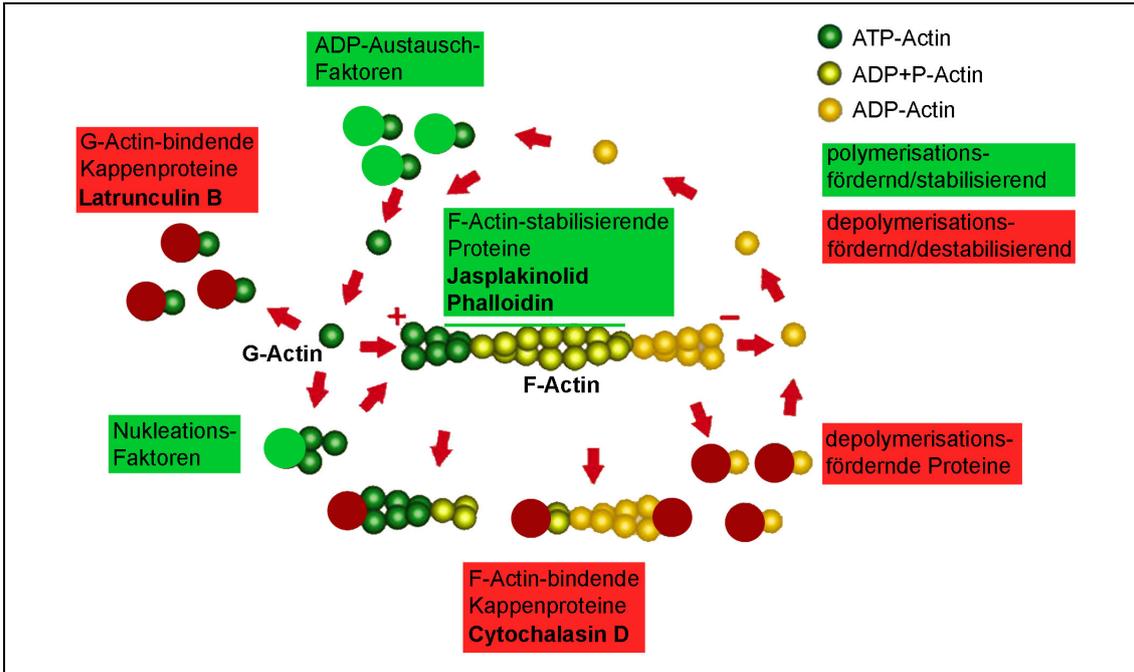


Abb. 4

Struktur und Dynamik des Actinfilamentsystems

Der Grundbaustein des Actinsystems ist das globuläre Actinmolekül (G-Actin). Durch Polymerisation entstehen unter Aufwendung von ATP α -helikal gewundene, doppelsträngige Actinfilamente (F-Actin). Diese verfügen über ein schnell wachsendes Plus- und ein langsam wachsendes Minus-Ende. G- und F-Actin stehen durch Polymerisation und Depolymerisation in einem Gleichgewicht. Dieses Gleichgewicht kann durch pharmakologische Substanzen reguliert werden. Für die negative Regulation gibt es zwei Formen der Beeinflussung. Zum einen gibt es Substanzen, wie Latrunculin B, welche G-Actin binden und dessen Einbau in F-Actin verhindern, und zum anderen gibt es Moleküle, welche an das Plus-Ende von F-Actin binden und dort die weitere Polymerisation verhindern (z.B. Cytochalasin D). Demgegenüber stehen Moleküle, welche positiv auf die Polymerisation einwirken. Beispiele hierfür sind Jasplakinolid und Phalloidin, welche an F-Actin binden und dieses stabilisieren. Daneben gibt es zahlreiche endogene Actin-bindende Proteine, welche die Dynamik der Actinfilamente beeinflussen können. Modifiziert nach (Winder et al. 2005)

Die hohe Dynamik der Actinfilamente erfordert eine präzise Regulation. Dabei nehmen die so genannten Actin-bindenden Proteine (ABP) eine zentrale Rolle ein. Diese lassen sich anhand ihrer Hauptfunktionen in 3 Gruppen einteilen (Winder et al. 2005). Die erste Gruppe enthält diejenigen Actin-bindenden Proteine, welche die Dynamik des F-Actins regulieren. Dazu binden sie sowohl an G- als auch an F-Actin, um dort Einfluss auf das Gleichgewicht von Polymerisation und Depolymerisation zu nehmen (Hitchcock-DeGregori et al. 1988; Carlier et al. 1997; McGough et al. 1997; Chan et al.

2000; Maciver et al. 2002). Darüber hinaus gibt es zahlreiche pharmakologische Substanzen, welche die Dynamik der Actinfilamente ebenfalls beeinflussen können (Abb.6).

Die erste Gruppe, welche zu einer Depolymerisation von Actinfilamenten führt, bedient sich im Wesentlichen zweier Mechanismen. Zum einen gibt es Substanzen, welche an die Plus-Enden von F-Actin binden und dort das Wachstum der Filamente hemmen, wie z.B. Cytochalasin D (Brown et al. 1979; Casella et al. 1981). Zum anderen gibt es aber auch Substanzen, wie Latrunculin, welche mit Actinmonomeren interagieren, deren Einbau in die wachsenden Filamente verhindern und somit zu einer Abnahme der Polymerisation führen (Coue et al. 1987). Demgegenüber stehen Substanzen, welche Actinfilamente stabilisieren und vermutlich auch die Polymerisation von F-Actin fördern können. Die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe sind Phalloidin und Jaspilakinolid (Bubb et al. 1994; Holzinger et al. 1997; Holzinger 2001).

Die zweite Gruppe Actin-bindender Proteine steuert die Anordnung der Actinfilamente zu Strukturen höherer Ordnung. Als ein Beispiel hierfür seien die Actin-quervernetzenden Proteine, wie z.B. Filamin, Transgelin oder Spectrin, genannt, welche ein festes Maschenwerk aus den Filamenten formen. Dies wird z.B. für das kortikale Actinnetz benötigt, welches direkt unterhalb der Plasmamembran liegt und dort zur mechanischen Stabilität der Zelle beiträgt.

Die dritte Gruppe wird von Actin-bindenden Proteinen eingenommen, welche eine wichtige Rolle für die mechanischen Funktionen von Actinen einnehmen. Zunächst sind dies die Myosine, welche die Motorproteine des Actin-Systems darstellen, indem sie unter Spaltung von ATP aktive Bewegungen durchführen können. Dies ist nicht nur für die Kontraktion im Skelettmuskel von Bedeutung, sondern auch für den intrazellulären Transport von Vesikeln oder aber der Verspannung und somit der Stabilität der Zelle. Eine weitere wichtige Untergruppe dient der Befestigung der Actinfilamente an der Zellmembran, wie z.B. Annexine. Weiterhin gibt es Proteine, welche Actinfilamente direkt mit Interzellularkontakten (Vinculin, α -/ β -Catenin, Plakoglobin) oder den Zell-Matrixkontakten (Vinculin, Talin, α -Actinin) verbinden und somit einen wichtigen Beitrag zur Stabilität der Zelle leisten. Als Letztes seien noch diejenigen Proteine erwähnt, welche das Actinfilament-System mit den anderen Zytoskelettkomponenten verbinden. So kann z.B. Plektin ausgehend von F-Actin Verbindungen sowohl zu

Mikrotubuli als auch zu ZK-Filamenten aufbauen. Diese Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Interaktion der einzelnen Zytoskelettkomponenten untereinander.

Die Actin-bindenden Proteine selbst sind über zahlreiche intrazelluläre Signalwege reguliert und fungieren somit als Mediatoren zwischen dem Actin-Zytoskelett und intrazellulären Signalwegen. Wesentliche Vertreter der Actin-regulierenden Signalwege stammen aus der Familie der Rho-GTPasen (Lee et al. 2010; Parsons et al. 2010). Diese setzt sich aus derzeit bis zu 10 Untergruppen zusammen, von denen insbesondere die Rolle von Rho, Rac und Cdc42 im Zusammenhang mit der Regulation des Actin-Zytoskeletts gut charakterisiert ist. Es ist bekannt, dass deren Aktivierung die Bildung von Actin-Stressfasern fördert, die Actin-Polymerisation erhöht und die Ausbildung von Filopodien induziert. Die Rho-GTPasen sind molekulare Schalter, welche durch Bindung von GTP aktiviert werden können. Durch ihre intrinsische Hydrolaseaktivität wird GTP im Verlauf zu GDP + Phosphat gespalten, was im Gegenzug zu einer Rückkehr in den inaktiven Zustand führt. Dieser Prozess ist über weitere Moleküle, wie GDP/ GTP-Austauschfaktoren (GEF) oder GTPase-aktivierende Proteine (GAP) fein reguliert, welche die Aktivierbarkeit im positiven bzw. im negativen Sinne beeinflussen können. Im aktivierten Zustand können Rho-GTPasen nun weitere untergeordnete Effektor-Moleküle beeinflussen, welche ihrerseits dann Einfluss auf das Actin-Zytoskelett haben.

1.4.3.2 Funktion

Das Actin-Zytoskelett hat zahlreiche wichtige Funktionen für die Zelle. Dabei steht die einzigartige Fähigkeit des Actins im Vordergrund, durch Assoziation mit verschiedenen Actin-bindenden Proteinen sowohl statische als auch dynamische Prozesse durchzuführen. Als zwei Extreme am Ende eines Kontinuums sei zum einen die rein statische Aufgabe bei der Stabilisierung von Mikrovilli und zu anderen die hochdynamische Funktion im Zusammenspiel mit Myosin im Skelettmuskel genannt. Durch diese Fähigkeit nimmt Actin eine zentrale Rolle für essentielle Vorgänge in der Zelle, wie mechanische Stabilität, Definierung der Zellform, Zellmigration oder Filopodienbildung, ein. Neuerdings offenbaren sich jedoch auch weitere Funktionen, welche weit über bisher bekanntes hinaus gehen. So scheinen Actine auch wichtige

Funktionen für die Regulation der Transkription (Zheng et al. 2009), Endozytose (Galletta et al. 2009) oder der Apoptose (Franklin-Tong et al. 2008) zu haben.

Für die mechanische Stabilisierung der Zelle spielt das so genannte kortikale Actin-Netz eine wichtige Rolle. Dieses befindet sich direkt unterhalb der Zellmembran und besteht im Wesentlichen aus quervernetzten Actinfilamenten. Durch diese spezielle Anordnung entsteht ein Netzwerk, welches die Zellmembran stabilisiert und somit auch maßgeblich an der Form der Zelle beteiligt ist. Zusätzlich dazu bestehen enge Verbindungen zum Spectrin-/Dystrophin-Membran-Zytosklett, welches die Actinfilamente indirekt mit der Zellmembran verbindet.

Darüber hinaus gibt es aber auch direkte Verbindungen zu Zell-Zell- und Zell-Matrixkontakten. Wie bereits beschrieben sind Actinfilamente, im Gegensatz zu ZK-Filamenten, nicht an Desmosomen oder Hemidesmosomen, sondern an Adhärenskontakten und fokalen Kontakten befestigt. Dazu bedarf es einer Reihe weiterer Proteine, welche diese Verbindung herstellen (siehe oben). Als wesentliche Funktion dieser Verbindung von Actinfilamenten und Zell-Zell-Kontakten wird nach wie vor die mechanische Stabilisierung der Zelle angesehen. Insbesondere durch eine zusätzliche Einlagerung von Myosin in die Filamente wird eine aktive Verspannung der Zelle zwischen den Zell-Kontakten durch das Actin-Zytoskelett ermöglicht. Doch während man die Verbindung zwischen Actin und Zell-Kontakten früher als rein statisch ansah, vollzieht sich in neuerer Zeit ein Wandel, welcher deutlich macht, dass die Verbindung zwischen Zell-Kontakten und Actinfilamenten eine zentrale Rolle in der dynamischen Regulation der Zell-Zell-Adhäsion einnimmt. So ist für die Regulation des Auf- und Abbaus von Adhärenskontakten (Pasdar et al. 1993; Adams et al. 1998; Vasioukhin et al. 2000) und Desmosomen (Pasdar et al. 1993; Vasioukhin et al. 2001; Godsel et al. 2005; Green et al. 2007) eine enge Assoziation mit dem Actin-Zytoskelett bekannt, welche darüber hinaus wesentlich durch Rho-GTPasen beeinflusst wird (Parsons et al. 2010). Daneben haben Actinfilamente auch Einfluss auf die lokale Motilität von membranassoziierten Adhäsionsmolekülen und sind hierüber ebenfalls wesentlich an der Regulation der Zell-Zell-Adhäsion beteiligt (Edidin et al. 1991; Sako et al. 1998).

1.5 Pemphigus

1.5.1 Klinik

Die Hauterkrankung Pemphigus ist eine Autoimmunkrankheit, welche durch Blasen in der Epidermis und Antikörper gegen Oberflächenantigene der Keratinozyten charakterisiert ist (Stanley et al. 2006; Waschke 2008). Anhand unterschiedlicher Klinik, Histologie und Antikörperprofile kann die Erkrankung in 2 Haupttypen unterteilt werden: Pemphigus vulgaris (PV) und Pemphigus foliaceus (PF). Pemphigus ist eine seltene Erkrankung mit einer Inzidenz von 0,75 bis 5 Fällen auf 1 Million (Bystryn et al. 2005; Waschke 2008). Auf PV entfallen dabei 80-90% der Fälle. PV kann in jedem Alter auftreten, findet sich aber gehäuft in der 4. bis 6. Lebensdekade. Besonders Menschen aus dem Mittelmeerraum und Ashkenasi Juden sind betroffen, was seine Begründung unter anderem in bestimmten HLA-Typen findet, welche eine erhöhte Erkrankungswahrscheinlichkeit bedingen (Bystryn et al. 2005)

PF hingegen findet seine größte Verbreitung in Afrika und Südamerika, wo endemische Formen verkommen. Ein gutes Beispiel hierfür stellt die so genannte Fogo selvagem in Brasilien dar (Hans-Filho et al. 1996; Aoki et al. 2004). Für die endemischen Formen ist ein früherer Beginn um das 10. bis 20. Lebensjahr typisch. Neben bestimmten HLA-Typen scheinen bei dieser Form auch Umweltfaktoren, wie z.B. Insekten eine Rolle zu spielen (Aoki et al. 2004; Diaz et al. 2004). Daneben existiert auch eine sporadische Form, welche bevorzugt in den USA und Europa auftritt und erneut eine Korrelation mit bestimmten HLA-Typen aufweist (Bystryn et al. 2005).

Klinisch beginnt PV meist mit zahlreichen schmerzhaften, schlecht heilenden Ulzerationen an Schleimhäuten in Mund, Nase, Larynx oder der Vagina (Abb. 5). Später können sich flüssigkeitsgefüllte Blasen mit dünner, schlaffer Decke, welche sich aus unveränderter Haut erheben, an der gesamten Epidermis ausbilden. Bevorzugt befallen werden jedoch Kopfhaut, Achsel, Stamm und die Leisten. Durch Ruptur der Blasendecke entstehen scharf begrenzte Erosionen, welche nach Krustenbildung narbenlos ausheilen. PF hingegen tritt nicht an Schleimhäuten, sondern nur an der Epidermis auf. Durch die oberflächlichere Lage der epidermalen Spaltbildung sind meist keine Blasen makroskopisch sichtbar und es imponieren meist nur erythematös verkrustete Läsionen.

Bei beiden Formen handelt es sich um potentiell lebensbedrohliche Erkrankungen. Ohne Behandlung kommt es zu progredienter Blasenbildung, welche zusätzlich durch Superinfektionen und Dehydratation letztendlich den Tod des Patienten herbeiführen können.

Die Diagnose basiert auf den drei Säulen Klinik, Histologie und Immunologie (Bystryn et al. 2005; Stanley et al. 2006; Waschke 2008). Klinisch kommt neben dem typischen Erscheinungsbild mit epidermaler Blasenbildung und mukösen Erosionen dem so genannten Nikolsky-Phänomen eine wichtige diagnostische Rolle zu. Darunter versteht man, dass durch mechanische Reizung der Haut eine Blasenbildung induziert werden kann. Das Nikolsky-Phänomen ist typischerweise bei PV und PF positiv.

Histologisch (Abb. 5) und immunologisch zeichnen sich beide Pemphigus-Formen durch den Verlust der Zell-Zell-Adhäsion (Akantholyse), epidermale Spaltbildung und Antikörper gegen Keratinozyten-Oberflächen-Antigene aus (Amagai 1994). Die beiden Hauptantigene sind die humanen Cadherine Desmoglein 1 und 3 (Amagai et al. 1999). Daneben existieren weitere Ziele pathogener Antikörper wie cholinerge Rezeptoren (Vu et al. 1998; Grando 2000), Pemphaxin (Nguyen et al. 2000) oder Mitochondrien (Marchenko et al. 2010).

Spezifische Unterschiede der Antikörperprofile und der epidermalen Spaltbildung ermöglichen eine Differenzierung von PV und PF. Bei PF kommen nur Antikörper gegen Desmoglein 1 vor und die Blasenbildung beschränkt sich auf die oberflächliche Epidermis im Stratum granulosum (Amagai et al. 1999). Bei PV bilden sich im Gegensatz dazu Blasen in der tiefen Epidermis oberhalb der Basalzellschicht aus. PV lässt sich weiter in 2 Subtypen unterteilen: zum einen in den Mukosa-dominierenden Typ mit einem Antikörperprofil, welches hauptsächlich gegen Desmoglein 3 gerichtet ist und nur die Mukosa befällt. Zum anderen in den mukokutanen Typ, welcher Antikörper gegen Desmoglein 1 und 3 aufweist und durch einen zusätzlichen Befall der Kutis gekennzeichnet ist (Ding et al. 1997; Jamora et al. 2003).



Zu Beginn der Therapie ist es das vorrangige Ziel, die Erkrankung möglichst schnell zu kontrollieren. Dazu werden Kortikosteroide systemisch in steigender Konzentration verabreicht, bis es zu einem Stillstand der Erkrankung kommt. Bei Nicht-Ansprechen auf Kortikosteroide kommen als weitere Verfahren Plasmapherese oder Gabe von Immunglobulinen in Frage. Die jeweiligen Medikamente werden bis zur Abheilung der Läsionen kontinuierlich in gleicher Dosis verabreicht. Nach dem Abheilen der letzten Läsionen beginnt die Erhaltungstherapie mit dem Ziel Kortikosteroide einzusparen und gleichzeitig das Auftreten neuer Läsionen konsequent zu verhindern. Dabei spielen insbesondere Immunsuppressiva wie Azathioprin, Methotrexat, Cyclophosphamid oder Cyclosporin eine wichtige Rolle (Bystryn 2002; Harman et al.

2003; Bystryn et al. 2005). Neuere Therapieansätze sind die Anwendung von Rituximab, einem monoklonalen Antikörper gegen CD 20 oder die Immunoablation mit Hochdosis Cyclophosphamid (Bystryn et al. 2005). Trotz dieser neuen Ansätze bleibt die Therapie des Pemphigus unselektiv auf eine allgemeine Immunsuppression beschränkt. So stehen einer guten Krankheitsremission unter Therapie systemische Nebenwirkungen durch die hochdosierte Immunsuppression gegenüber. Demnach muss es das Ziel weiterer Forschung sein, durch tiefere Einblicke in die Pathogenese der Erkrankung spezifischere Therapien zu entwickeln, um die systemischen Nebenwirkungen auf ein Minimum zu reduzieren.

1.5.2 Pathogenese

Zur Erklärung der unterschiedlichen klinischen Phänotypen von PV und PF wurde die Desmoglein-Kompensationstheorie entwickelt (Stanley et al. 2006). Diese basiert zum einen auf den bereits erwähnten spezifischen Antikörperprofilen von PV und PF und zum anderen auf der unterschiedlichen Verteilung von Dsg 3 und 1 in der Epidermis und den Schleimhäuten. So findet sich in der Epidermis Dsg 3 vorwiegend in basalen Schichten, wohingegen Dsg 1 in allen Schichten mit einem nach basal abfallenden Gradienten vorhanden ist. Ein weiterer wichtiger Grundgedanke ist, dass die Antikörper durch die so genannte sterische Inhibition die Funktion ihres jeweiligen Ziel-Antigens blockieren und beide, Dsg3 und Dsg1, jeweils den Ausfall des anderen kompensieren können. Aus der Desmoglein-Kompensationstheorie folgt, dass im Fall von PF Antikörper gegen Dsg 1 zu einem Funktionsverlust von Dsg 1 führen. Da in basalen Schichten dieser Verlust durch Dsg 3 kompensiert werden kann, kommt es zu Blasenbildung in der superfiziellen Epidermis, in der kein Dsg3 vorhanden ist. Bei PV hingegen sind beim Mukosa-dominierenden Typ vorwiegend Antikörper gegen Dsg 3 vorhanden. Der Verlust von Dsg 3 kann in der Epidermis durch Dsg 1 ausgeglichen werden. Da hingegen in den Schleimhäuten Dsg3 das vorherrschende desmosomale Cadherin darstellen soll, kommt es zur Ausbildung von Erosionen. Demgegenüber hat der mukokutane Typ Antikörper gegen Dsg 1 und Dsg 3, so dass es zur Blasenbildung sowohl in der Mukosa als auch in der Epidermis kommt, da nun sowohl Dsg1 als auch Dsg 3 blockiert werden. Die Theorie wird durch Erkenntnisse gestützt, dass insbesondere Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne 1 von Dsg1 und Dsg3,

welche als entscheidend für die Transinteraktion der desmosomalen Cadherine angesehen wird, für die Pemphigus-Pathogenese entscheidend ist (Futei et al. 2000; Sekiguchi et al. 2001; Tsunoda et al. 2003; Heupel et al. 2008; Ishii et al. 2008; Muller et al. 2008). Allerdings ist die Theorie zunehmend in der Kritik (Bystryn et al. 2005; Amagai et al. 2006; Spindler et al. 2007; Waschke 2008). Zum einen, weil sich das Modell vorwiegend auf das Verteilungsmuster von Dsg1 und 3 in der Maus stützt (Mahoney et al. 1999; Wu et al. 2000). Es zeigte sich jedoch, dass sich dies deutlich von demjenigen des Menschen unterscheidet. So findet sich sowohl in der Epidermis als auch in der Mukosa des Menschen im Bereich der Spatlbildung eine breite Überlappung von Dsg1 und Dsg3 (Mahoney et al. 2006; Spindler et al. 2007; Waschke 2008), welche der Desmoglein-Komensationstheorie widerspricht. Zum anderen fand sich, dass weder Antikörper gegen Dsg1, noch gegen Dsg3 zu einer selektiven Inhibition von Dsg1 oder Dsg3 führten, sondern jeweils die Bindung beider reduzierten (Spindler et al. 2007). Weiteren Einblick in die Pemphigus-Pathogenese erbrachten Rasterkraftmikroskopie-Studien, bei denen die Bindung desmosomaler Cadherine in Reaktion auf IgG-Fraktionen von Patienten mit PV oder PF (PV-IgG bzw. PF-IgG) in einer zellfreien Umgebung untersucht werden können. In diesen Experimenten fand sich eine Blockade der Transinteraktion von Dsg3 durch Dsg3-Antikörper (Heupel et al. 2008), wohingegen dies im Falle von Dsg1 durch Dsg1-Antikörper nicht zu beobachten war (Waschke et al. 2005; Heupel et al. 2008). In Versuchen mit der Laserpinzette an lebenden Zellen hingegen konnte auch durch Dsg1-Antikörper eine Reduktion der Dsg1-Haftung erreicht werden (Spindler et al. 2007; Heupel et al. 2008). Dies legt den Schluss nahe, dass insbesondere im Falle von Dsg1 Prozesse eine wichtige Rolle spielen, welche an das Vorhandensein zellulärer Strukturen gebunden sind. Vor allem intrazelluläre Signalwege rücken dabei in den Fokus des Interesses. Als mögliche Vermittler der Signaltransduktion werden insbesondere extra-desmosomale Desmogleine angesehen (Müller et al. 2008). Passend zu diesen Erkenntnissen gibt es eine große Menge intrazellulärer Signalwege, deren Beteiligung an der Pemphigus-Pathogenese gefunden wurde. Zwei wichtige Beispiele, welche auch für die folgende Arbeit von Bedeutung sind, stellen eine p38MAPK-Aktivierung und eine RhoA-Inhibition dar (Waschke 2008).

Eine Aktivierung der p38MAPK in Anwesenheit von PV-IgG konnte durch eine zunehmende Phosphorylierung der p38MAPK und dem nachgeschalteten Hsp27 bzw. 25 nachgewiesen werden. Passend dazu konnte eine Inhibition der p38MAPK die Blasenbildung inklusive der zytoskelettalen Umorganisationen hemmen (Berkowitz et al. 2005; Berkowitz et al. 2006; Berkowitz et al. 2008). Es erscheint also wahrscheinlich, dass die p38MAPK eine wichtige Rolle in der Pemphigus-Pathogenese spielt.

Weitere für die Pemphigus-Pathogenese relevante Signalproteine stellen die Rho-GTPasen dar, die der p38MAPK nachgeschaltet sind. Es wurde gefunden, dass es in Reaktion auf PV-IgG zu einer p38MAPK-abhängigen Inaktivierung von RhoA kommt (Waschke et al. 2006). In Übereinstimmung damit führte eine pharmakologische Inaktivierung der Rho-GTPasen zu einer Akantholyse der Zellen (Spindler et al. 2007). Demgegenüber führte eine Aktivierung der Rho-GTPasen zu einer Hemmung der PV-IgG-vermittelten Effekte.

Weitere Signalwege, denen eine Bedeutung für die Pemphigus-Pathogenese zugemessen wird, sind daneben: Phospholipase C- und Proteinkinase C-Aktivierung (Kitajima et al. 1999; Cirillo et al. 2010), Plakoglobin-abhängige Signalwege (Muller et al. 2000; Caldelari et al. 2001; de Bruin et al. 2007), Src-Kinase-Aktivierung (Chernyavsky et al. 2007), eine Aktivierung des EGF-Rezeptors (Frusic-Zlotkin et al. 2006; Chernyavsky et al. 2007; Heupel et al. 2009) und die Überexpression des Transkriptionsfaktors c-Myc (Williamson et al. 2006) Dennoch sind bis heute die genauen Mechanismen, welche zur Blasenbildung führen, unbekannt.

Neben der oben beschriebenen intraepidermalen Spaltbildung sind die auffälligsten mikroskopischen Kennzeichen von PV die Reduktion von Desmosomen und die Umorganisationen des Zytoskeletts. Bereits in den frühen 60er Jahren wurde in ultrastrukturellen Untersuchungen die so genannte ZK-Retraktion als wichtiges Merkmal von Keratinozyten in Reaktion auf Inkubation mit PV-IgG beschrieben (Wilgram et al. 1961). Der Ausdruck ZK-Retraktion beschreibt das Phänomen, dass sich die ZK-Filamente nach Inkubation mit PV-IgG von der Zellmembran lösen und sich in der Folge im perinukleären Raum ansammeln. Wie bereits oben erwähnt, haben ZK-Filamente eine wichtige Rolle für die Stabilität der Zelle und der Zell-Zell oder Zell-Matrix-Kontakte über ihre Verbindung zu Desmosomen oder Hemidesmosomen.

Daneben wurde auch deutlich, dass ZK-Filamente in enger Interaktion mit zahlreichen intrazellulären Signalwegen stehen. Eine wichtige Rolle für die PV-Pathogenese erscheint insbesondere deswegen möglich, da gezeigt wurde, dass wichtige ZK-regulierende Signalwege, wie z.B. die p38MAPK, auch entscheidend an der PV-Pathogenese beteiligt zu sein scheinen. Entsprechend führte die Inhibition der p38MAPK (Berkowitz et al. 2005; Berkowitz et al. 2006), eine Plakoglobin-Defizienz (Caldelari et al. 2001; de Bruin et al. 2007) und die Aktivierung von Rho-GTPasen (Waschke et al. 2006) neben der Hemmung des PV-IgG-vermittelten Zelladhäsionsverlustes auch zu einer Hemmung der ZK-Retraktion.

Die Veränderungen des Actin-Zytoskeletts im Rahmen der PV-Pathogenese werden unter dem Begriff der Actin-Reorganisation zusammengefasst. Dieser Ausdruck umfasst sichtbare Veränderungen wie den Ersatz von membranärem Actin zu Gunsten eines zytoplasmatischen Netzwerkes oder die vermehrte Ausbildung von Stressfasern. Ähnlich wie ZKs werden auch die Funktionen von Actinfilamenten in erheblichem Ausmaß von Signalwegen reguliert, deren Beteiligung an der Pathogenese des PV nachgewiesen wurde. So war eine Inhibierung der p38MAPK oder eine Aktivierung der Rho-GTPasen auch dazu in der Lage, die Actin-Reorganisation zu hemmen (Berkowitz et al. 2005; Waschke et al. 2006).

1.6 Fragestellung

Zytoskelettale Umorganisationen sind seit längerer Zeit als charakteristische Kennzeichen von Zellen in Reaktion auf PV-IgG bekannt. Dennoch hat bis dato keine eingehende Untersuchung dieser zytoskelettalen Reorganisationsprozesse stattgefunden, um deren Rolle im Rahmen der PV-Pathogenese zu charakterisieren. Dabei stellt sich die Frage, ob diese lediglich sekundäre Phänomene darstellen, welche aus dem Verlust der Zell-Zell-Adhäsion resultieren, oder ob das Zytoskelett selbst eine primäre, aktive Rolle in der PV-Pathogenese innehat. Früher wurde angenommen, dass PV durch den Verlust der Zelladhäsion ausgelöst wird und die zytoskelettalen Veränderungen lediglich die passive Folge des Verlustes der interzellulären Adhäsion sein könnten (Lever et al. 1969). In heutiger Zeit ist jedoch zum einen bekannt, dass interzelluläre Adhäsionsmoleküle und das Zytoskelett hochgradig dynamisch sind und in komplexer Weise miteinander interagieren. Zum anderen stellte sich heraus, dass intrazelluläre

Signalwege eine wesentliche Rolle für die PV-Pathogenese spielen, welche darüber hinaus wesentlich an der Regulation des Zytoskeletts beteiligt sind. Es erscheint somit wahrscheinlich, dass das Zytoskelett eine wichtige Rolle in der PV-Pathogenese spielen könnte. Die „Basal Cell Shrinkage“ Hypothese (Bystryn et al. 2006; Bystryn et al. 2009) sieht die zytoskelettalen Umorganisationen gar als primäres Ereignis an, welches erst in der Folge zum Verlust der Desmosomen und einer Zell-Dissoziation führen soll. Das Ziel dieser Studie ist es, die Rolle des Zytoskeletts für die PV-Pathogenese näher zu untersuchen, um ein besseres Verständnis der pathogenetischen Zusammenhänge bei PV, aber auch der Zell-Zell-Adhäsion im Allgemeinen zu bekommen. Dies könnte zu neuen, spezifischeren Therapiemöglichkeiten des PV und somit zu einer erfolgreicherer Behandlung der Patienten führen. Durch die Beobachtung zytoskelettaler Veränderungen in Reaktion auf PV-Autoantikörper und deren zeitliche Korrelation mit anderen Charakteristika akantholytischer Zellen soll eine genaue zeitliche Einordnung der zytoskelettalen Veränderungen im Rahmen der PV-Pathogenese erfolgen. Zur weiteren Untersuchung werden zwei differente Wege gewählt: Zum einen soll durch spezifische pharmakologische Inhibition oder Stabilisierung zytoskelettaler Komponenten sowie durch Überexpressionsstudien der Einfluss einzelner Zytoskelettkomponenten auf die PV-Pathogenese gezielt untersucht werden. Zum anderen sollen durch die Untersuchung intrazellulärer Signalwege, welche sowohl für die PV-Pathogenese, als auch für die Organisation des Zytoskeletts wichtig sind, weiterführende pathogenetische Zusammenhänge erforscht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Für alle Experimente wurden so genannte HaCaT (human adult low calcium elevated temperature) Keratinozyten verwendet. Dabei handelt es sich um spontan immortalisierte humane Keratinozyten, deren Erstcharakterisierung auf das Jahr 1988 datiert (Boukamp et al. 1988). Die stabile Zelllinie ist vollständig differenzierungsfähig, nicht tumorigen und in vivo nicht invasiv. In der Zellkultur sind die Zellen problemlos kultivierbar und bilden konfluente Zellrasen.

Die Zellen wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM, Sigma Aldrich, München) gehalten. Dies verfügte über eine Konzentration von 1,8 mmol/L Ca^{2+} und 4,5 g/L Glucose. Weiterhin wurden dem Medium zur Kultivierung der Zellen 50 U/ml Penicillin G, 50µg Streptomycin und 10% fetales Kälberserum zugefügt. Das Medium wurde jeweils jeden zweiten Tag gewechselt, um gleichbleibende Kulturbedingungen zu gewährleisten.

Die Zellen wurden in Brutschränken bei angefeuchteter Luft mit einer Temperatur von 37°C und einem CO_2 -Gehalt von 5% bis zum Erreichen der Konfluenz nach 5 bis 7 Tagen gehalten, um dann aufgeteilt bzw. für die Experimente verwandt zu werden. Bis zur Aufteilung wurden die Zellen in T75 Flaschen gehalten. Nach Erreichen der Konfluenz wurde zunächst eine 0,05% EDTA Lösung in PBS für 30min zu den Zellen gegeben, um durch die Chelation von Ca^{2+} die Cadherin-Bindungen zu schwächen und in der Folge die Vereinzelung der Zellen zu erleichtern. Durch Zugabe einer Trypsin-Lösung (0,05% Trypsin, 0,02% EDTA in PBS) für 2min wurde der Zellrasen dann vom Flaschenboden abgelöst. Durch mehrmalige Resuspension mit einer elektrischen Pipette wurden die Zellen nun vereinzelt und die Zellsuspension homogenisiert. Danach folgte die Aufteilung auf neue T75 Flaschen im Verhältnis 1:3 bis 1:6 oder die Aussaat für die jeweiligen Versuche.

2.2 Molekularbiologische Methoden

Für die Überexpressionsstudien und die Live Cell Imaging-Versuche war es notwendig, in lebenden Zellen fluoreszierende Zellstrukturproteine zu exprimieren. Hierzu wurden

Vektoren verwendet, die neben dem entsprechenden Zellstrukturprotein über eine Sequenz verfügten, welche für ein fluoreszierendes Protein kodierte. Durch die so genannte Transformation wurden die Vektoren in Bakterien eingeschleust, um dort eine Vermehrung der eingebrachten DNA zu erreichen. Danach wurde diese aus den Bakterien entfernt, gereinigt und in dem Prozess der Transfektion in die eukaryoten Zielzellen eingebracht. In der Folge konnten die Zellen fluoreszierende Zellstrukturproteine exprimieren, welche dem Nachweis durch die Fluoreszenzmikroskopie zugänglich waren.

2.2.1 Konstrukte

Tab. 1: Verwendete Konstrukte		
Konstrukt	cDNA	Vektor
E-Cadherin-EGFP	Murines E-Cadherin	pEGFP-N1
HK14-EYFP	Humanes Zytokeratin 14	pEYFP-N1
HK5-ECFP	Humanes Zytokeratin 8	pECFP-N1
Actin-RFP	Monomeres RFP	pEGFP-Actin
Plakoglobin-EGFP	Humanes Plakoglobin	pEGFP-N1

Tab. 2: Anregungs- und Emissions-Spektren der verwendeten Proteine:		
Protein	Anregung (max. in nm)	Emission (max. in nm)
ECFP	434	477
EGFP	489	508
EYFP	514	527
RFP / DsRed2	563	582

Tab. 3: Quellen der Konstrukte	
Konstrukt	Quelle
E-Cadherin-EGFP	Y. Hanakawa, Ehime University, Ehime, Japan

HK14-EYFP	R. Leube, RWTH Aachen, Aachen, Deutschland, (Windoffer et al. 2006)
HK5-ECFP	R. Leube, RWTH Aachen, Aachen, Deutschland, (Windoffer et al. 2004)
Actin-RFP	R. Leube, RWTH Aachen, Aachen, Deutschland, (Windoffer et al. 2006)
Plakoglobin-EGFP	S. Troyanovski, Northwestern University, Chicago, USA, (Gloushankova et al. 2003)

2.2.2 Vermehrung und Reinigung der DNA

Nach dem Einschleusen der Plasmide in die kompetenten Bakterien und der Selektion derjenigen Kolonien, welche das Plasmid richtig aufgenommen hatten, wurden die Bakterien mit den eingeschleusten Plasmiden als Glycerolstock bei -80°C gelagert. Zur weiteren Verwendung konnten diese wieder entnommen und kultiviert werden. Dazu wurden sterile Reagenzgläser mit LB-Medium und zusätzlich als Selektionsmarker mit den Antibiotika Kanamycin ($70\ \mu\text{g/ml}$) und Ampicillin ($70\ \mu\text{g/ml}$) befüllt. Mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers wurde das Medium nun beimpft und zur Kultivierung der Bakterien über Nacht bei 37°C inkubiert.

Um die in den Bakterien vermehrte DNA in eukaryotische Zellen einzubringen, musste diese wieder aus den Bakterien freigesetzt und gereinigt werden.

Für diesen Prozess wurde das Wizard Plus SV Miniprep DNA purification System (Promega) verwendet. In einem ersten Schritt erfolgte die Ernte der Bakterienkultur, indem 2 ml des beimpften Mediums in ein 2ml Reaktionsgefäß gefüllt wurden und bei 13000 Umdrehungen für 2min zentrifugiert wurde. In der Folge setzte sich am Boden des Gefäßes ein Pellet ab. Der Überstand wurde verworfen und der Prozess ein weiteres Mal wiederholt. Aus dem entstandenen Pellet, welches die kultivierten Bakterien enthielt, musste nun die DNA der Plasmide freigesetzt werden. Dazu wurde die Technik der alkalischen Lyse verwendet. Dazu gab man zunächst $250\ \mu\text{l}$ Zellresuspensions-Lösung (50mM Tris-HCL (pH 7,5), 10 mM EDTA, $100\ \mu\text{g/ml}$ RNase A) zu dem Pellet und resuspendierte es durch mehrmaliges kräftiges Invertieren. Danach wurde die Zellyse-Lösung (0,2 M NaOH, 1% SDS) hinzugegeben, durch mehrmaliges Invertieren gemischt und danach für 30sek inkubiert, um die Zellen zu lysieren. Dabei ist es

wichtig, dass nur noch vorsichtig invertiert wird, um eine Verunreinigung der DNA zu verhindern. Durch die Lyse wurden neben der DNA auch Proteine, wie Endonukleasen, freigesetzt, welche die DNA schädigen können. Aus diesem Grunde wurde alkalische Protease hinzugegeben, vorsichtig invertiert und für 5min inkubiert, um diese Enzyme zu inaktivieren.

Um die freigesetzte DNA von anderen Resten, wie z.B. RNA, Proteinen und Salzen zu trennen, wurde nun die Neutralisations-Lösung (4,09 M Guanidin-Hydrochlorid, 0,759 M Kaliumacetat, 2,12 M Eisessig) hinzugegeben und gründlich gemischt, so dass es zu einer Ausfällung kam. Durch Zentrifugation bei 13000 Umdrehungen für 10min in einer Tischzentrifuge wurde diese an den Boden der Gefäße pelletiert und verworfen, In der verbliebenen klaren Flüssigkeit ist nun die DNA der Plasmide gelöst. Daneben enthält sie aber nach wie vor andere Substanzen, wie Enzyme, welche der DNA schaden können. Aus diesem Grunde wurde die DNA nun noch mit Hilfe von Silika-Membranen gereinigt. Diese haben die Eigenschaft in Gegenwart chaotroper Salze DNA spezifisch zu binden. Zunächst wurde das zuvor entstandene Lysat in Säulen gegeben, welche am Boden über eine Silikat-Membran verfügten. Diese wiederum wurden in ein Sammelröhrchen gegeben. Durch Zentrifugation bei 13000 Umdrehungen für 1min bildete sich ein Durchlauf im Sammelröhrchen, welcher verworfen wurde, während die DNA an der Silikat-Membran zurückgehalten wurde. Danach wurden 750µl Säulen-Wasch-Lösung (162,8 mM Kaliumacetat, 22,6 mM Tris-HCL (pH 7,5), 0,109 EDTA (pH 8,0)) zugegeben, erneut bei 13000 Umdrehungen für 1min zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Dieser Vorgang wurde mit 250µl Säulen-Wasch-Lösung wiederholt. Dann wurden die Säulen in neue Sammelgefäße überführt. Zur Eluation der an die Silikat-Membran gebundene DNA wurde nukleasefreies Wasser auf die Säulen gegeben, für 2min inkubiert und bei 13000 Umdrehungen für 1min zentrifugiert. Die gelöste DNA wurde dann bis zur Transfektion bei -20°C gelagert.

2.2.3 Transfektion

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von DNA in eukaryotische Zellen. Dabei muss unterschieden werden zwischen der so genannten transienten und der stabilen Transfektion. Unter transienter Transfektion versteht man das Einschleusen des Plasmides in die Zielzelle, wo es abgelesen werden kann und die transgenen Proteine

zur Expression kommen. Dabei handelt es sich um eine schnelle und einfache Methode zum Generieren transgener Zellen. Allerdings hat diese Methode den Nachteil, dass die Transfektion nur von kurzer Dauer ist. Bei der stabilen Transfektion hingegen wird die Fremd-DNA in die DNA der Zielzelle integriert und ist somit dauerhafter Bestandteil der DNA der Zielzelle. Das hat den Vorteil, dass die Fremd-DNA bei der Zellteilung weitergegeben wird, so dass man stabile transgene Zelllinien entwickeln kann. Allerdings reichten für unsere Zwecke transiente Transfektionen aus, so dass die Transfektionen vor den jeweiligen Experimenten erneut vollzogen wurden. Zur Durchführung der Transfektionen wurde Turbofect (Fermentas) verwendet. Dabei handelt es sich um eine Lösung, welche ein kationisches Polymer enthält. Dieses bildet Komplexe mit der zu transfizierenden DNA, welche dann von den Zellen durch Endozytose aufgenommen werden können. In der Zelle kommt es zu einer osmotisch bedingten Schwellung und letztendlich zur Ruptur der Endosomen, so dass die DNA frei im Zytoplasma vorliegt und in den Zellkern wandern kann.

1 Tag vor der Transfektion wurden HaCaT-Zellen im Verhältnis 2:1 auf Petrischalen mit Deckgläschen aufgeteilt. Um die Bindung der kationischen Polymere an die DNA zu ermöglichen, wurden in ein Reaktionsgefäß 385µl DMEM ohne Antibiotikazusatz, 6µl Turbofect und 15µl DNA-Lösung pro Petrischale gegeben und für 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Direkt vor der Transfektion wurde zu den Zellen 2ml DMEM vorgelegt und dann jeweils 400µl des Gemisches aus DNA und Turbofect hinzugegeben. Nach Inkubation der Zellen über Nacht bei 37°C im Brutschrank wurde das Medium gewechselt und die Zellen weiter bis zu den Versuchen kultiviert.

2.3 Aufreinigung der Patienten- und Kontroll-Antikörper

Für alle Experimente außer den Live Cell Imaging-Versuchen wurden Immunglobulin G-Fraktionen von zwei PV-Patienten (PV-IgG) mit je einer mukösen und einer mukokutanen Form des PV verwandt. Alle abgebildeten Versuche repräsentieren die muköse PV-Form mit Ausnahme von Abb. 22, welche die mukokutane PV-Form zeigt. Die Diagnose der Patienten wurde zuvor klinisch, histologisch und serologisch durch Nachweis von zirkulierenden Dsg-Antikörpern mittels ELISA bestätigt (E. Schmidt, Dermatologische Universitätsklinik, Lübeck). Im ELISA war das muköse PV-Serum positiv für Dsg3 (6586 U/ml), während sich beim mukokutanen PV-Serum ein positives

Ergebnis für Dsg3 (1239 U/ml) und Dsg1 (60 U/ml) zeigte. Weiterhin stand Serum einer freiwilligen, gesunden Kontrollperson zur Verfügung. Zur Aufreinigung der IgG-Fractionen wurde die so genannte Protein A-Affinitätschromatographie angewandt. Bei allen Versuchen wurde die Konzentration der PV-IgGs auf 500 µg/ml justiert.

Als weiterer pathogener PV-Antikörper wurde der murine monoklonaler Antikörper AK23 (Biozol) gegen die EC 1-Domäne von Dsg3 in einer Konzentration von 7,5 – 75µg/ml verwandt.

2.4 Antikörper und Testreagenzien

Zur Darstellung von Proteinen in der Immunfluoreszenzmikroskopie und in den Western Blots wurden spezifische Antikörper verwandt. Die Primärantikörper waren jeweils gegen spezifische Epitope des Zielproteins gerichtet, während Sekundärantikörper dazu dienten, die Fc-Teile der Primärantikörper zu detektieren. An die Sekundärantikörper gekoppelte Fluorophore dienten dann der Darstellung der Zielproteine.

2.4.1 Primärantikörper

Antikörper	Typ	Hersteller	Konzentration Immunofluoreszenz	Konzentration Western Blot
a-Dsg3	polyklonal	Santa Cruz Biotechnologies	1:100	1:1000
a-β-Actin	monoklonal	Sigma-Aldrich		1:1000
a-E- Cadherin	monoklonal	BD-Bioscience	1:100	1:1000
a-phospho- p38MAPK	monoklonal	New England Biolabs		1:1000
a- p38MAPK	monoklonal	New England Biolabs		1:1000
a-GAPDH	monoklonal	Sigma-Aldrich		1:5000

2.4.2 Sekundärantikörper

Tab. 5: Sekundärantikörper			
Antikörper	Fluorophor	Hersteller	Konzentration
Ziege-anti-Maus (gam)	Cy2	Dianova	1:600
Ziege-anti-Hase (garb)	Cy3	Dianova	1:600
Ziege-anti-Maus (gam)	pox	Dianova	1:3000
Ziege-anti-Hase (garb)	pox	Dianova	1:3000

2.4.3 Farbstoff-gekoppelte Antikörper

Zur immunozytochemischen Darstellung von ZK-Filamenten wurde ein Antikörper gegen ZK-Filamente verwandt, welcher bereits an einen Fluorophor (FITC) gekoppelt ist, so dass keine zusätzlichen Sekundärantikörper verwandt werden mussten.

Tab. 5: gekoppelte Antikörper			
Antikörper	Gekoppelt an	Hersteller	Konzentration
a-pan-CK	FITC	Sigma-Aldrich	1:200

2.4.4 Weitere Farbstoff-gekoppelte Substanzen

Die Darstellung von Actin wurde durch an Phalloidin gekoppeltes Alexa 488 gewährleistet, welches spezifisch an F-Actin bindet.

Tab. 6: weitere Substanzen			
Substanz	Gekoppelt an	Hersteller	Konzentration
Phalloidin	Alexa 488	Invitrogen	1:120

2.4.5 Testreagenzien

Für die einzelnen Versuche wurden verschiedene Testreagenzien verwandt, welche spezifische Funktionen ausüben. Vor den jeweiligen Versuchen wurden die Substanzen für eine bestimmte Zeit zur Präinkubation zu den Zellen gegeben.

Tab. 7: Testreagenzien				
Name	Hersteller	Funktion	Konzentration	Präinkubation
Anisomycin	Sigma-Aldrich	Aktivierung p38MAPK	60µM	6h
SB202190	Calbiochem	Inhibition p38MAPK	30µM	1h
Cytochalasin D	Sigma-Aldrich	Hemmung Actin- Polymerisation	100nM	3h
Jasplakinolide	Calbiochem	Stabilisierung Actinfilamente	200nM	1h
Latrunculin B	Biomol	Hemmung Actin- Polymerisation	500nM	0,5h
CNF-1	G. Schmidt (Pharmakologie und Toxikologie, Universität Freiburg)	Aktivierung Rho-GTPasen	300ng/ml	0,5h

2.5 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

Das Prinzip der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie beruht darauf, dass Primärantikörper zunächst an spezifische Zielstrukturen, den so genannten Epitopen von Proteinen binden. Zur Detektion dieser Bindung werden Sekundärantikörper verwandt, welche gegen die Fc-Abschnitte der Primärantikörper gerichtet sind. Die Sekundärantikörper ihrerseits sind an Fluorophore gekoppelt. Fluorophore sind Substanzen, welche durch Licht bestimmter Wellenlänge angeregt werden können und in der Folge selbst Licht bestimmter Wellenlänge emittieren. Durch die Detektion des durch die Fluorophore abgegebenen Lichtes können bestimmte Zielproteine spezifisch dargestellt werden.

Tab. 8: Anregungs- und Emissionsmaxima verwendeter Fluorophore			
Name	Abkürzung	Anregung (nm)	Emission (nm)
Fluoreszein Isothiozyanat	FITC	495	519
Alexa Fluor 488	Alexa 488	499	519
Cyanin 2	Cy2	489	506
Cyanin 3	Cy3	550	570

Die HaCaT Zellen wurden im Verhältnis 3:1 auf Deckgläschen mit einem Durchmesser von 12mm aufgeteilt und bis zur Konfluenz gezüchtet (5-7 Tage). In der Folge wurden die Zellen mit PV-IgG und verschiedenen Testreagenzien in Abhängigkeit vom jeweiligen Experiment 1 bis 24h inkubiert. Daraufhin wurden alle Zellen, außer den transfizierten, mit eiskaltem Aceton (-20°C) für 2min fixiert und permeabilisiert. Im Falle der transfizierten Zellen wurden diese anstatt mit Aceton, da dies die Fluorophore zerstören würde, zunächst für 10min mit 2% Formaldehyd fixiert und nach 3-maligem Waschen mit PBS für 5min mit 0,1% Triton-X-100 permeabilisiert. Nach 3-maligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen danach auf Objektträger transferiert. Zum Blocken unspezifischer Antikörperbindungen wurden die Zellen nun mit 1% BSA (Rinderserumalbumin) und 10% NGS (Ziegenserum) in PBS für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernung des BSA/NGS wurden die Antikörper in der jeweiligen Konzentration in PBS auf die Deckgläschen gegeben (20µl) und die Zellen über Nacht mit diesen bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit PBS für jeweils 5min wurden die Sekundäantikörper in der jeweiligen Konzentration in PBS für 2h bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Im Falle des FITC-gekoppelten anti-pan-CK-Antikörpers zur Detektion der ZK-Filamente und dem Alexa 488-gekoppelten Phalloidins zur Darstellung der Actinfilamente wurden diese in der jeweiligen Konzentration direkt nach dem Fixations- und Permeabilisierungsprozess für 2h bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Danach wurden die Zellen erneut 3-malig mit PBS gewaschen, um dann mit der Zellseite nach unten mit NPG (1% n-propyl-Gallat mit 60% Glycerin in PBS) auf einem Objektträger eingedeckt zu werden.

2.6 Proteinextraktion

Zur quantitativen Messung der in der Zelle enthaltenen Proteine müssen diese aus den Zellen extrahiert werden. Dazu wurden die Zellen zunächst in Petrischalen bis zur Konfluenz gehalten und dann für die angegebene Zeiträume mit den verschiedenen Testreagenzien bearbeitet. Nach 3-maligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in Probenpuffer auf Eis gelöst, mit einem Zellschaber von dem Boden der Petrischale abgeschabt und mit einer Pipette in 2µl Röhrchen überführt. Zur vollständigen Lyse der Zellen wurden diese in der Folge mit Ultraschall zerkleinert und bei -20°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

2.7 Proteinkonzentrationsbestimmung

Für die Bestimmung der Proteinmenge durch SDS-PAGE und Western Blotting ist es erforderlich, die Proteinkonzentration in den Proben zu ermitteln, um in der anschließenden SDS-PAGE gleiche Mengen an Protein auftragen zu können.

Da die zu bestimmenden Proteine bereits in Probenpuffer gelöst waren, wurde die Amidoschwarz-Methode angewandt, da diese es erlaubt, auch in einem Detergens gelöste und denaturierte Proteine zu bestimmen. Die Methode basiert darauf, dass der Farbstoff Amidoschwarz 10b unter sauren Bedingungen an die Amidostickstoff-Gruppen der Proteine binden kann. Die Bindung des Farbstoffes kann in der Folge photometrisch bestimmt werden und ist im Vergleich zu Eichkurven ein Maß für die Proteinkonzentration in der Probe.

Zunächst wurde ein Celluloseacetat-Streifen mit einem Bleistift in 1 cm breite Streifen getrennt und zwischen 2 Klammern frei schwebend befestigt. In jedes Kästchen wurden nun je 5µl einer zu bestimmenden Probe oder einer aufsteigenden Proteinkonzentrationsreihe gegeben. Nach dem Trocknen wurden die Streifen für 10min bei Raumtemperatur in die Färbelösung (0,5% Amidoschwarz, 45% Methanol, 10% Essigsäure, 47,5% Aqua dest.) gegeben. Danach wurden die Streifen mit Entfärbelösung (47,5% Methanol, 5% Essigsäure, 47,5% Aqua dest.) 3mal für jeweils 10min gewaschen, bis überschüssige Färbelösung vollständig entfernt worden ist. Nach komplettem Trocknen wurde die Membran in 1 cm breite Streifen entsprechend der Bleistiftmarkierung geschnitten und in jeweils ein 1,5ml Röhrchen überführt. Unter Zugabe von 1 ml Auflöselösung (2% Trichloressigsäure, 16% Ameisensäure, 2%

Essigsäure, 82% Aqua dest.) für 30min bei 50°C wurde nun die Celluloseacetat-Membran aufgelöst und das entstandene Gemisch anschließend homogenisiert. Durch Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 620nm an dem Photometer kann anschließend anhand der Eichkurve gemäß dem Lambert-Beerschen-Gesetz auf die Proteinkonzentration in der Probe geschlossen werden.

2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichtes. Dazu werden die Proteine zunächst mit dem negativen Detergens SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat) behandelt. Dieses bindet an hydrophobe Bereiche des Proteins und bewirkt dadurch zum einen die Entfaltung des Proteins und zum anderen eine Maskierung der proteineigenen Ladung durch die eigene stark negative Ladung. Somit liegen die Proteine nach Behandlung mit SDS in einer linearen und gleichmäßig geladenen Form vor, so dass die Faltung und die Ladung der Proteine keine Rolle mehr für deren Auftrennung spielen und diese lediglich anhand ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden können. Zur Auftrennung selbst bedarf es nun eines Filters und einer Kraft, welche die Proteine durch den Filter befördert. Als Filter fungiert ein Gemisch aus Acrylamid und dem Crosslinker Bisacrylamid, welches zu einer Polyacrylamid-Gelmatrix mit definierter Porengröße polymerisieren kann. Als Kraft wird ein elektrisches Feld angelegt, welches die Proteine durch die Gelmatrix zieht. In Abhängigkeit von ihrer Größe werden die einzelnen Proteine nun mehr oder weniger durch die Gelmatrix zurückgehalten, so dass diejenigen Proteine mit der geringsten Molekülmasse am schnellsten und diejenigen mit der größten Molekülmasse am langsamsten durch das Gel laufen.

Zur Auftrennung der Proteingemische wurden vertikale Elektrophorese-Systeme verwandt (Biorad), bei denen die Gelmatrix zwischen zwei Glasscheiben zu liegen kommt. Zur Sammlung der Proben diente ein weitmaschiges 5% Polyacrylamid-Gel und zur darauf folgenden Trennung ein 10% Polyacrylamidgel. Die Polymerisation der Gele wurde durch APS (Ammoniumpersulfat) initiiert und durch TEMED (Tetramethylethylamin) zusätzlich katalysiert. Nach Auspolymerisation der Gele und Zugabe von Elektrophoresepuffer wurde in jede Tasche die gleiche Menge Protein gelöst in Probenpuffer gegeben. Durch Anlegen einer Spannung von 80V für das

Sammelgel und 120V für das Trenngel wurden die Proteine anhand ihres Molekulargewichtes elektrophoretisch getrennt. Simultan zu den Proteinen lief ein Größenmarker (PPL, prestained protein ladder, Fermentas) zur Größenidentifikation der Proteine mit.

2.9 Western Blot-Analysen

Um die durch die SDS-PAGE nach ihrer Molekulargröße aufgetrennten Proteine immunochemisch darstellen zu können, müssen diese für die Antikörperbindung zugänglich gemacht werden. Dazu macht man sich die Technik des Western Blottings zu Nutze. Dabei werden die Proteine durch elektrische Spannung aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, wo sie für den immunochemischen Nachweis detektierbar sind.

Für den Western Blot wurde eine Transblot-Kammer (Biorad) mit 2 Graphitelektroden wie folgt bestückt. Zunächst wurden 3 Lagen in Transferpuffer (25mM Tris, 192mM Glycin, 20% Methanol) getränkte Filterpapiere aufgelegt. Auf diese wurde eine Nitrozellulosemembran (Hybond-C extra, Amersham) gelegt. Direkt darüber folgte das Gel, bedeckt von erneut 3 in Transferpuffer getränkten Filterpapieren. Zum Transfer der Proteine wurde eine Spannung von 42mA pro zu blottendem Gel für 1,5h angelegt.

2.10 Immunodetektion von Proteinen

Zur Detektion der durch die SDS-PAGE aufgetrennten und durch das Western Blotting auf eine Nitrozellulosemembran übertragenen Proteine wurden Primärantikörper zur Detektion spezifischer Epitope der Proteine und Sekundärantikörper zur Erkennung der Fc-Fragmente der Primärantikörper eingesetzt.

Zum Blocken unspezifischer Antikörperbindungen wurden die Nitrozellulosemembranen zunächst für 1h bei Raumtemperatur in 5% Magermilch in PBS mit 0,1% Tween-20 inkubiert. Danach wurden die Primärantikörper zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit PBS mit 0,1% Tween-20 wurde der Sekundärantikörper für 1h bei Raumtemperatur zugegeben, gefolgt von nochmals 3-maligem Waschen mit PBS mit 0,1% Tween-20.

Zur Detektion des Primärantikörpers durch den Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper wurde die so genannte ECL (enhanced chemilumescence)-Methode

genutzt. Dabei spielt die Meerrettich-Peroxidase, welche an den Sekundärantikörper gebunden ist, eine wichtige Rolle. Dieses Enzym katalysiert die Reaktion von Luminol in Gegenwart von H_2O_2 zu einem Carbonyl, welches seinerseits Licht emittieren kann. Dazu wurden die ECL Lösung I (enthält Luminol) und die ECL Lösung II (enthält H_2O_2) im Verhältnis 1:1 gemischt und darin die Nitrozellulosemembran für 1min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Detektion des emittierten Lichts wurde ein Röntgenfilm zusammen mit der Nitrozellulosemembran in einer Dunkelkammer in eine Röntgenkassette gelegt und je nach Intensität für eine bestimmte Zeit belichtet. Zur Entwicklung wurde der Röntgenfilm für 1min in Entwicklerlösung und zur Fixation nach Waschen mit Aqua dest. für 1min in Fixierlösung gelegt. Nach Trocknung zeigten die belichteten Stellen die jeweiligen spezifisch detektierten Proteine, welche der weiteren Auswertung zugänglich waren.

2.11 Triton-X-100-vermittelte Proteinextraktion

Die Triton-X-100-vermittelte Proteinextraktion ist ein Versuch zur getrennten Analyse von zytoskeletal- und nicht-zytoskeletal-gebundenen Proteinen. Dabei wird Triton-X-100 durch seine Eigenschaft als Detergens dazu verwandt, Proteine aus der Zytoplasmamembran herauszulösen. Durch anschließende Abzentrifugation entsteht im Überstand eine Fraktion aus nicht-zytoskeletal-gebundenen und damit Triton-X-100-löslichen Proteinen, während das Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes die nicht Triton-X-100-löslichen Proteine enthält, welche zytoskeletal-gebundene Proteine repräsentieren. Durch anschließende Western Blot-Analysen können die beiden Fraktionen dann untersucht werden.

Die HaCaT-Zellen wurden bis zu ihrer Konfluenz gezüchtet, dann zunächst mit den verschiedenen Reagenzien und anschließend für 10min auf Eis mit Extraktionspuffer (0,5% Triton-X-100, 50 mM MES, 25 mM EGTA, 5 mM MgCl_2 , pH 6,8) inkubiert. Dann wurden die Zellen vom Untergrund abgekratzt, in Reaktionsgefäße überführt und bei 14000 U/min für 10min bei 4 °C in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der entstandene Überstand, welche die Triton-X-100-lösliche Fraktion enthält, wurde gesammelt und bei -80 °C gelagert. Das verbliebene Pellet mit der Triton-X-100-unlöslichen Fraktion wurde in Lämmli-puffer überführt und ebenfalls bei -80 °C

gelagert. Anschließend wurden für beide Fraktionen Western Blot-Analysen durchgeführt.

2.12 Dispase-basierter Keratinozyten-Dissoziations-Versuch

Der Dispase-basierte Keratinozyten-Dissoziations-Versuch stellt ein Experiment zur Messung der Zell-Zell-Adhäsion dar und kann somit Auskunft über funktionelle Effekte von PV-IgG und verschiedenen Testreagenzien auf die Zell-Zell-Adhäsion liefern.

Zunächst wurden HaCaT-Zellen in 12-Loch Platten ausgesät und bis zu deren Konfluenz gezüchtet. Danach wurden sie mit PV-IgG und den jeweiligen Testreagenzien über einen Zeitraum von 15min bis zu 24h behandelt. Nachdem die Zellen mit PBS gewaschen worden waren, wurden sie für 30min bei 37°C mit 250 µl HBSS, welches Dispase II (2,4 U/ml, Sigma-Aldrich) enthielt, inkubiert. Dispase ist ein Enzym, welches Substanzen der Basalmembran, wie z.B. Kollagen IV, spaltet und somit zu einer Ablösung des Zellrasens von dem Untergrund führt. Die interzellulären Kontakte hingegen bleiben unbeeinträchtigt, so dass die Messung nicht beeinflusst wird. Nach Ablösung des Zellrasens wird die Dispase-enthaltende Lösung vorsichtig entfernt und durch 500µl HBSS ersetzt. Nun wird der Zellverband einem definierten mechanischem Stress ausgesetzt, indem er mit einer 1ml Pipette 5 mal auf- und abpipettiert wurde. Die Anzahl der entstandenen Fragmente wurde in der Folge unter einem Binokular-Mikroskop bei einer 15x Vergrößerung gezählt und ist ein Maß für die Zell-Zell-Adhäsion. Alle Experimente wurden wenigstens 6x durchgeführt und der Mittelwert dieser Versuche ermittelt.

2.13 Bildaufnahme und –bearbeitung

Alle Bilder der Immunofluoreszenz- und der Überexpressions-Versuche wurden an einem LSM 510 (Carl Zeiss) Konfokalmikroskop mit einem 63x NA 1,4 Ölobjektiv (Carl Zeiss) aufgenommen. Für die Aufnahme der Bilder wurde das Programm LSM Image Browser (Carl Zeiss) verwandt. Die Live Cell Imaging-Versuche wurden alle an einem Leica SP5 Mikroskop (Leica) durchgeführt. Zur Aufnahme der Bilder diente die Leica advanced fluorescence Software (Leica). Zur weiteren Prozessierung, Bearbeitung und Zusammenstellung dienten die Programme ImageJ (NHI) und Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems)

Die Auswertung der Western Blots erfolgte mit der Software ImageJ (NIH) durch Grauwertanalyse. Nach Invertierung der Grauwerte und Abzug eines Leerwertes wurden die Intensitäten gemessen und der weiteren Auswertung unterzogen.

2.14 Live Cell Imaging

Live Cell Imaging ist eine Technik bei der man Veränderungen an lebenden Zellen live beobachten kann. Dazu werden lebende Zellen mit dem Mikroskop beobachtet und zu definierten Zeitpunkten Bilder gemacht. Aus der Abfolge der Bilder kann das Verhalten einzelner Zellen über einen bestimmten Zeitraum beobachtet werden. In Kombination mit der Transfektion mit fluoreszierenden Proteinen ist es darüber hinaus möglich, das Verhalten einzelner Zellkomponenten, wie z.B. des Zytoskeletts oder desmosomaler Cadherine, zu verfolgen.

Für die Live Cell Imaging-Versuche wurden HaCaT Zellen auf 24 mm Deckgläschen ausgesät, wie oben beschrieben transfiziert und in der Folge bis zur Konfluenz gezüchtet. Am Versuchstag wurden die Deckgläschen in eine Live Cell Imaging-Kammer überführt und mit Phenolrot-freiem Medium (Invitrogen) bedeckt. Die Temperatur des Mediums wurde durch einen Objektiv-Erhitzer konstant gehalten. Für einige Bedingungen wurde vor Beginn der Versuche PV-IgG zum Medium hinzugegeben. Die Bildaufnahme wurde dann mit einem Intervall von 5min zwischen den einzelnen Bildern für eine Gesamtdauer von 2h an vorher definierten Regionen durchgeführt.

2.15 Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP)

Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP) ist eine Technik, die es ermöglicht, kinetische Parameter von zellulären Bestandteilen unter verschiedenen Bedingungen zu ermitteln (Lippincott-Schwartz et al. 2003). Dabei macht man sich zu Nutze, dass fluoreszierende Proteine durch Laserbestrahlung in hoher Intensität ausgebleicht werden können. Durch Fokussierung des Lasers auf einen bestimmten Bereich kann man in diesem die fluoreszierenden Proteine selektiv ausbleichen. Im Anschluss daran kommt es durch die Dynamik der umgebenden fluoreszierenden Proteine zu einer Wiederherstellung der Fluoreszenz in diesem Bereich. Die Kinetik der Wiederherstellung im Verhältnis zur Zeit kann gemessen werden und ist ein Marker für

die Dynamik des untersuchten Proteins. Je schneller es demnach zu einer Wiederherstellung der Fluoreszenz kommt, desto höher ist gleichzeitig die Dynamik des Proteins.

Für die FRAP-Experimente wurden HaCaT-Zellen wie oben beschrieben mit Actin-RFP und HK14-YFP exprimierenden Konstrukten transfiziert. Am Tage der Experimente wurden die Zellen in eine live cell imaging Kammer überführt und mit Phenolrot-freiem Medium (Invitrogen) bedeckt. Für PV-IgG-Bedingungen wurden die Zellen zusätzlich für 2h mit PV-IgG inkubiert. Zur Durchführung der Versuche wurden an einem Leica SP5 Mikroskop Bereiche für die Messung definiert, welche die entsprechenden zytoskelettalen Komponenten enthielten. Durch Beleuchtung mit maximaler Laserkraft wurden diese Bereiche nun ausgebleicht. Die darauf folgende Wiederherstellung der Immunfluoreszenz wurde mit Hilfe des Leica advanced fluorescent software suite Programmes gemessen, quantifiziert und durch Bilder dokumentiert.

2.16 Statistik

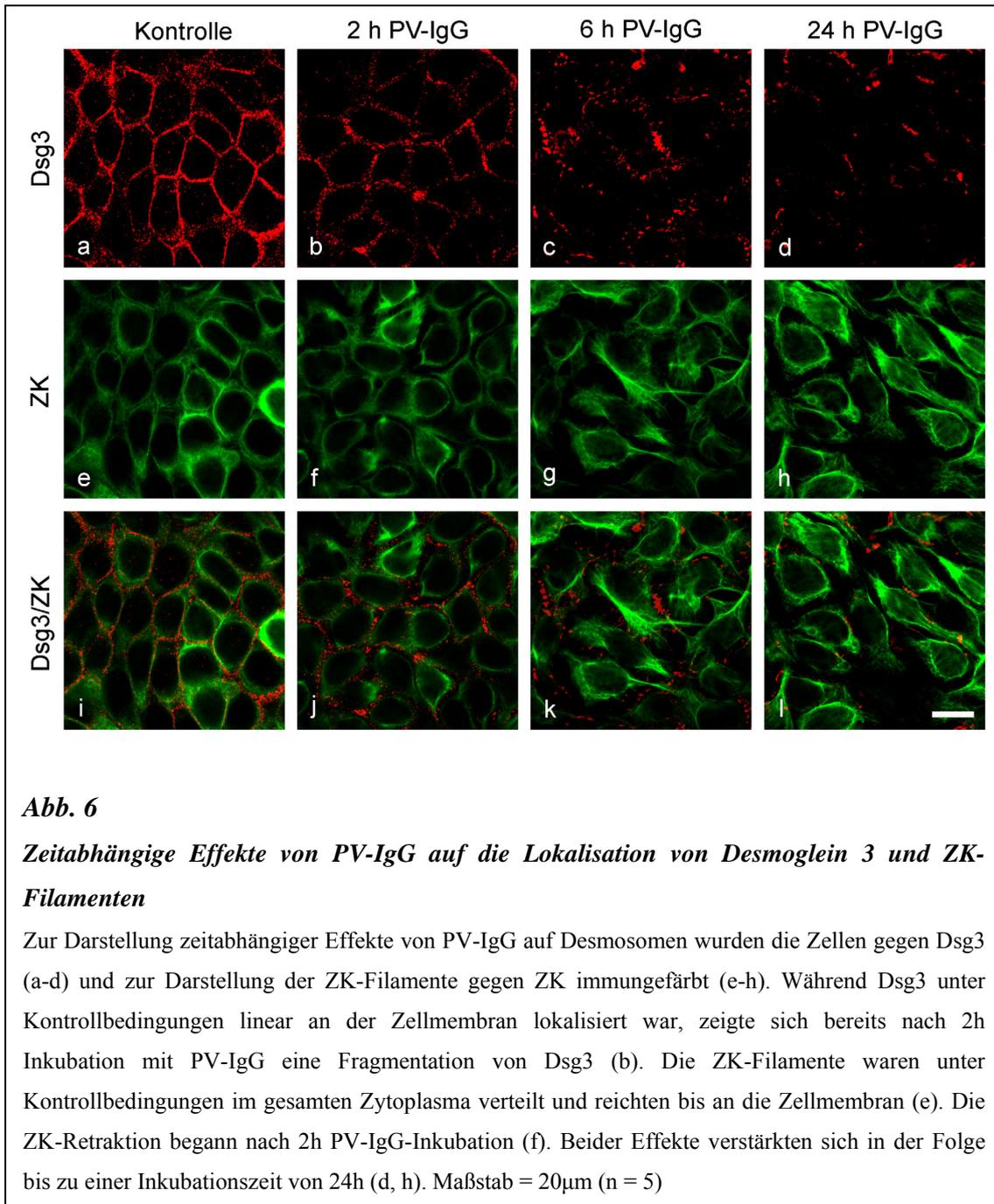
Nachdem bestätigt worden war, dass die Verteilung der Daten einer Gaus'schen Verteilung entsprachen, wurden die Differenzen mit Hilfe des zweiseitigen Student's t-Test ermittelt. Alle Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. Statistische Signifikanz wurde angenommen ab $p < 0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 Zeitabhängigkeit der Effekte von PV-IgG auf humane Keratinozyten

3.1.1 Effekte auf das Zytoskelett

Ein wesentliches Merkmal akantholytischer Zellen stellen Prozesse der zytoskelettalen Reorganisation dar. Aus diesem Grunde wurden in ersten Experimenten die Zeitabhängigkeit der Reorganisation von ZK-Filamenten und Actinfilamenten als Antwort auf eine Inkubation mit PV-IgG untersucht. Diese Veränderungen wurden mit anderen Kennzeichen akantholytischer Zellen wie der Rarifizierung von Desmosomen und dem Verlust der Zell-Zell-Adhäsion korreliert, um einen detaillierten Überblick über die zeitliche Sequenz diese Prozesse im Rahmen der PV-Pathogenese zu erhalten. Zur Darstellung der Effekte einer PV-IgG-Inkubation auf die Desmosomen wurden HaCaT-Zellen gegen Dsg3 immungefärbt (Abb. 6). Unter Kontrollbedingungen (Abb. 6a) und nach Inkubation mit Kontroll-IgG (nicht gezeigt) war Dsg3 weitgehend linear an der Zellmembran lokalisiert. Bereits nach einer Inkubation mit PV-IgG für 2h begann die Fragmentation der Dsg3-Färbung, welche in einer verminderten Dichte des Immunsignals ihren Ausdruck fand (Abb. 6b). Nach 6h Inkubation war die Fragmentation von Dsg3 zusätzlich weiter verstärkt (Abb. 6c). Dies mündete schließlich nach 24h Inkubation in nur noch einigen punktförmigen Dsg3-Aggregaten, welche an der Membran verblieben (Abb. 6d). Diese Veränderungen korrelierten mit Effekten auf die ZK-Filamente. Diese wiesen in den Kontrollen ein Verteilungsmuster auf, welches sich durch das gesamte Zytoplasma und bis zur Zellmembran erstreckte (Abb. 6e). Die PV-IgG-induzierte ZK-Retraktion wurde nach 2h Inkubation mit PV-IgG sichtbar, indem sich die Filamente zunehmend von der Zellmembran entfernten und sich in der perinukleären Region ansammelten (Abb. 6f). Ähnlich wie für Dsg3 beschrieben, nahmen diese Effekte nach 6h und 24h an Intensität weiter zu, so dass die Filamente am Ende maximal von der Zellmembran retrahiert waren (Abb. 6g, h).

**Abb. 6*****Zeitabhängige Effekte von PV-IgG auf die Lokalisation von Desmoglein 3 und ZK-Filamenten***

Zur Darstellung zeitabhängiger Effekte von PV-IgG auf Desmosomen wurden die Zellen gegen Dsg3 (a-d) und zur Darstellung der ZK-Filamente gegen ZK immungefärbt (e-h). Während Dsg3 unter Kontrollbedingungen linear an der Zellmembran lokalisiert war, zeigte sich bereits nach 2h Inkubation mit PV-IgG eine Fragmentation von Dsg3 (b). Die ZK-Filamente waren unter Kontrollbedingungen im gesamten Zytoplasma verteilt und reichten bis an die Zellmembran (e). Die ZK-Retraktion begann nach 2h PV-IgG-Inkubation (f). Beider Effekte verstärkten sich in der Folge bis zu einer Inkubationszeit von 24h (d, h). Maßstab = 20µm (n = 5)

Um eine höhere zeitliche Auflösung zu erhalten und den Beginn der ZK-Retraktion mit dem Beginn der Dsg3-Reorganisation zu korrelieren, führten wir Live Cell Imaging-Versuche durch. Zur Darstellung der Proteine in lebenden Zellen war es notwendig diese mit DNA-Konstrukten, welche für fluoreszierende Proteine kodieren, zu transfizieren. Zur Darstellung der ZK-Filamente diente ein HK5-CFP-Konstrukt (humanes Zytokeratin 5 gekoppelt an cyan-fluoreszierendes Protein). Da eine Dsg3-Überexpression die PV-IgG-Effekte hemmt (Jennings et al. 2011), wurde Plakoglobin

(PG)-GFP (Plakoglobin gekoppelt an grün-fluoreszierendes Protein) zur Darstellung der Dsg3-Reorganisation in Antwort auf PV-IgG verwendet. Frühere Experimente konnten zeigen, dass Plakoglobin nach Inkubation mit PV-IgG zusammen mit Dsg3 in die Zelle aufgenommen wird (Calkins et al. 2006). Um zu zeigen, ob eine Überexpression von PG die Effekte von PV-IgG beeinflusst, transfizierten wir zunächst Zellen mit PG-GFP und beobachteten deren Verhalten nach Zugabe von PV-IgG.

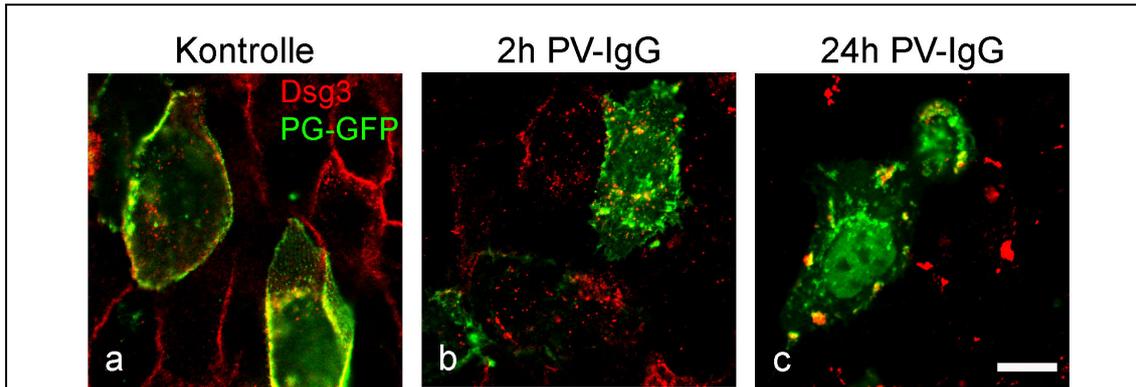


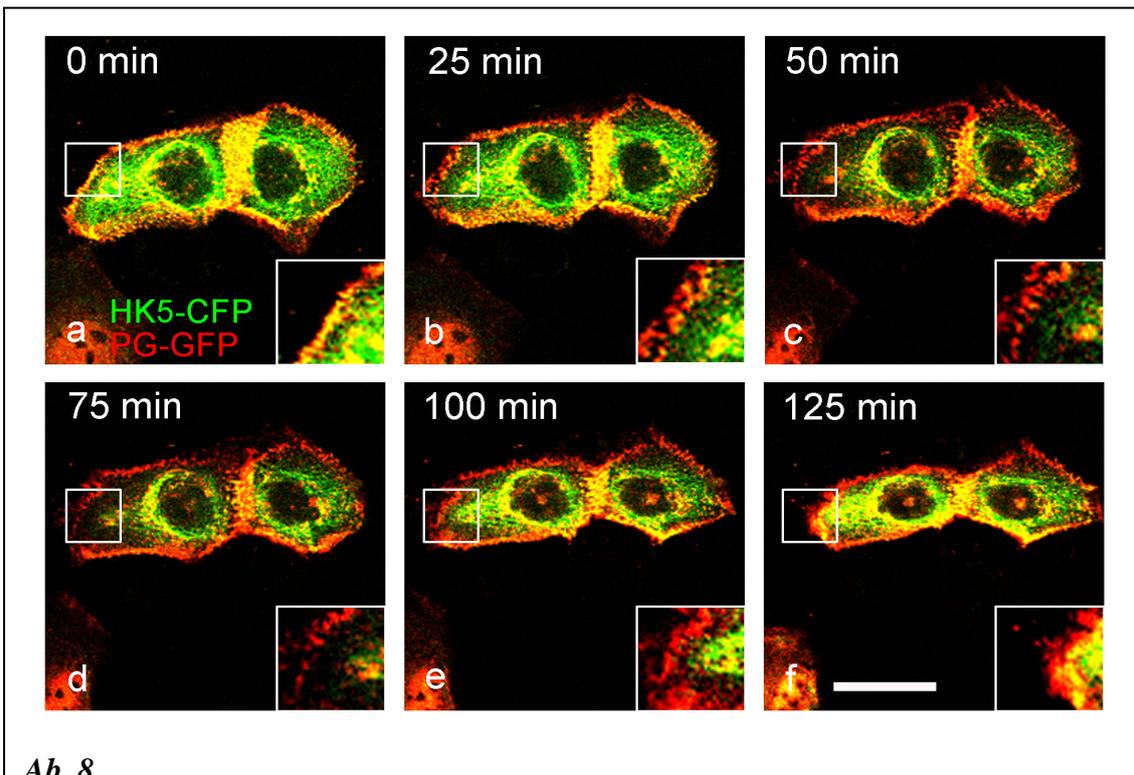
Abb. 7

Auswirkungen einer Überexpression von Plakoglobin auf die PV-IgG-induzierten Effekte

Die Zellen wurden mit einem PG (Plakoglobin)-GFP Konstrukt transfiziert und gegen Dsg3 immungefärbt. Unter Kontrollbedingungen war PG-GFP an der Zellmembran sichtbar und kolokalisierte mit Dsg3 (a). Nach 2h (b) und stärker nach 24h (c) PV-IgG-Inkubation war das PG-GFP-Signal zunehmend fragmentiert und im Zytoplasma lokalisiert. Maßstab = 20 µm (n = 5)

In Abwesenheit von PV-IgG war PG-GFP linear an der Zellmembran lokalisiert und überlappte weitgehend mit der Dsg3-Färbung (Abb. 7a), wohingegen eine Inkubation mit PV-IgG für 2h und deutlicher ausgeprägt nach 24h zu einer Fragmentation des Fluoreszenzsignals entlang der Zellgrenzen und zu einer Anhäufung von PG-GFP im Zellinneren führte, was auf eine Internalisation von PG-GFP schließen ließ (Abb. 7b, c). Daneben war die Dsg3-Färbung sowohl in den nicht-transfizierten als auch in den transfizierten Zellen in gleichem Maße fragmentiert und internalisiert. Dies zeigte, dass eine PG-GFP-Überexpression zum einen keine protektiven Effekte auf die PV-IgG-induzierte Dsg3-Reorganisation hat und zum anderen als Maßstab der Desmosomen-Reorganisation dienen kann. In weiteren Experimenten transfizierten wir Zellen mit PG-GFP und HK5-CFP und beobachteten deren Antwort auf PV-IgG in Live Cell Imaging-Versuchen. Vor der Zugabe von PV-IgG war PG-GFP linear an der Zellmembran verteilt, während HK5-CFP ein zytoplasmatisches Verteilungsmuster zeigte, das mit der

Anordnung in nicht-transfizierten Zellen vergleichbar war (Abb. 8a, vergleiche Abb. 6e). Bereits nach einer PV-IgG-Inkubation von 25min wurde eine Fragmentation und Internalisation von PG-GFP sichtbar (Abb. 8b). Dies führte nach 50min zu einer Akkumulation von PG-GFP im Zytoplasma (Abb. 8c). Die ZK-Retraktion begann ebenfalls 25min nach Zugabe von PV-IgG (Abb. 8b) und hatte ihr Maximum nach 75min mit einer deutlichen Entfernung der Filamente von der Zellmembran zu Gunsten einer Ansammlung in perinukleären Bereichen (Abb. 8c). Im Zeitraum von 75min bis 125min kam es zu einer zunehmenden Verkleinerung der Zellen (Abb. 8d-f).



Ab. 8

Zeitliche Korrelation zwischen der PV-IgG-induzierten Fragmentation der Desmosomen und der ZK-Retraktion

In Live Cell Imaging-Experimenten war PG-GFP unter Kontrollbedingungen linear an der Membran lokalisiert und das im Zytoplasma verteilte HK5-CFP reichte bis an die Zellmembran (a). Nach 25min PV-IgG-Inkubation begann sowohl eine PG-Fragmentation als auch die ZK-Retraktion (b). Dies führte nach 50min zu einer Internalisation von PG-GFP (c) und einer vollständig ausgeprägten ZK-Retraktion nach 75min (d). Darauf folgte eine Verkleinerung der Zellen nach 100min und 125min (e, f). Die Ausschnitte zeigen eine 2fache Vergrößerung repräsentativer Bereiche. Maßstab = 20 μ m (n = 3)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Live Cell Imaging-Experimente eine enge zeitliche Korrelation von ZK-Retraktion und PG-GFP-Internalisation und somit auch der Fragmentation der Desmosomen nahelegen.

Neben der ZK-Retraktion wurde auch eine Actin-Reorganisation als wichtiges Merkmal akatholytischer Zellen beschrieben (Berkowitz et al. 2005; Waschke et al. 2005). Daher wurde auch das Verhalten der Actinfilamente in Reaktion auf PV-IgG untersucht und mit Veränderungen der Desmosomen korreliert. Um eine höhere zeitliche Auflösung zu erhalten, wurden zusätzlich Immunofluoreszenzen zu früheren Zeitpunkten angefertigt (Abb. 9).

Unter Kontrollbedingungen formten die Actinfilamente einen kortikalen Actin-Ring (Abb. 9a). Dieser kolokalisierte mit der Färbung gegen Dsg3, welche linear an der Membran sichtbar war (Abb. 9b, c). Die Fragmentation der Dsg3-Färbung begann bereits 15min nach Zugabe von PV-IgG mit einer Verbreiterung und Auflockerung des Immunofluoreszenzmusters (Abb. 9d) und wurde nach einer Inkubation von 2h noch deutlicher sichtbar (Abb. 9m). Parallel dazu begann auch die Actin-Reorganisation 15min nach Zugabe von PV-IgG mit einer leichten Verbreiterung des kortikalen Actin-Ringes sichtbar zu werden (Abb. 9e). Nach einer Inkubation mit PV-IgG für 2h war die Actin-Reorganisation ebenfalls deutlich ausgeprägt und zeigte sich in einer Reduktion des kortikalen Actin-Ringes und einem in der Folge verstärkten zytoplasmatischen Verteilungsmuster (Abb. 9m). Auch hier konnte wieder eine kontinuierliche Zunahme der Effekte nach 6h und 24h beobachtet werden, so dass am Ende der Messungen die Actinfilamente komplett von der Membran entfernt waren und die Dsg3-Färbung zunehmend stärker fragmentiert wurde (Abb. 9p–u).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass neben der Dsg3-Reorganisation eine ZK-Retraktion und Actin-Reorganisation als Antwort auf eine Inkubation mit PV-IgG beobachtet werden konnte. Die Effekte auf das Zytoskelett entwickelten sich in einem ähnlichen Zeitraum wie die Dsg3-Reorganisation und zeigten in der Folge eine kontinuierliche Verstärkung.

3. Ergebnisse

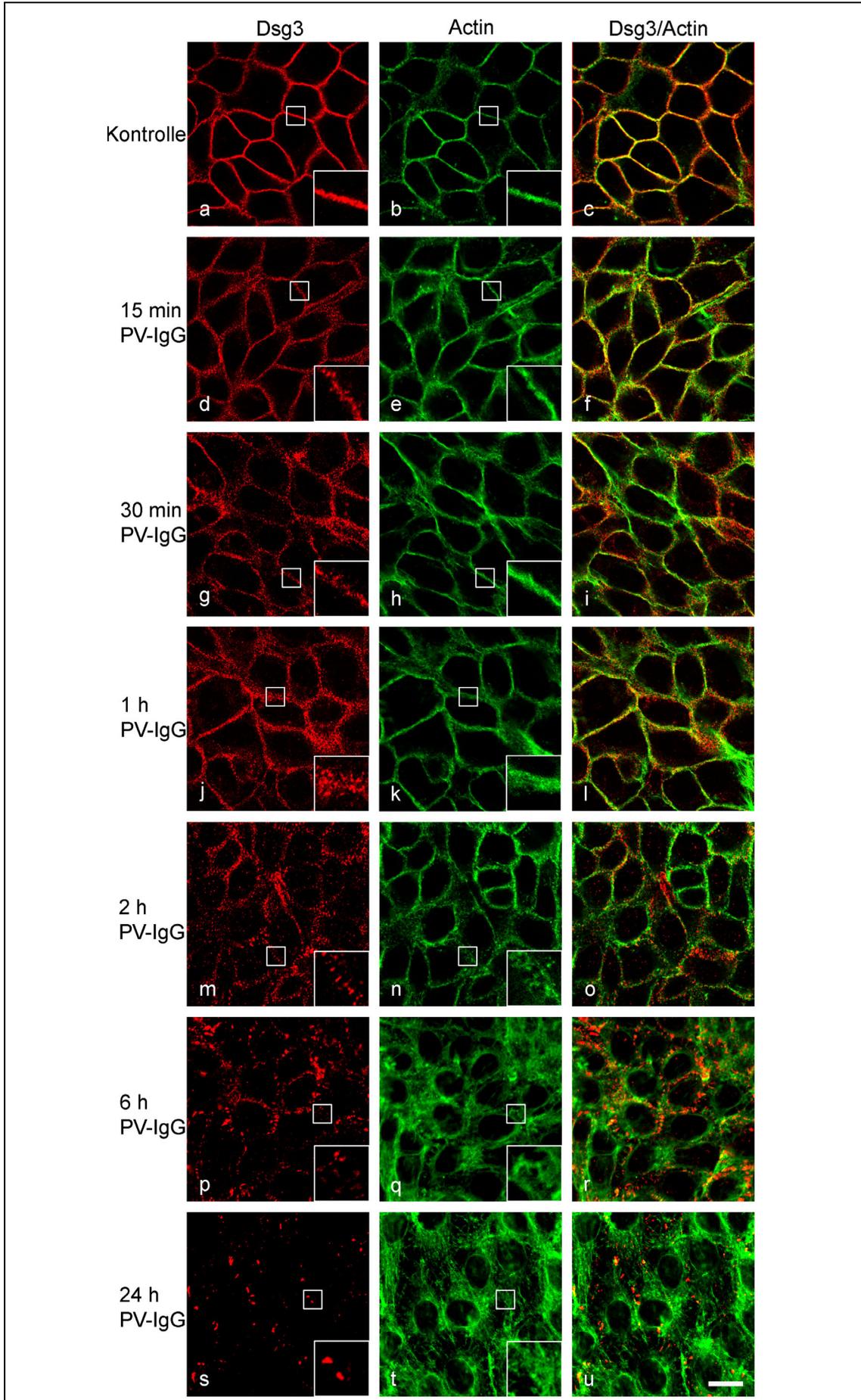


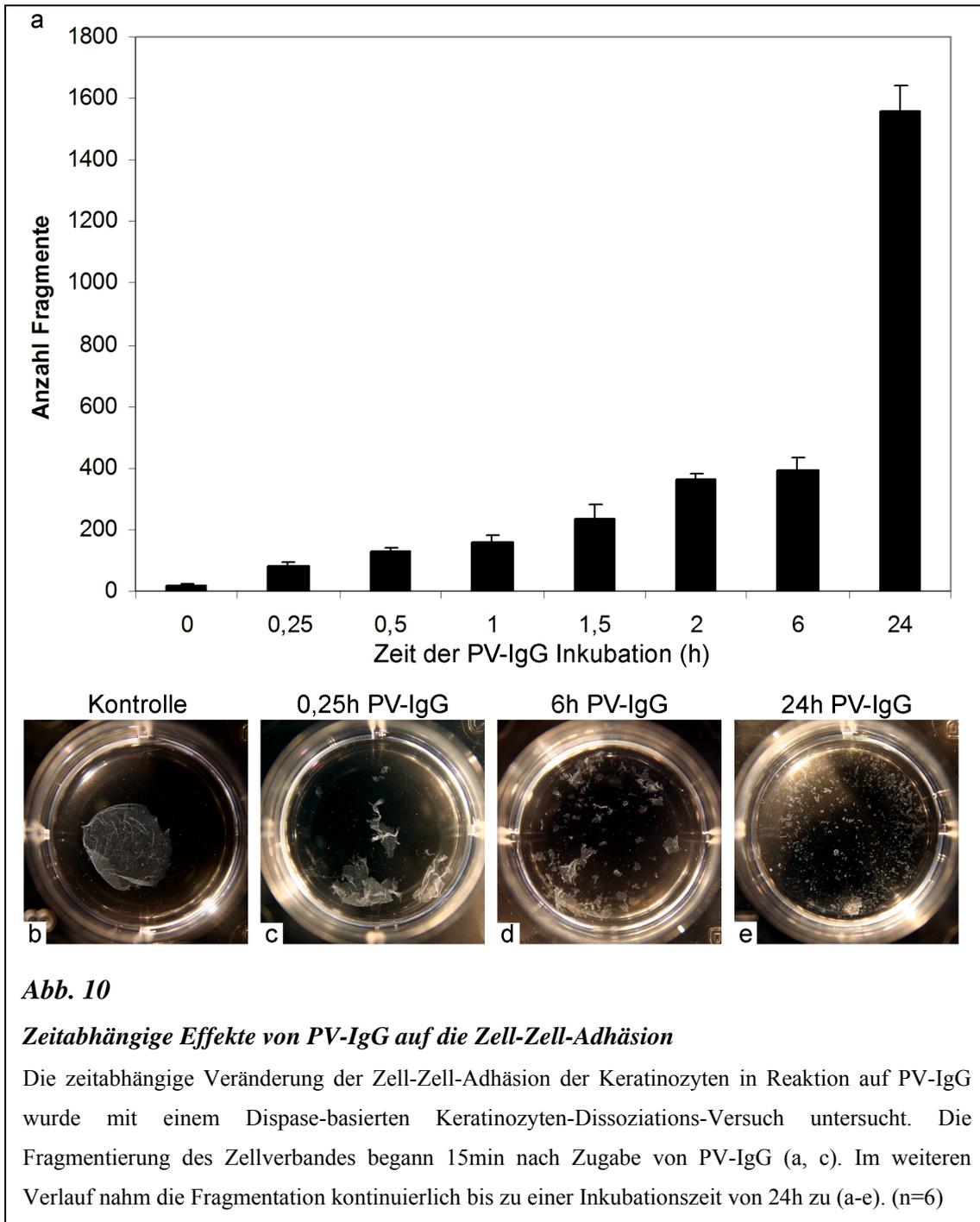
Abb. 9***Zeitabhängige Effekte von PV-IgG auf Dsg3 und Actinfilamente***

Die Zellen wurden gegen Dsg3 immungefärbt. Für die Darstellung der Actinfilamente wurde Alexa488-Phalloidin verwendet. Die Ausschnitte zeigen eine 3fache Vergrößerung repräsentativer Bereiche. In Abwesenheit von PV-IgG war Dsg3 linear an der Zellmembran angeordnet (a). Nach 15min PV-IgG-Inkubation begann die Dsg3-Reorganisation (d). Diese verstärkte sich im weiteren Verlauf bis zu einer Inkubationszeit von 24h (s). Unter Kontrollbedingungen waren die Actinfilamente vorwiegend entlang der Zytoplasmamembran lokalisiert (b). Nach 15min PV-IgG Inkubation begann die Actin-Reorganisation (e) und wurde nach 2h in Form einer Reduktion des peripheren Actin-Ringes und einer verstärkten zytoplasmatischen Verteilung der Filamente deutlich sichtbar (n). Nach 6h und 24h war dies deutlicher ausgeprägt (q, t). Maßstab = 20 μm (n = 5)

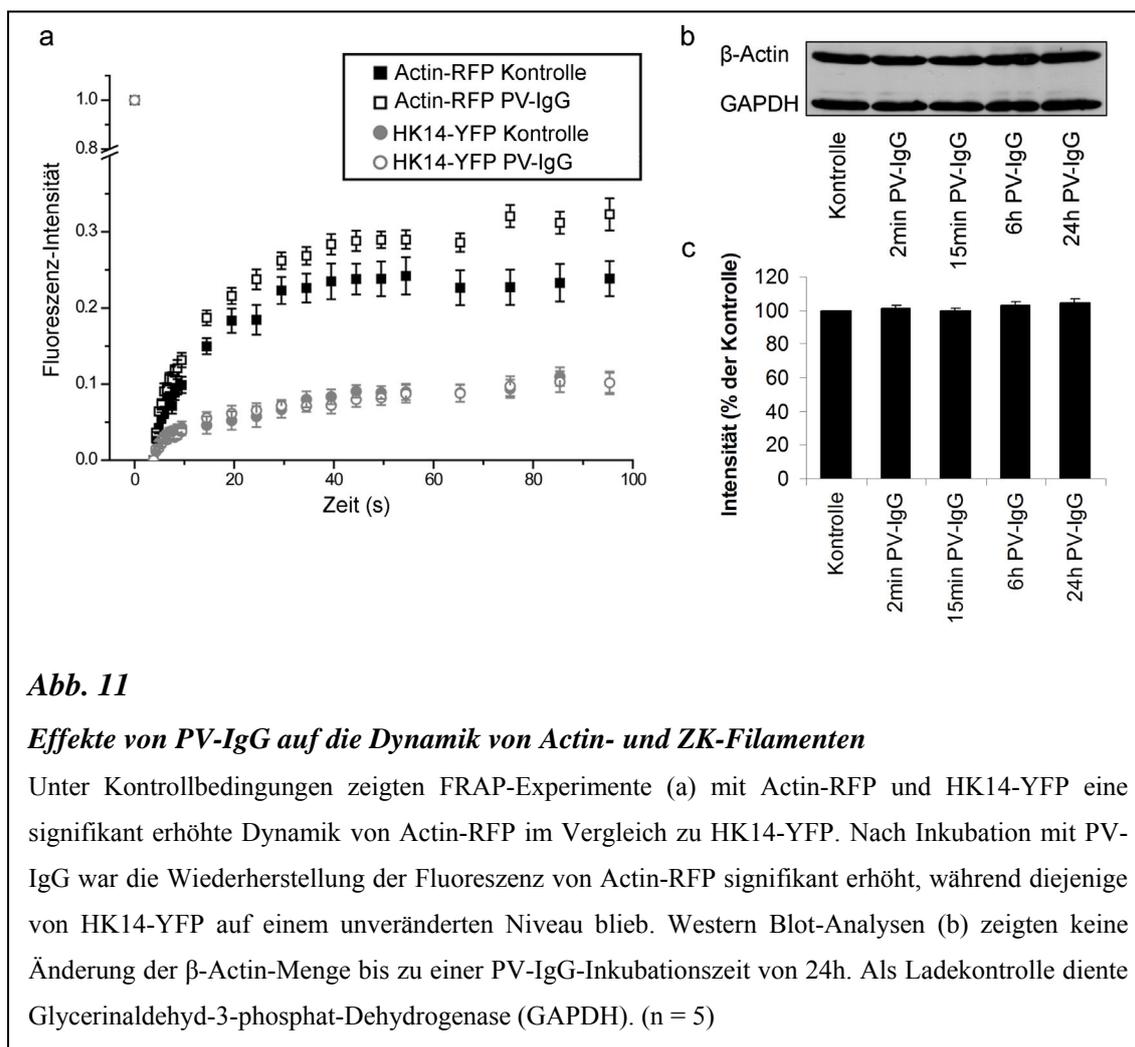
3.1.2 Effekte auf die Zell-Dissoziation

Als nächster Schritt wurden die beobachteten morphologischen Effekte auf Desmosomen und das Zytoskelett mit dem Beginn der Akantholyse, also dem Nachlassen der interzellulären Adhäsion korreliert. Aus diesem Grunde wurden Dispase-basierte Keratinozyten-Dissoziations-Versuche durchgeführt (Abb. 10).

Unter Kontrollbedingungen war die Anzahl der Zellfragmente gering (18 ± 2 Fragmente). Bereits 15min nach Zugabe von PV-IgG zeigte sich eine signifikante ($p < 0,05$) Zunahme der Fragmentation (82 ± 12). Diese nahm bis zu einer Inkubationszeit von 24h weiter auf 1560 ± 78 Fragmente zu. Somit war auch die Zell-Dissoziation ein frühes Ereignis nach Zugabe von PV-IgG, welche sich in einem ähnlichen zeitlichen Rahmen wie die zytoskelettalen Veränderungen entwickelte.



3.1.3 Effekte auf die Dynamik von ZK- und Actinfilamenten



Um die Effekte von PV-IgG auf die Dynamik von ZK- und Actinfilamenten zu untersuchen, wurden FRAP-Experimente durchgeführt. Dafür wurden Zellen entweder mit HK14-YFP (humanes Zytokeratin 14 gekoppelt an gelb-fluoreszierendes Protein) oder Actin-RFP (Actin gekoppelt an rot-fluoreszierendes Protein) transfiziert (Abb. 11a). Unter Kontrollbedingungen zeigte sich sowohl für Actin-RFP als auch für HK14-YFP eine schnelle Wiederherstellung der Fluoreszenz, welche etwa 40sek nach dem Bleichen ein Plateau erreichte. Allerdings zeigte sich, dass die Motilität von Actin im Vergleich zu HK14-YFP bereits unter Kontrollbedingungen erhöht war, was auf eine basal erhöhte Dynamik von Actin-RFP hindeutete und frühere Berichte bestätigt (Yoon et al. 2001; Campbell et al. 2007). Die Wiederherstellung der Fluoreszenz von HK14-YFP blieb trotz Inkubation mit PV-IgG auf einem unveränderten Niveau, während die Wiederherstellung der Fluoreszenz von Actin-RFP signifikant gegenüber den

Kontrollen erhöht war. Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte auf einer durch PV-IgG gesteigerten Synthese von Actin beruhten, wurden Western Blot-Analysen der β -Actin-Menge nach Inkubation mit PV-IgG durchgeführt. In diesen fand sich keine wesentliche Änderung der β -Actin-Menge bis zu einer Inkubationszeit von 24h, so dass eine Neubildung von β -Actin in diesen Experimenten vernachlässigt werden kann. Aus diesen Experimenten lässt sich folglich schließen, dass PV-IgG Einfluss auf die Dynamik von Actinfilamenten hat, wohingegen sich keine Veränderungen der ZK-Dynamik zeigen ließen.

3.2 Bedeutung von p38MAPK und E-Cadherin für die PV-IgG-induzierten Effekte

3.2.1 Bedeutung der p38MAPK für ZK-Retraktion und Zell-Dissoziation

Als ein frühes und wichtiges Ereignis der durch PV-IgG induzierten Akantholyse ist eine Aktivierung der p38MAPK bekannt (Berkowitz et al. 2005; Berkowitz et al. 2006). Wir versuchten nun, die Bedeutung der p38MAPK für die ZK-Retraktion, welche ein wichtiges morphologisches Korrelat der Akantholyse ist, näher zu untersuchen. Aus diesem Grunde wurde ein Inhibitor (SB202190) sowie ein Aktivator der p38MAPK (Anisomycin) eingesetzt und deren Auswirkung auf die PV-IgG-induzierte ZK-Retraktion untersucht. Unter Kontrollbedingungen zeigte sich eine zytoplasmatische Verteilung der ZK-Filamente, welche bis an die Zellgrenzen reichte und dort mit dem linear verteilten Dsg3 kolokalisierte (Abb. 12a). Nach Inkubation mit PV-IgG war die Dsg3-Färbung fragmentiert und eine ZK-Retraktion deutlich sichtbar (Abb. 12b). Inkubation mit Anisomycin führte zu einer ZK-Retraktion, welche mit derjenigen nach PV-IgG-Inkubation vergleichbar war, während die Verteilung von Dsg3 durch Anisomycin nur gering beeinträchtigt wurde, so dass keine Reorganisation sichtbar wurde (Abb. 12c). Koinkubation von PV-IgG und Anisomycin führte zu einer verstärkten ZK-Retraktion (Abb. 12d). Durch SB202190 konnten sowohl die durch PV-IgG, als auch die durch Anisomycin induzierte ZK-Retraktion erfolgreich vermindert werden (Abb. 12e, f). Die Dsg3-Reorganisation hingegen konnte SB202190 nicht komplett aufheben.

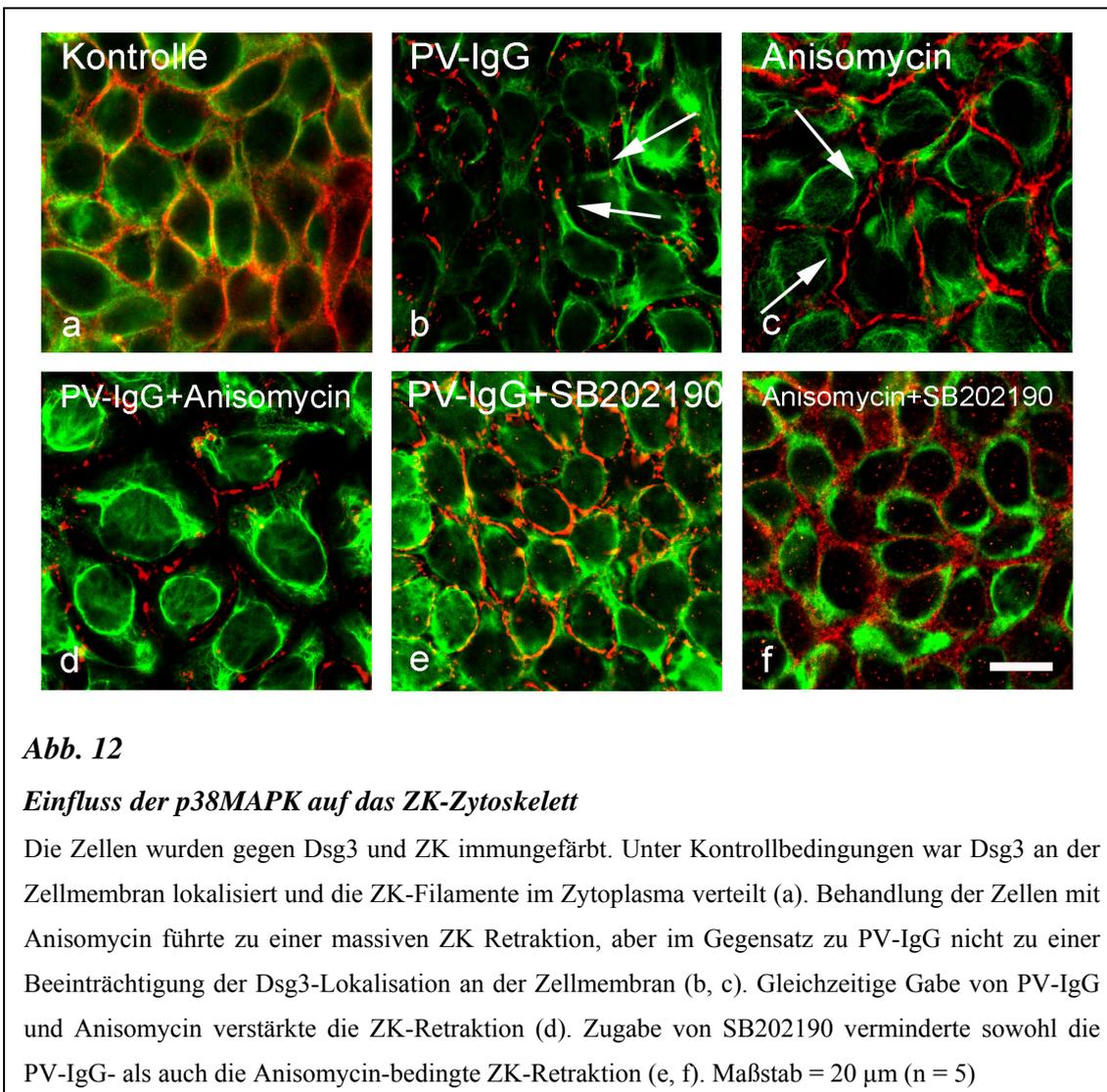


Abb. 12

Einfluss der p38MAPK auf das ZK-Zytoskelett

Die Zellen wurden gegen Dsg3 und ZK immungefärbt. Unter Kontrollbedingungen war Dsg3 an der Zellmembran lokalisiert und die ZK-Filamente im Zytoplasma verteilt (a). Behandlung der Zellen mit Anisomycin führte zu einer massiven ZK Retraktion, aber im Gegensatz zu PV-IgG nicht zu einer Beeinträchtigung der Dsg3-Lokalisation an der Zellmembran (b, c). Gleichzeitige Gabe von PV-IgG und Anisomycin verstärkte die ZK-Retraktion (d). Zugabe von SB202190 verminderte sowohl die PV-IgG- als auch die Anisomycin-bedingte ZK-Retraktion (e, f). Maßstab = 20 μ m (n = 5)

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob die in der Immunofluoreszenz beobachteten morphologischen Effekte ein Korrelat auf funktioneller Ebene in Dispase-basierten Keratinozyten-Dissoziations-Versuchen hatten (Abb. 13). Während unter Kontrollbedingungen der Zellverband nur gering fragmentiert wurde (13 ± 1 Fragmente), führten sowohl PV-IgG als auch Anisomycin zu einer deutlichen Zunahme der Fragmentation (402 ± 18 bzw. 283 ± 25 Fragmente, $p < 0,05$ für beide im Vergleich zur Kontrolle). In Übereinstimmung mit den Immunofluoreszenz-Studien konnte SB202190 beides, die durch Anisomycin und die durch PV-IgG induzierte Zellfragmentation, blockieren (111 ± 14 bzw. 22 ± 4 Fragmente, $p < 0,05$ für beide). Die alleinige Inkubation mit SB202190 konnte die Anzahl der Fragmente im Vergleich zu den Kontrollen nochmals signifikant senken (5 ± 1 Fragmente, $p < 0,05$). Somit lässt sich zusammenfassen, dass sich eine deutliche Abhängigkeit sowohl der ZK-Retraktion

als auch der Zell-Dissoziation von einer p38MAPK-Aktivierung fand, während die Dsg3-Reorganisation davon unabhängig zu sein scheint.

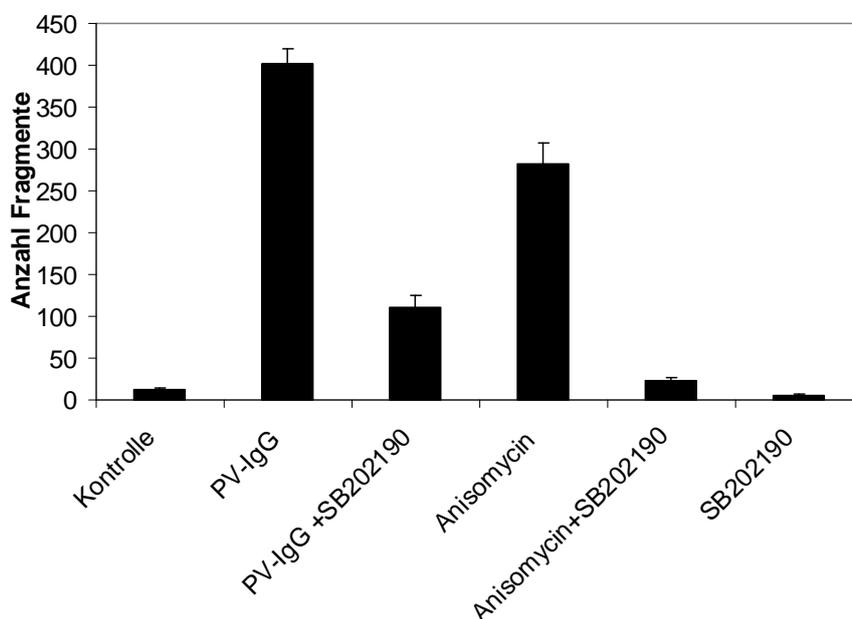


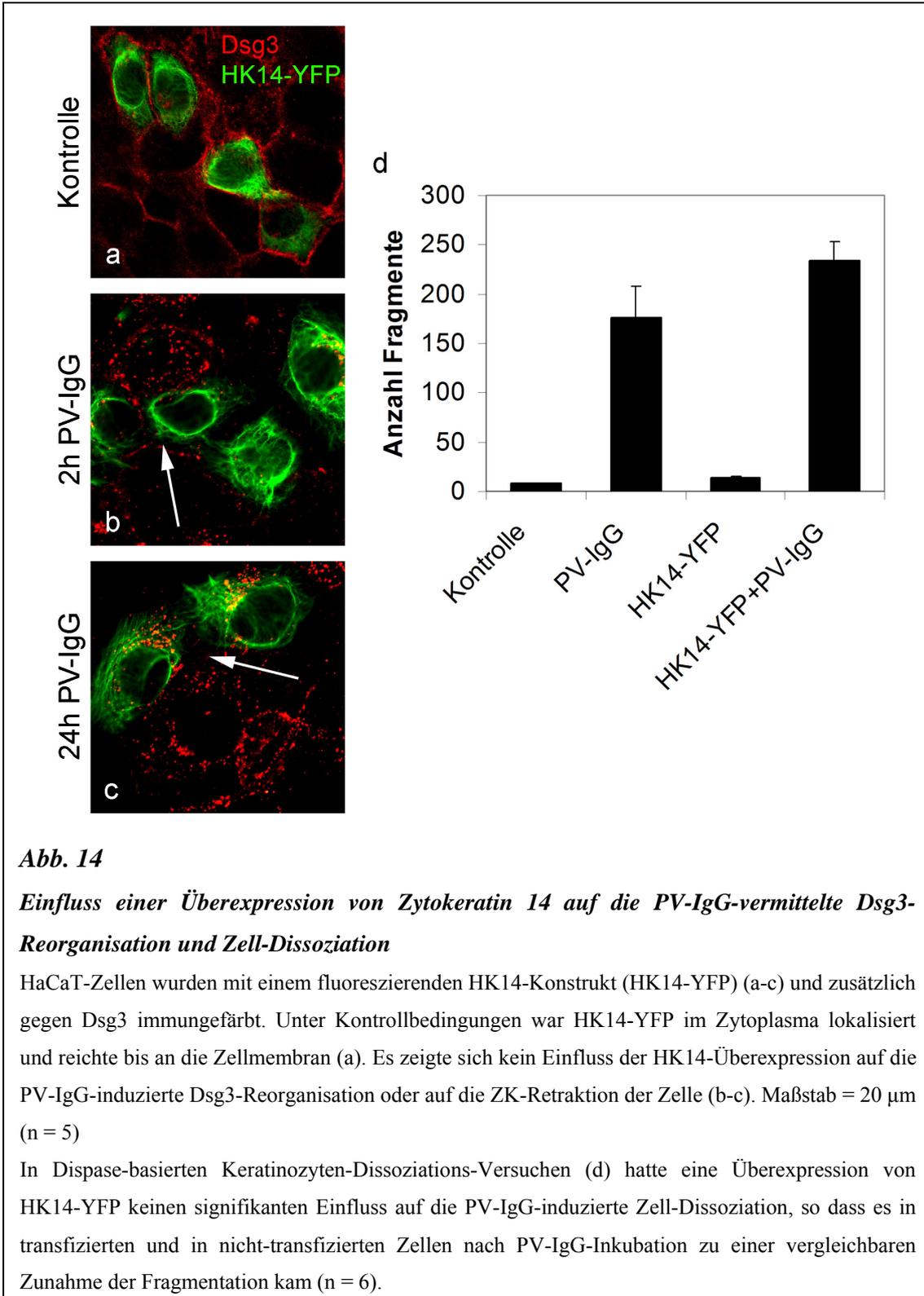
Abb. 13

Einfluss der p38MAPK auf die Zell-Dissoziation

In Dispase-basierten Keratinozyten-Dissoziations-Versuchen war die Anzahl der Zellfragmente unter Kontrollbedingungen gering. Inkubation mit PV-IgG oder Anisomycin führte zu einer deutlichen Erhöhung der Fragmentzahl. Sowohl die durch PV-IgG als auch die durch Anisomycin induzierte Fragmentation konnte durch SB2021090 reduziert werden. (n = 6 für jede Kondition)

3.2.2 Einfluss einer Zytokeratin-Überexpression auf die PV-IgG-induzierte Dsg3-Reorganisation, ZK-Retraktion und Zell-Dissoziation

Die vorherigen Experimente zeigten eine Abhängigkeit der ZK-Retraktion und der Zell-Dissoziation von einer p38MAPK-Aktivierung, während die Dsg3-Reorganisation davon unabhängig zu sein scheint. Dies warf die Frage auf, welchen Stellenwert die ZK-Retraktion im Rahmen der PV-Pathogenese innehat. Um die Bedeutung von ZK-Filamenten gezielt zu untersuchen, wurden Zellen mit HK14-YFP transfiziert, so dass dies in den Zellen überexprimiert wurde und man den Einfluss der gesteigerten Expression auf die PV-IgG-induzierten Effekte untersuchen konnte.



In den mit HK14-YFP transfizierten Zellen erstreckten sich die Filamente durch das gesamte Zytoplasma und erreichten die Zellgrenzen. Die Färbung mit Dsg3 zeigte ebenfalls die bekannte lineare Verteilung an den Zellgrenzen (Abb. 14a). Bereits nach

2h Inkubation mit PV-IgG war eine deutliche Fragmentation der Dsg3-Färbung sowohl in den HK14-YFP-transfizierten Zellen als auch in den nicht-transfizierten Zellen sichtbar. Dies war begleitet von einer deutlichen ZK-Retraktion in den transfizierten Zellen (Pfeile in Abb. 14b). Nach 24h Inkubation waren die Effekte zusätzlich verstärkt (Abb. 14c).

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse führten wir Dispase-basierte Keratinozyten-Dissoziations-Versuche mit den HK14-YFP-überexprimierenden Zellen durch (Abb. 14d). Unter Kontrollbedingungen war die Fragmentzahl in nicht-transfizierten Zellen mit 8 ± 1 und in transfizierten Zellen mit 13 ± 2 gering. In Übereinstimmung mit den Immunofluoreszenz-Experimenten hatte die HK14-YFP-Überexpression demnach keinen Einfluss auf die Zell-Fragmentation, da es sowohl in nicht-transfizierten als auch in transfizierten Zellen zu einer deutlichen Zunahme der Fragmentanzahl nach Inkubation mit PV-IgG kam (176 ± 31 bzw. 234 ± 19 Fragmente), welche sich nicht signifikant voneinander unterschieden. Die Zytokeratin-Überexpression hatte also keinen Einfluss auf die Dsg3-Reorganisation, die ZK-Retraktion sowie die Zell-Dissoziation.

3.2.3 Einfluss einer E-Cadherin-Überexpression auf die PV-IgG-induzierte Dsg3-Reorganisation, ZK-Retraktion und Zell-Dissoziation

Es ist bekannt, dass eine Dsg3-Überexpression PV-IgG-vermittelte Effekte hemmen kann (Jennings et al. 2011). Dies lässt vermuten, dass Prozessen an den desmosomalen Cadherinen eine übergeordnete Rolle in der Vermittlung der PV-Pathogenese zukommt. Neben den Desmosomen spielen jedoch auch die Adhärenskontakte eine wesentliche Rolle für die epidermale Adhäsion (Niessen 2007; Franke 2009). Bisher wird die Rolle der Adhärenskontakte für die PV-Pathogenese jedoch kontrovers beurteilt (Calkins et al. 2006; Waschke et al. 2006; de Bruin et al. 2007; Cirillo et al. 2010; Jolly et al. 2010). Auch in unseren Experimenten fanden sich in Immunofluoreszenzstudien keine signifikanten morphologischen Veränderungen der E-Cadherin-Verteilung, welche auf eine wichtige Rolle der Adhärenskontakte hindeuten würden (siehe unten). Um dennoch die Rolle der Adhärenskontakte für die PV-Pathogenese näher zu untersuchen,

transfzierten wir analog zu obigen Experimenten Zellen mit E-Cadherin-GFP (E-Cadherin gekoppelt an grün-fluoreszierendes Protein).

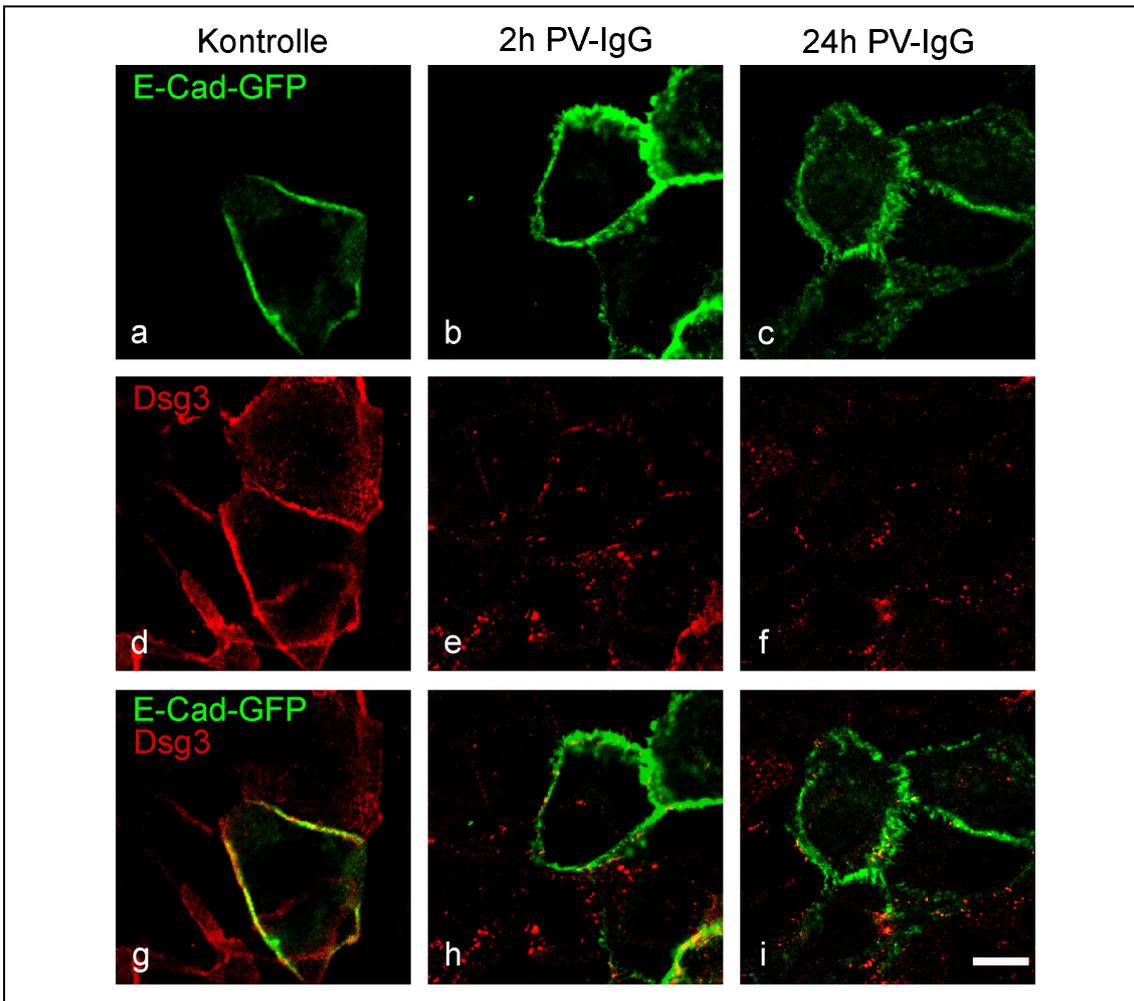


Abb. 15

Einfluss einer E-Cadherin-Überexpression auf die PV-IgG-induzierte Dsg3-Reorganisation

HaCaT Zellen wurden mit einem fluoreszierenden E-Cadherin-Konstrukt (E-Cad-GFP) transfiziert und zusätzlich gegen Dsg3 immungefärbt. Unter Kontrollbedingungen zeigte sowohl E-Cad-GFP (a, g) als auch Dsg3 (d, g) eine lineare Verteilung an der Zellmembran. Nach Inkubation mit PV-IgG für 2h (b, h) und 24h (c, i) war E-Cad-GFP nach wie vor an der Zellmembran lokalisiert und dessen Verteilung nur gering beeinträchtigt, während sich eine Dsg3-Reorganisation sowohl in den transfzierten als auch den nicht-transfzierten Zellen zeigte (e-f, h-i). Maßstab = 20 µm (n = 5)

In Immunofluoreszenzstudien wurden E-Cadherin-überexprimierende Zellen gegen Dsg3 immungefärbt und deren Verhalten in Reaktion auf PV-IgG untersucht (Abb. 15). Unter Kontrollbedingungen war E-Cadherin-GFP linear an den Membranen verteilt (Abb. 15a) und zeigte dort eine Überlappung mit der Dsg3-Färbung (Abb. 15g). Die

Inkubation mit PV-IgG führte sowohl nach 2h als auch nach 24h nur zu leichten Veränderungen des E-Cadherin-GFP-Verteilungsmusters (Abb. 15b, c). Demgegenüber zeigte die Dsg3-Färbung bereits nach 2h und noch deutlicher nach 24h eine Dsg3-Reorganisation, welche sich sowohl in den transfizierten als auch den nicht-transfizierten Zellen fand (Abb. 15e, f). Eine E-Cadherin-Überexpression hatte also keinen Einfluss auf die PV-IgG-induzierte Dsg3-Reorganisation.

Um zu untersuchen, ob dies auch für die PV-IgG-induzierte Zell-Dissoziation gilt, führten wir Dispase-basierte Keratinozyten-Dissoziations-Versuche mit den E-Cadherin-überexprimierenden Zellen durch (Abb 16).

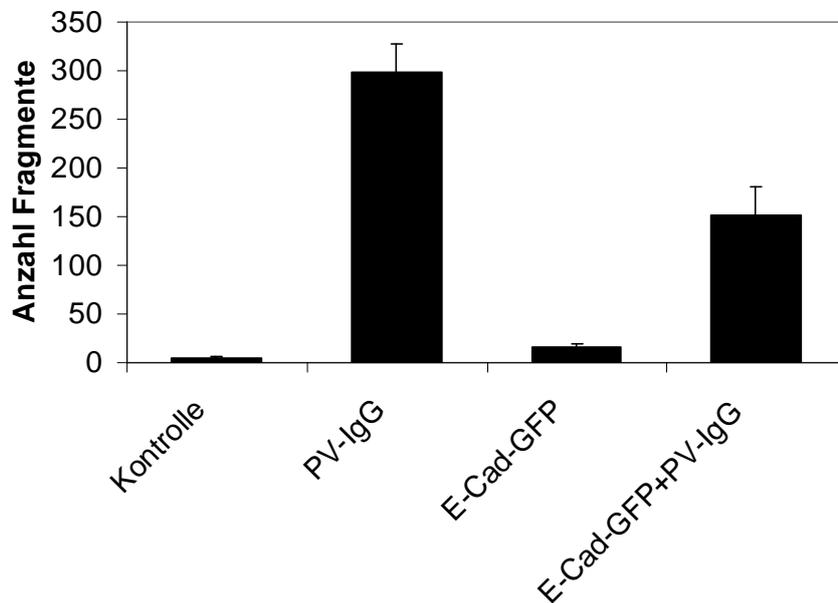


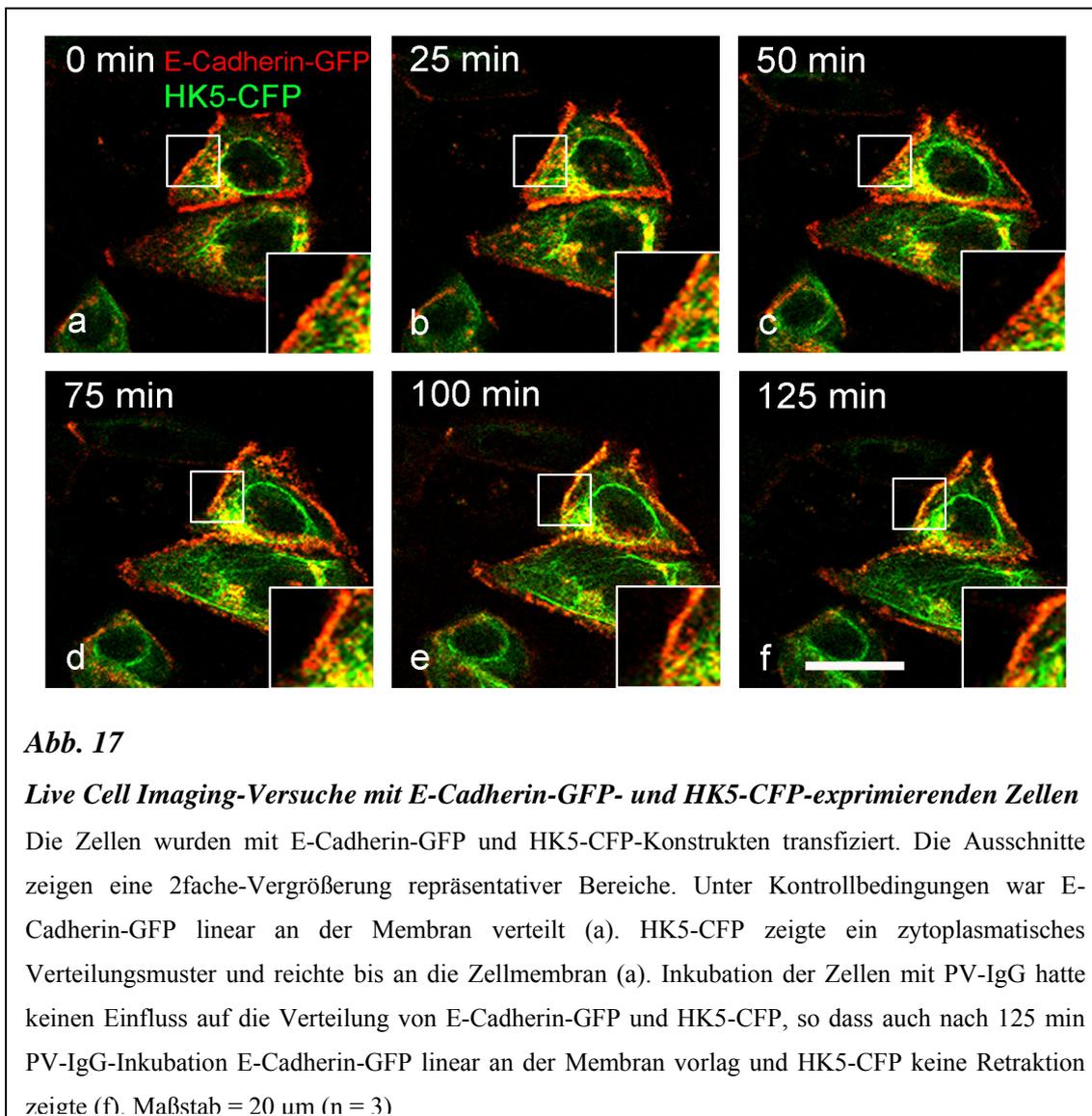
Abb. 16

Effekte der Überexpression von E-Cadherin auf den PV-IgG-induzierten Verlust der Zell-Dissoziation

Unter Kontrollbedingungen war die Zell-Dissoziation der transfizierten und nicht-transfizierten Zellen gering, während Inkubation mit PV-IgG in den nicht-transfizierten Zellen zu einer starken Fragmentation führte. Durch eine E-Cadherin-GFP-Überexpression konnte die Anzahl der Fragmente nach PV-IgG-Inkubation im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen signifikant reduziert werden (b) (n = 6).

In den Kontrollen zeigte sich in den transfizierten und nicht-transfizierten Zellen eine geringe Fragmentzahl (5 ± 1 bzw. 12 ± 4). Inkubation sowohl der nicht-transfizierten als auch der transfizierten Zellen führte zu einer signifikanten Zunahme der Fragmentzahl. Allerdings zeigten die mit E-Cadherin-GFP transfizierten Zellen eine signifikante

Reduktion der Fragmentanzahl nach Inkubation mit PV-IgG im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen (152 ± 29 bzw. 298 ± 29 Fragmente, $p < 0,05$). Es zeigte sich somit eine protektive Rolle der E-Cadherin-GFP-Überexpression auf die PV-IgG-induzierte Zell-Dissoziation.



Um zu untersuchen, ob die E-Cadherin-GFP-Überexpression auch Einfluss auf die Ausbildung der ZK-Retraktion hat, führten wir Live Cell Imaging-Versuche durch. Dazu transfizierten wir die Zellen mit HK5-CFP und E-Cadherin-GFP und beobachteten deren Verhalten in Reaktion auf Inkubation mit PV-IgG. Vor der Zugabe von PV-IgG war E-Cadherin-GFP linear an der Membran lokalisiert. HK5-CFP war im Zytoplasma verteilt und erreichte die Zellmembran (Abb. 17a). Nach Zugabe von PV-IgG blieb das lineare E-Cadherin-Verteilungsmuster erhalten, so dass auch nach 2h PV-

IgG-Inkubation keine wesentliche Reorganisation des E-Cadherin-GFP-Signals sichtbar wurde. Darüber hinaus wurde während 2h PV-IgG-Inkubation keine ZK-Retraktion nachweisbar, so dass sich die Filamente bis zum Ende der Messungen unverändert bis an die Zellmembran erstreckten (Abb. 17b – f). So lässt sich zusammenfassen, dass eine Überexpression von E-Cadherin protektiv auf die PV-IgG-induzierte ZK-Retraktion und Zell-Dissoziation wirkte, aber keinen Einfluss auf die PV-IgG-induzierte Dsg3-Reorganisation hatte.

3.2.4 Einfluss einer E-Cadherin-Überexpression auf die p38MAPK-Aktivierung bei PV

Die beschriebenen Experimente zeigten einen protektiven Effekt einer Überexpression von E-Cadherin auf die PV-IgG-vermittelte Zell-Dissoziation und die ZK-Retraktion. Hierfür kommen zwei mögliche Erklärungen in Betracht. Zum einen könnte eine Überexpression von E-Cadherin zu einer erhöhten Adhäsion zwischen den Zellen führen und darüber die PV-IgG-Effekte hemmen. Zum anderen könnte die E-Cadherin-Überexpression auch Einfluss auf intrazelluläre Signalwege, wie der p38MAPK-Signalkaskade, nehmen und hierüber protektiv wirken. Um dies zu untersuchen, führten wir zunächst Dispase-basierte Keratinozyten-Dissoziations-Versuche mit dem p38MAPK-Aktivator Anisomycin in E-Cadherin-überexprimierenden Zellen durch und verglichen deren Verhalten mit nicht-transfizierten Zellen (Abb. 18). Unter Kontrollbedingungen war die Fragmentzahl in transfizierten und nicht-transfizierten Zellen gering (6 ± 2 bzw. 3 ± 1). Inkubation der nicht-transfizierten Zellen mit Anisomycin für 6h führte zu einem Anstieg der Fragmentzahl auf 89 ± 11 . Dieser Anstieg der Fragmentzahl war in den mit E-Cadherin-GFP transfizierten Zellen signifikant auf 57 ± 7 Fragmente reduziert ($p < 0,05$, $n=9$).

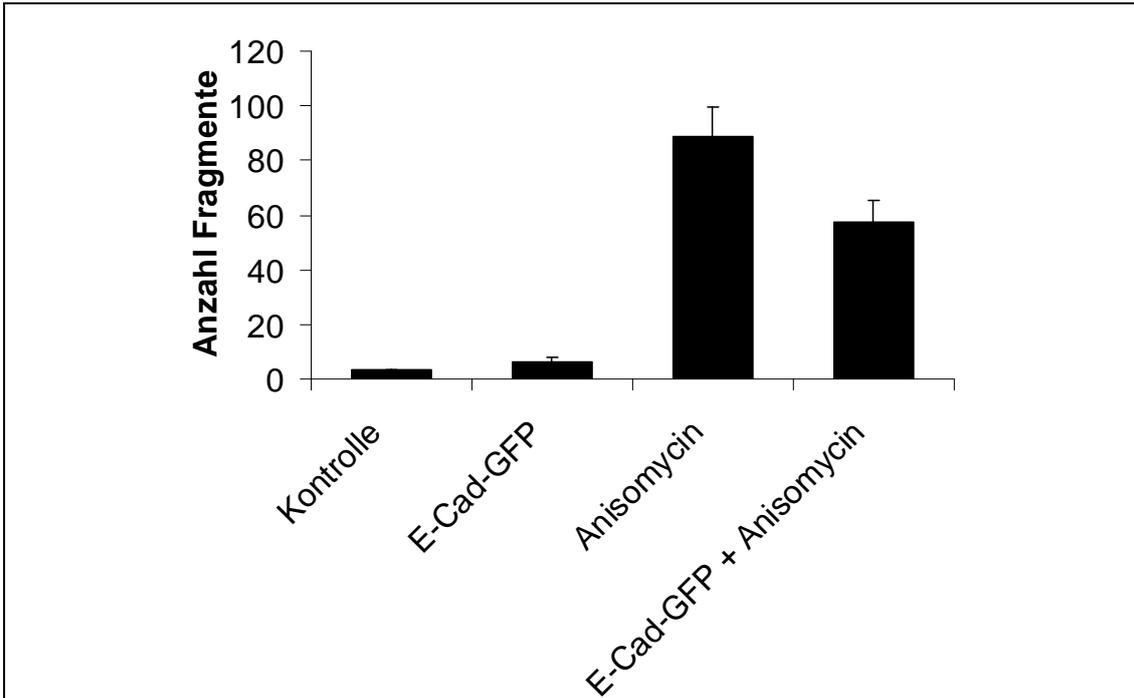
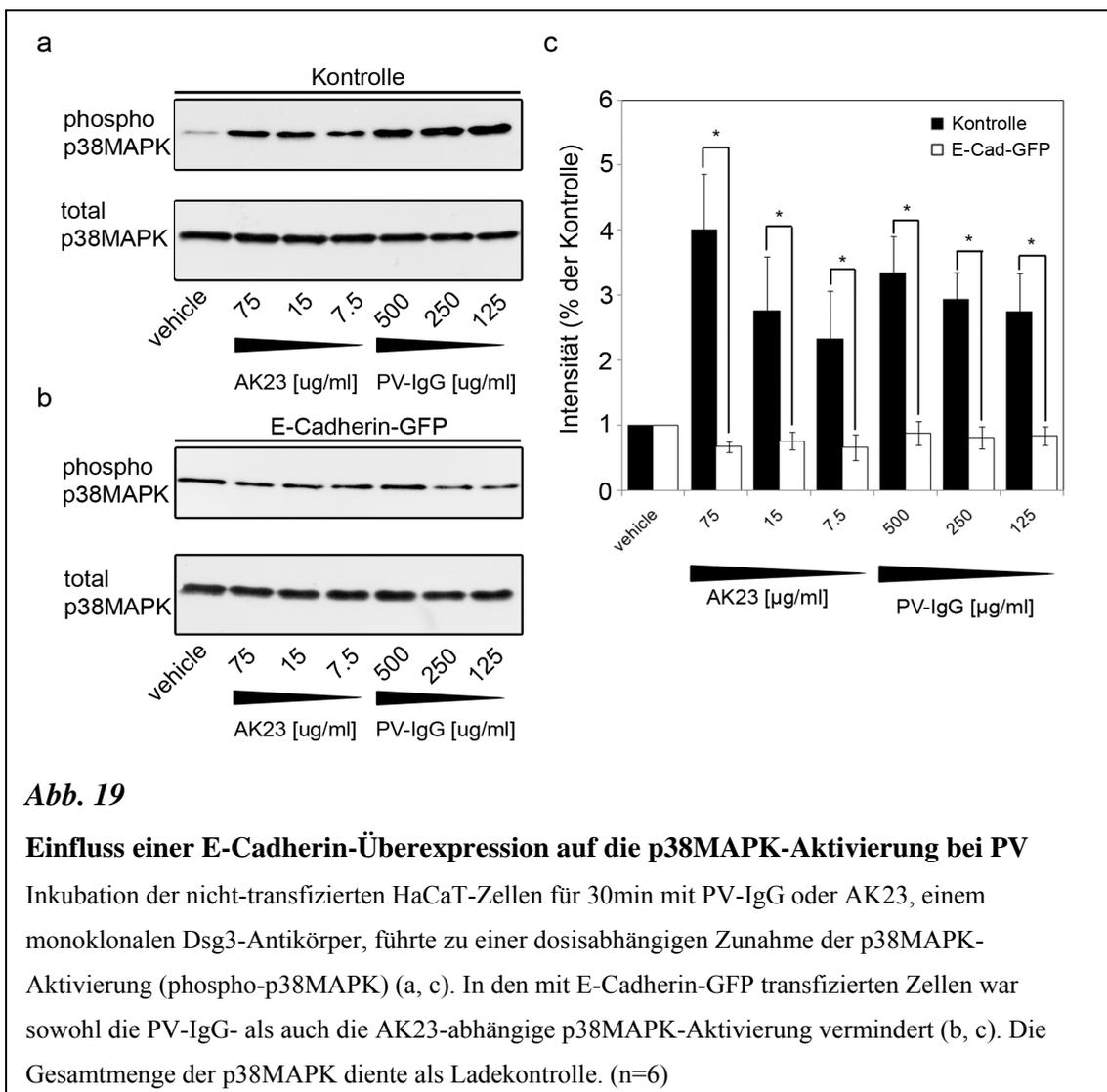


Abb. 18

Rolle einer E-Cadherin-Überexpression für die p38MAPK-vermittelte Zell-Dissoziation

In Dispase-basierten Zell-Dissoziations-Versuchen führte die Aktivierung der p38MAPK zu einer Erhöhung der Zell-Dissoziation. Durch Überexpression von E-Cadherin-GFP kam es zu einer signifikanten Verminderung der Zell-Dissoziation im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen. (n = 3)

Die Ergebnisse zeigen, dass der p38MAPK-abhängige Verlust der Zell-Zell-Adhäsion durch eine E-Cadherin-Überexpression teilweise gehemmt werden kann. Dies weist darauf hin, dass eine E-Cadherin-Überexpression unter anderem die Adhäsion zwischen den Zellen erhöhen und somit protektiv auf die p38MAPK-abhängige Zell-Dissoziation wirken kann. Um herauszufinden, ob eine E-Cadherin-Überexpression auch über eine direkte Beeinflussung intrazellulärer Signalwege protektiv wirkt, wurde die PV-IgG-abhängige Aktivierung der p38MAPK in E-Cadherin-überexprimierenden Zellen in Western Blot-Analysen untersucht und mit nicht-transfizierten Zellen verglichen (Abb. 19). Es ist bekannt, dass eine PV-IgG-abhängige Aktivierung der p38MAPK ihren Ausdruck in spezifischen Phosphorylierungen der p38MAPK findet (Berkowitz et al. 2005). Diese können mit speziellen Antikörpern nachgewiesen werden. Somit ist die Zunahme der phosphorylierten p38MAPK (phospho-p38MAPK) in Western Blot-Analysen ein Maß für die Aktivierung der p38MAPK.



Im Vergleich zu den Kontrollen führte die Inkubation der nicht-transfizierten Zellen mit PV-IgG für 30min zu einer dosisabhängigen Aktivierung der p38MAPK mit einer signifikanten Zunahme der phospho-p38MAPK-Fluoreszenz (Abb 19a, c). In den E-Cadherin-überexprimierenden Zellen hingegen war die PV-IgG-abhängige p38MAPK-Aktivierung komplett aufgehoben (Abb. 19b, c).

Neben PV-IgG wurden die Zellen auch mit AK23, einem murinen monoklonalen Antikörper gegen die EC 1-Domäne von murinem Dsg3, inkubiert. Es ist bekannt, dass AK23 durch selektive Inhibition der Dsg3-Transinteraktion einen Verlust der Zell-Adhäsion vermitteln kann (Tsunoda et al. 2003; Heupel et al. 2008). Nun war es von Interesse, ob eine selektive Inhibition von Dsg3 durch AK23 zu einer p38MAPK-Aktivierung führen kann und ob eine E-Cadherin-Überexpression diese verändert.

In unseren Experimenten führte AK23 in den nicht-transfizierten Zellen nach Inkubation für 30min zu einem dosisabhängigen Anstieg der p38MAPK-Aktivierung, welche mit derjenigen nach PV-IgG-Inkubation vergleichbar war (Abb 19a, c). Durch Transfektion der Zellen mit E-Cadherin konnte die AK23-abhängige p38MAPK-Aktivierung verhindert werden (Abb. 19b, c).

Somit zeigen diese Ergebnisse, dass eine E-Cadherin-Überexpression über eine direkte Beeinflussung intrazellulärer Signalwege Einfluss auf die PV-Pathogenese nehmen kann. Dabei kann E-Cadherin sowohl die PV-IgG-abhängige als auch die durch selektive Inhibition von Dsg3 bedingte Aktivierung der p38MAPK hemmen.

3.3 Bedeutung des Actin-Zytoskeletts für die PV-IgG-induzierten Effekte

3.3.1 Pharmakologische Modulation des Actin-Zytoskeletts

Neben der ZK-Retraktion zählt die Actin-Reorganisation zu den typischen Merkmalen akantholytischer Zellen in Reaktion auf PV-IgG. In den vorherigen Experimenten zeigte sich, dass sich die Reorganisation von Actinfilamenten parallel zur Dsg3-Reorganisation und der ZK-Retraktion entwickelte. Um die Rolle der Actin-Reorganisation für die PV-Pathogenese näher zu untersuchen, wurden spezifische pharmakologische Modulatoren des Actin-Zytoskeletts verwendet: Zum einen Cytochalasin D, welches die Actin-Polymerisation hemmt und somit zu einer Zerstörung der Filamente führt, und zum anderen Jasplakinolid, welches die Actin-Depolymerisation hemmt und dadurch Actin-Filamente stabilisiert. Zusätzlich zur Darstellung der Desmosomen durch Immunofärbung gegen Dsg3 wurden die Zellen gegen E-Cadherin gefärbt, um auch eine eventuelle Beeinträchtigung der Adhärenskontakte sichtbar zu machen (Abb. 19).

Unter Kontrollbedingungen waren Actinfilamente, Dsg3 und E-Cadherin an der Membran lokalisiert (Abb. 20a-c). Nach Zugabe von PV-IgG für 2h wurde die Fragmentation der Dsg3-Färbung und die Actin-Reorganisation sichtbar (Abb. 20d, e), während sich keine wesentlichen Veränderungen der E-Cadherin-Verteilung zeigten (Abb. 20f).

3. Ergebnisse

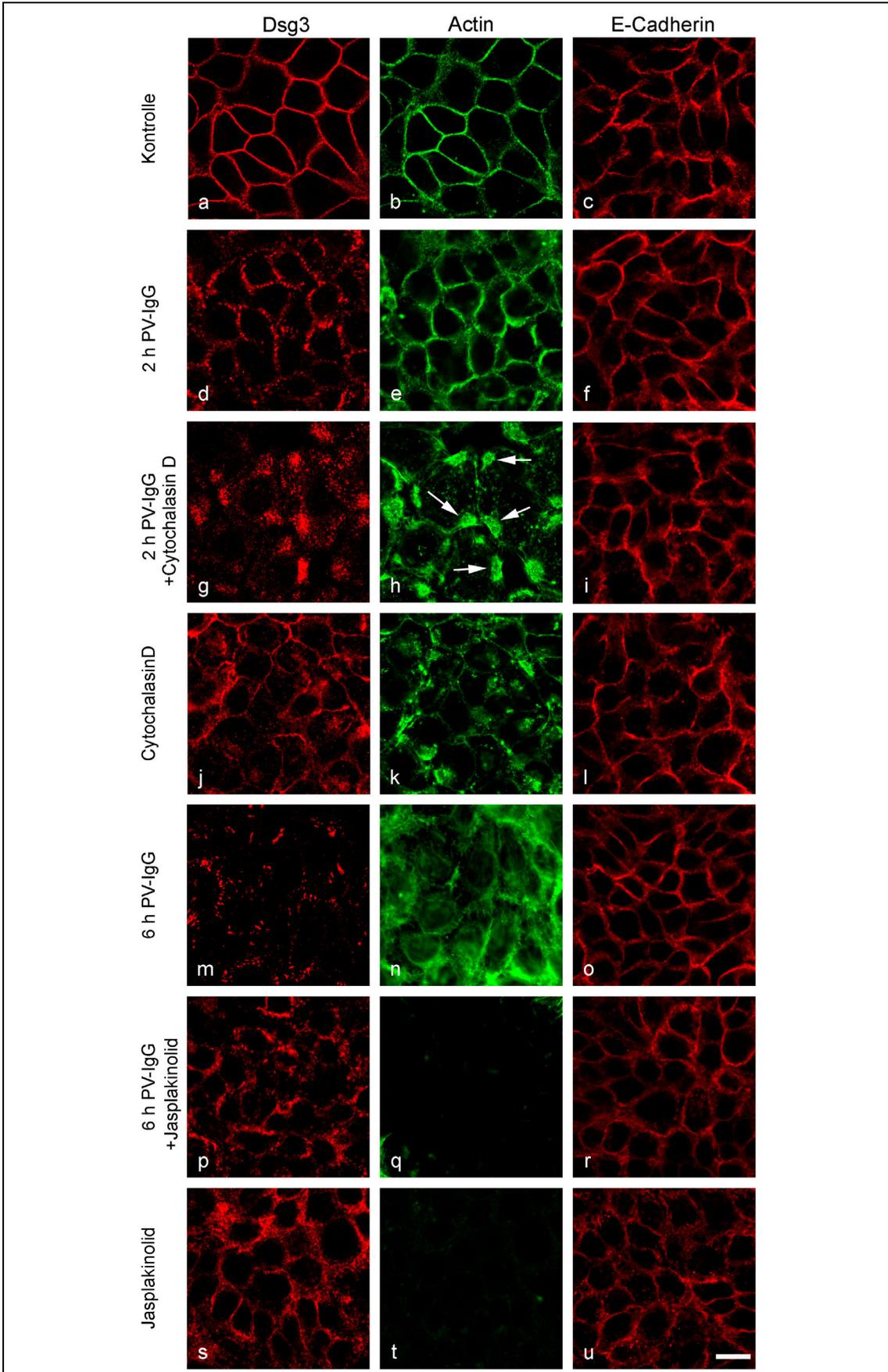


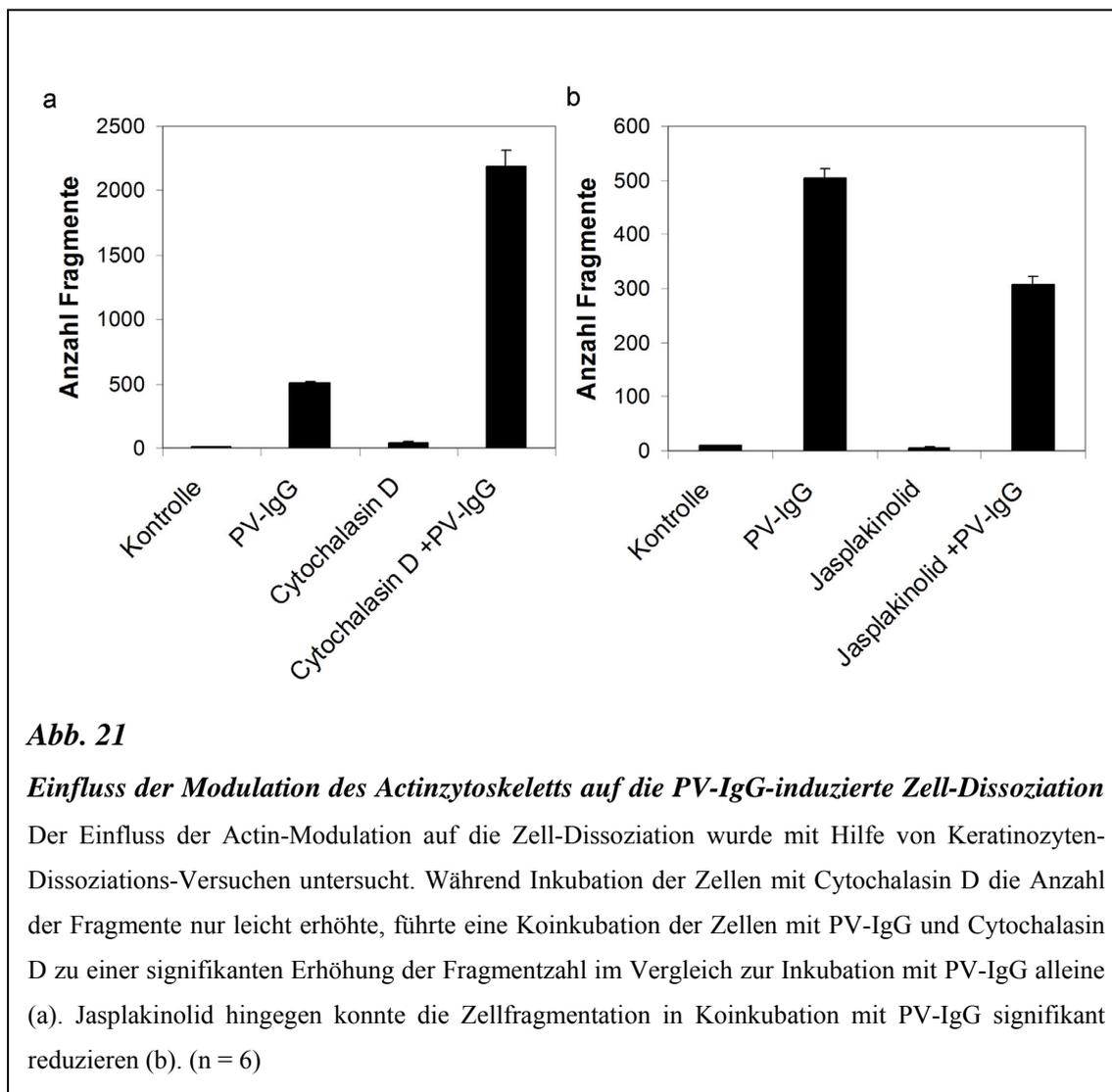
Abb. 20***Einfluss der Modulation des Actinzytoskeletts auf die durch PV-IgG induzierte Dsg3-Reorganisation***

Im Vergleich zu den Kontrollen (a, b) führte die Inkubation mit PV-IgG für 2h zu einer Fragmentation der Dsg3-Färbung und einer Schwächung des kortikalen Actin-Ringes (d-f). Koinkubation der Zellen mit PV-IgG und der Actin-depolymerisierenden Substanz Cytochalasin D führte zu einer Zerstörung der Actinfilamente und punktförmigen Actin-Ansammlungen (h, Pfeile), welche sich nicht nach Inkubation mit PV-IgG fanden (e). Daneben war die Dsg3-Reorganisation im Vergleich zu 2h PV-IgG-Inkubation verstärkt (d, g). Durch Jasplakinolid, welches F-Actin stabilisiert, konnten die Effekte auf Dsg3 im Vergleich zu 6h PV-IgG-Inkubation (j) reduziert werden (m-o). Inkubation mit Cytochalasin D oder Jasplakinolid alleine führte zu einer leichten Veränderung der Dsg3-Verteilung (j, s), während die Actinfilamente durch Cytochalasin D stark verändert waren (k). Die Bindung von Alexa488-Phalloidin an Actin war in Jasplakinolid-behandelten Zellen stark reduziert, da beide Substanzen um dieselbe Bindungsstelle konkurrieren (n). Unter den gleichen Bedingungen zeigten sich nur geringe Veränderungen der E-Cadherin-Färbung (c, f, i, l, o, r, u). Maßstab = 20 µm (n = 5)

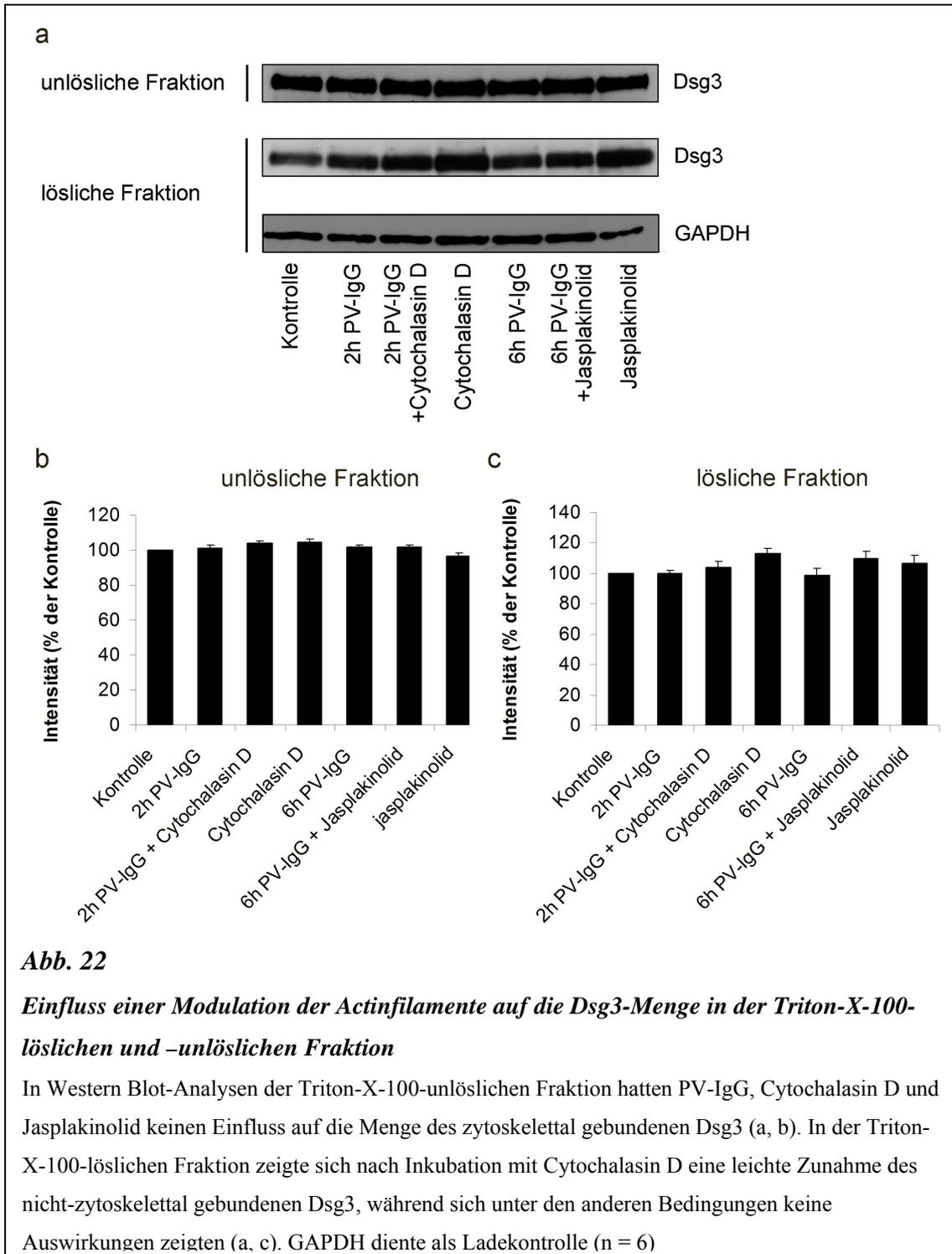
Die zusätzliche Gabe von Cytochalasin D führte zu einer massiven Zerstörung der Actin-Filamente, so dass Actin-Ansammlungen an der Zellmembran sichtbar wurden (Abb. 20h, Pfeile). Weiterhin war unter diesen Bedingungen die Dsg3-Reorganisation im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit PV-IgG verstärkt, so dass Dsg3 nahezu komplett von der Membran entfernt war und im Zytoplasma punktförmige Ansammlungen bildete (Abb. 20g). E-Cadherin hingegen präsentierte nur leichte Veränderungen (Abb. 20i). Diese Experimente zeigten, dass eine Actin-Depolymerisation die PV-IgG-induzierten Effekte auf Dsg3 verstärkt. Als nächsten Schritt testeten wir, ob eine Stabilisation der Actinfilamente im Gegenzug die PV-IgG-Effekte abschwächte. Aus diesem Grunde wurden Zellen mit PV-IgG und Jasplakinolid inkubiert. Diese Zellen zeigten im Vergleich zu Zellen, welche 6h mit PV-IgG inkubiert worden waren (Abb. 20m), eine verringerte Dsg3-Reorganisation. So blieb nach 6h Koinkubation Dsg3 an der Membran sichtbar und zeigte nur eine leichte Fragmentation (Abb. 20p). Für E-Cadherin fanden sich erneut nur geringe Veränderungen (Abb. 20r). Inkubation mit Cytochalasin D oder Jasplakinolid alleine führten nur zu einer geringen Beeinflussung von Dsg3 und E-Cadherin (Abb. 20j, l, s, u), während die Actinfilamente durch Cytochalasin D stark beeinträchtigt wurden (Abb. 20k). Die Bindung von Jasplakinolid an Actin konnte durch Alexa488-Phalloidin belegt werden, welches um

dieselbe Actin-Bindungsstelle kompetitiert und aus diesem Grunde die mit Jasplakinolid behandelten Zellen geringer färbte (Abb. 20q, t).

Diese Versuche wurden durch Keratinozyten-Dissoziations-Versuche ergänzt, um zu untersuchen, ob eine Actin-Modulation Einfluss auf die PV-IgG-induzierte Zell-Dissoziation hat (Abb. 21). Unter Kontrollbedingungen war die Anzahl der Fragmente 9 ± 1 , wohingegen die Inkubation mit PV-IgG zu einer Erhöhung auf 503 ± 13 Fragmente führte. Cytochalasin D alleine erhöhte die Fragmentation leicht (44 ± 9), während Koinkubation von Cytochalasin D mit PV-IgG zu einer signifikant erhöhten Fragmentation führte (2190 ± 127). Die Stabilisierung der Actinfilamente durch Jasplakinolid hingegen konnte nach Koinkubation mit PV-IgG die Anzahl der Fragmente signifikant senken (307 ± 15). Jasplakinolid alleine hatte keinen Effekt auf die Zell-Dissoziation (6 ± 1).



Es gibt Berichte darüber, dass die Behandlung von Zellen mit PV-IgG nicht nur zu einer Fragmentation, sondern auch zu einer Depletion von Dsg3 führen soll (Aoyama et al. 1999; Yamamoto et al. 2007). Es war nun von Interesse, diese Hypothese zu prüfen und zu untersuchen, ob eine Actin-Modulation Einfluss auf die Dsg3-Depletion ausüben kann.



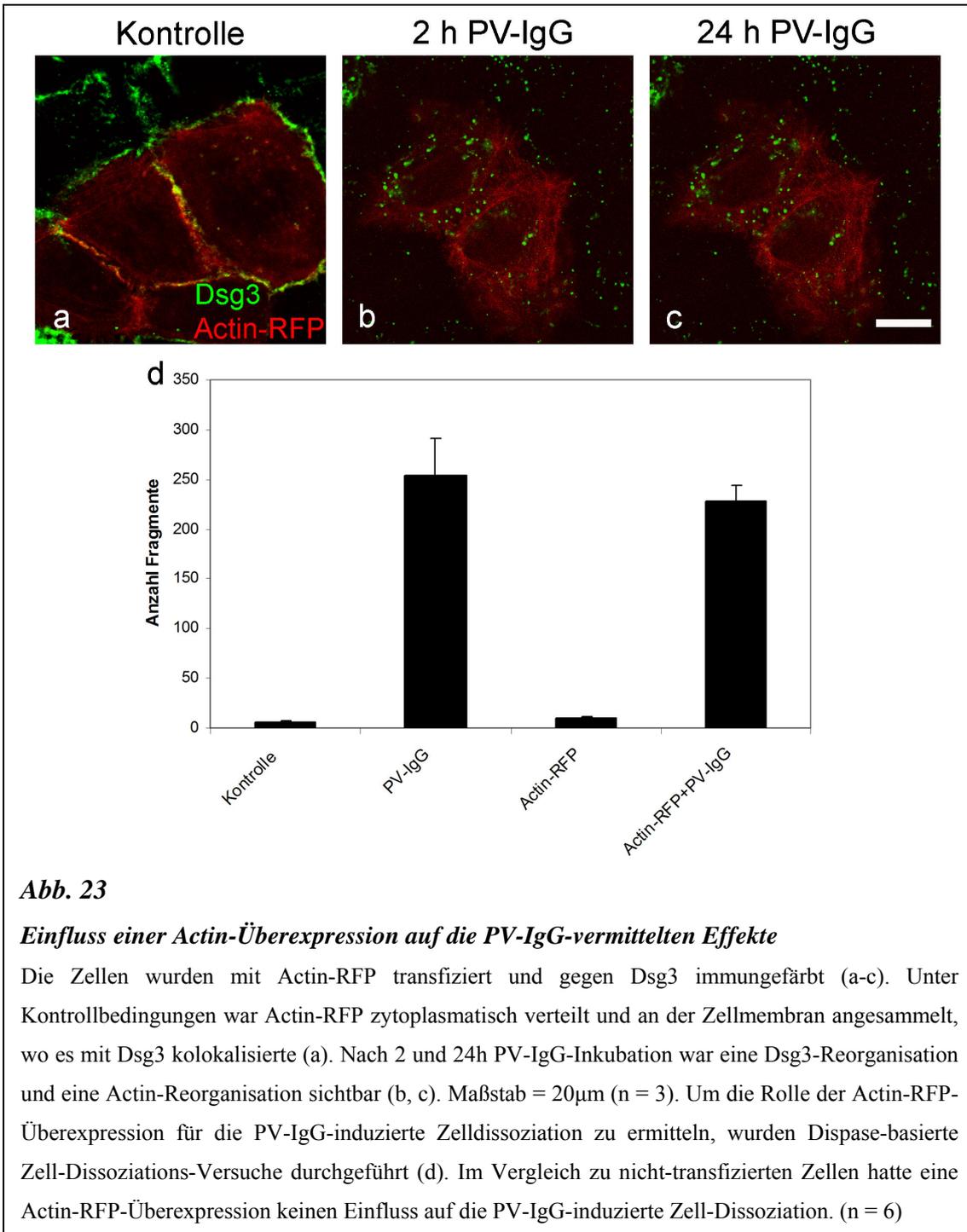
Aus diesem Grunde führten wir Western Blot-Analysen der Triton-X-100-löslichen und -unlöslichen Fraktion durch. Dies ermöglichte es zusätzlich, Veränderungen innerhalb der zytoskelettal-gebundenen (Triton-X-100-unlöslichen) und der nicht zytoskelettal-gebundenen (Triton-X-100-löslichen) Dsg3-Fraktion voneinander zu differenzieren (Abb.22).

In diesen Experimenten fanden sich weder durch PV-IgG noch durch Actin-Modulation Veränderungen des zytoskelettal-gebundenen Dsg3. Die nicht-zytoskelettale Fraktion zeigte lediglich nach Inkubation mit Cytochalasin D eine leichte, wenngleich signifikante Zunahme der Dsg3-Menge, während sich unter den anderen Bedingungen keine signifikanten Veränderungen zeigten. Unter unseren Bedingungen fanden sich also weder nach PV-IgG-Inkubation noch nach Actin-Modulation auffällige Veränderungen der Dsg3-Menge, so dass die beobachtete Dsg3-Reorganisation und der Verlust der Zell-Adhäsion nach Inkubation mit PV-IgG nicht durch eine Depletion von Dsg3 zu erklären sind.

3.3.2 Überexpression von Actin

Die vorherigen Experimente deuteten eine wichtige Rolle der Actinfilamente für die PV-Pathogenese an. Aus diesem Grunde interessierte uns, ob eine Actin-Überexpression Einfluss auf die durch PV-IgG ausgelösten Effekte haben kann. Deshalb wurden Zellen mit einem Konstrukt aus Actin gekoppelt an rot-fluoreszierendes Protein (Actin-RFP) transfiziert und deren Verhalten nach Gabe von PV-IgG beobachtet. Zur Darstellung der akantholytischen Aktivität diente die Färbung gegen Dsg3. Unter Kontrollbedingungen war Actin-RFP vorwiegend kortikal lokalisiert und Dsg3 zeigte eine lineare Verteilung an der Zellmembran (Abb. 23a). Bereits nach 2h war die Dsg3-Färbung sowohl in transfizierten als auch in nicht-transfizierten Zellen fragmentiert. Weiterhin zeigte Actin-RFP eine deutliche Entfernung von der Zellmembran und häufte sich in Form von Stressfasern im Zytoplasma an (Abb. 23b). Nach 24h waren diese Effekte noch zusätzlich verstärkt (Abb. 23c). Als ein funktioneller Versuch wurde der Dispase-basierte Keratinozyten-Dissoziations-Versuch angewendet, um die Effekte der Actin-Überexpression auf die Zell-Dissoziation näher zu beleuchten (Abb. 23d). Entsprechend der morphologischen Beobachtungen hatte die Actin-RFP-Überexpression keinen signifikanten Einfluss auf die Zell-Dissoziation im

Vergleich zu normalen Zellen, so dass die Fragmentzahl nach PV-IgG-Inkubation unverändert hoch blieb (254 ± 38 Fragmente in nicht-transfizierten Zellen zu 228 ± 16 Fragmenten in transfizierten Zellen, $p > 0,05$). Im Unterschied zur pharmakologischen Modulation des Actin-Zytoskeletts war eine Überexpression von Actin demnach nicht ausreichend, um die Effekte der PV-IgG-Inkubation abzuschwächen.

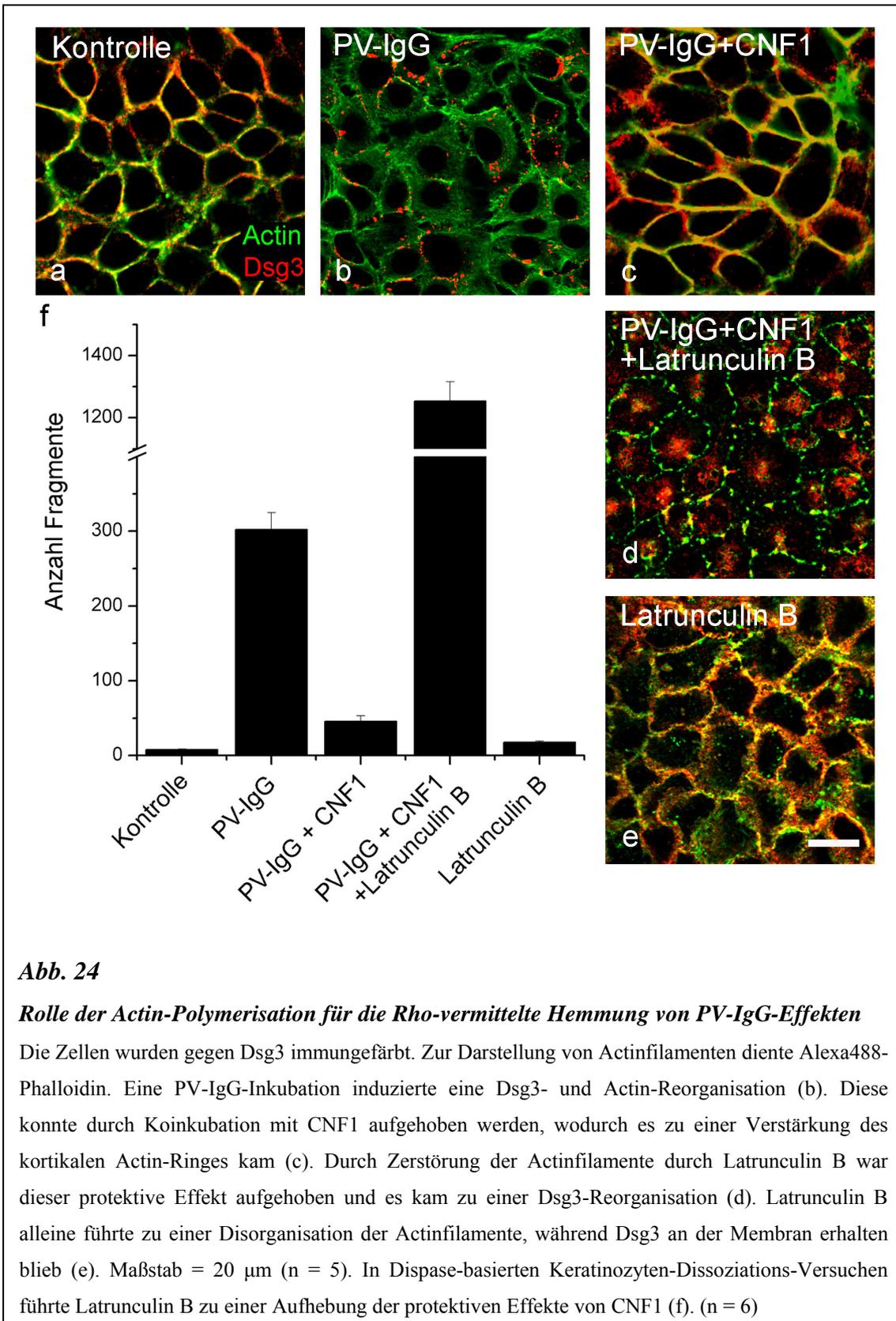


3.3.3 Actinabhängigkeit der RhoA-vermittelten Protektion bei PV

Die Versuche zur Actin-Modulation wiesen auf eine wichtige Rolle der Actinfilamente in der PV-Pathogenese hin. Um diese Hypothese weiter zu überprüfen, konzentrierten wir uns auf die Rolle der Rho-GTPasen. Diese wurden in früheren Studien als ein wichtiger Bestandteil von Signalwegen in der PV-Pathogenese identifiziert. So konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation mit PV-IgG zu einer Inhibition von RhoA führte, wohingegen eine RhoA-Aktivierung die PV-IgG-vermittelten Effekte aufheben konnte (Waschke et al. 2006). Aus diesem Grund wurden Zellen neben PV-IgG auch mit dem Rho-GTPasen-Aktivator CNF-1 inkubiert. Inkubation mit PV-IgG führte wie beschrieben zu einer Dsg3-Reorganisation und einer Actin-Reorganisation (Abb. 24b). Diese Vorgänge konnten durch Inkubation mit CNF-1 vermindert werden (Abb. 24c). Dabei war auffällig, dass es zu einer Stärkung des kortikalen Actin-Rings kam. Aus diesem Grunde wurde Latrunculin B, ein Inhibitor der Actin-Polymerisation, eingesetzt, um die Rolle von Actin für die Rho-vermittelte Hemmung der PV-IgG-induzierten Effekte weiter zu untersuchen. Koinkubation von PV-IgG, CNF-1 und Latrunculin B führte zu einer Aufhebung der CNF-1-vermittelten Hemmung der PV-IgG-Effekte, so dass sich eine deutliche Fragmentation und intrazelluläre Ansammlung des Dsg3-Immunsignals ausbildete (Abb. 24d). Inkubation mit Latrunculin B alleine führte zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Actinfilamente, während Dsg3 weitestgehend linear an der Membran lokalisiert blieb (Abb. 24e).

Um zu untersuchen, ob dies auch funktionelle Auswirkungen auf die Zell-Zell-Adhäsion hat, wurden Dispase-basierte Keratinozyten-Dissoziations-Versuche durchgeführt (Abb. 24f). In Abwesenheit von PV-IgG zeigte sich eine geringe Fragmentation (9 ± 1 Fragmente), welche durch Zugabe von PV-IgG signifikant gesteigert wurde (302 ± 23 , $p < 0,05$). Koinkubation mit PV-IgG und CNF-1 führte zu einer signifikanten Reduktion der Zell-Dissoziation (46 ± 7 Fragmente, $p < 0,05$). Diese protektiven Effekte von CNF-1 auf die PV-IgG-vermittelte Zell-Dissoziation konnte durch zusätzliche Inkubation mit Latrunculin B nicht nur gehemmt werden, sondern konnte den Effekt von PV-IgG sogar deutlich verstärken (1254 ± 64 , $p < 0,05$ im Vergleich zu Inkubation mit PV-IgG und CNF-1). Somit fand sich zusammenfassend eine Abhängigkeit der Rho-vermittelten Hemmung von PV-IgG-induzierten Effekten

von der Fähigkeit des Actin-Zytoskeletts, Filamente auszubilden. Dabei scheint insbesondere der kortikale Actin-Ring von Bedeutung zu sein.



4 Diskussion

Prozesse der zytoskelettalen Umorganisation wie die ZK-Retraktion und die Actin-Reorganisation sind als charakteristische Veränderungen von Zellen in Reaktion auf PV-IgG beschrieben (Wilgram et al. 1961; Berkowitz et al. 2005; Waschke et al. 2006). Dennoch war bisher unklar, welchen Stellenwert diese Prozesse im Rahmen der PV-Pathogenese innehaben. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Actin-Reorganisation eine wichtige Rolle für die PV-IgG induzierte Akantholyse spielt (Gliem et al. 2010). Die ZK-Retraktion hingegen scheint nicht direkt zur Dsg3-Reorganisation beizutragen, korrelierte aber eng mit der Zell-Dissoziation, so dass es möglich erscheint, dass sie diese unterstützt. Ein weiteres zentrales Ergebnis dieser Studie ist, dass die Menge an E-Cadherin eine Rolle für die Aktivierung intrazellulärer Signalwege wie der p38MAPK im Rahmen der PV-Pathogenese spielt. Dies ist ein wesentlicher Hinweis darauf, dass auch den klassischen Cadherinen eine wichtige Rolle im Rahmen der Pemphigus-Pathogenese zukommt.

4.1 E-Cadherin moduliert für die PV-Pathogenese wichtige intrazelluläre Signalwege

Die in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse unterstützen die Hypothese, dass intrazelluläre Signalwege eine wichtige Rolle in der PV-Pathogenese spielen. So konnte eine Beteiligung der p38MAPK an PV-IgG-induzierten Effekten wie der ZK-Retraktion und der Zell-Dissoziation gezeigt werden. Daneben konnte auch die Bedeutung der Rho-GTPasen für die desmosomale Haftung nochmals herausgestellt werden. In Form der Modulation des junktionalen Actin-Ringes wurde darüber hinaus auch ein möglicher Weg identifiziert, über welchen Rho-GTPasen die PV-Pathogenese protektiv beeinflussen können. Damit eröffnen sich auch neue Ansätze zur Erklärung der Blasenbildung in bestimmten Schichten der Epidermis bei Pemphigus, welche über die Desmoglein-Kompensationstheorie hinausgehen. So ist z.B. bekannt, dass differenzierte Aktivierungsmuster der Rho-GTPasen in verschiedenen Schichten der Epidermis eine wichtige Rolle für die Differenzierung von Keratinozyten im Laufe der Entwicklung vom Stratum basale bis hin zum Stratum corneum spielen (McMullan et al. 2003; Nikolova et al. 2008; Liebig et al. 2009; Lock et al. 2009). Daher könnte die

Blasenbildung in bestimmten Schichten der Epidermis in Reaktion auf PV-IgG auch auf einer differentiellen Beteiligung Rho-vermittelter intrazellulärer Signalwege an der Regulation der Zell-Zell-Haftung in den einzelnen Schichten der Epidermis basieren (Spindler et al. 2007).

Über den Mechanismus der Signaltransduktion herrscht jedoch weiterhin Unklarheit. Eine Hypothese sieht die Cadherine im Rahmen der PV-Pathogenese als Rezeptoren an, welche durch Bindung von Antikörpern zu einer Initiierung intrazellulärer Signalwege führen (Sharma et al. 2007). Diese würden dann sekundär unter anderem durch eine ZK-Retraktion zu einem Verlust der Zell-Zell-Adhäsion führen. Diese Hypothese liefert jedoch keine überzeugende Antwort dafür, warum die Überexpression von Dsg3 zu einer Hemmung der PV-IgG-vermittelten Effekte führt, wie kürzlich beschrieben wurde (Jennings et al. 2011). Vielmehr würde man gemäß dieser Hypothese erwarten, dass die Überexpression zu einer verstärkten Aktivierung der Signalkaskaden führt.

Eine alternative Erklärung liegt in der Hypothese der direkten Inhibition begründet. Durch die Antikörper-abhängige Blockade von Cadherinen würde deren Interaktion gestört, so dass es in der Folge zu einer Reduktion der Interaktion von Cadherinen an der Zellmembran käme. Dies wiederum könnte dann zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege führen (Müller et al. 2008). In Übereinstimmung dazu konnte in unseren Experimenten durch die selektive Inhibition der Dsg3-Transinteraktion durch AK23 eine p38MAPK-Aktivierung erzeugt werden, welche mit derjenigen nach PV-IgG-Inkubation vergleichbar war. Somit scheint der Inhibition der Transinteraktion desmosomaler Cadherine eine wichtige Rolle im Rahmen der PV-Pathogenese zuzukommen. Durch die initiierten Signalwege könnten dann weitere Prozesse wie die ZK-Retraktion oder eine Actin-Reorganisation eingeleitet werden.

In diesem Zusammenhang wird angenommen, dass insbesondere extra-desmosomale Desmogleine eine wichtige Rolle für die Initiierung intrazellulärer Signalkaskaden im Rahmen der PV-Pathogenese spielen könnten (Müller et al. 2008). Dies basiert auf der Beobachtung, dass diese in Reaktion auf PV-IgG als erste endozytiert und abgebaut werden (Aoyama et al. 1999; Sato et al. 2000; Williamson et al. 2006). Es wäre also denkbar, dass die PV-Antikörper als erste v.a. an nicht-desmosomale Desmogleine binden und deren Interaktion im Sinne einer sterischen Behinderung blockieren würden, ohne dabei wesentlichen Einfluss auf die Zell-Zell-Adhäsion auszuüben. Passend dazu

konnte in elektronenmikroskopischen Studien gezeigt werden, dass die epidermale Spaltbildung insbesondere zwischen den Desmosomen und nicht an den Desmosomen selbst beginnt (Takahashi et al. 1985; Bystryn et al. 2006). Durch die Blockade und den nachfolgenden Verlust der Bindung, könnte es dann zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege kommen. Die Zell-Zell-Adhäsion würde währenddessen über noch intakte Desmogleine in den Desmosomen gewährleistet, bis diese im weiteren Zeitverlauf auch deletiert werden würden.

Vor diesem Hintergrund ist es nicht verwunderlich, dass eine Überexpression von Dsg3 protektive Effekte auf die PV-IgG-vermittelten Effekte hat (Jennings et al. 2011). Unsere Beobachtung, dass eine E-Cadherin-Überexpression die PV-IgG-vermittelten Effekte hemmen kann, zeigt allerdings, dass auch den klassischen Cadherinen eine modulierende Funktion für die PV-Pathogenese zukommt. Es werden zwar nach wie vor die desmosomalen Cadherine und nicht die klassischen Cadherine als das primäre Ziel pathogener PV-Antikörper angesehen (Stanley et al. 2006). Es existieren jedoch Berichte über zahlreiche weitere pathogene Antikörper (Vu et al. 1998; Grando 2000; Nguyen et al. 2000; Nguyen et al. 2000; Marchenko et al. 2010), so dass es möglich erscheint, dass auch Antikörper gegen klassische Cadherine eine Rolle im Rahmen der PV-Pathogenese spielen. So konnte z.B. für gegen Dsg1-gerichtete Antikörper bereits eine Kreuzinteraktion mit E-Cadherin gezeigt werden (Evangelista et al. 2008).

Interessanterweise konnten jedoch in Übereinstimmung mit vorherigen Studien keine wesentlichen morphologischen Veränderungen der E-Cadherin-Verteilung in akantholytischen Zellen nachgewiesen werden (Calkins et al. 2006; Waschke et al. 2006; de Bruin et al. 2007; Jolly et al. 2010). Auf Grund dieser fehlenden morphologischer Veränderungen in Reaktion auf PV-IgG erscheint es unwahrscheinlich, dass die klassischen Cadherine primäres Ziel pathogener PV-Antikörper sind. Außerdem hemmte die E-Cadherin-Überexpression eine p38MAPK-Aktivierung, welche durch die selektive Blockade der Dsg3-Interaktion erzeugt wurde, in ähnlichem Maße wie die PV-IgG-induzierte. Demnach erscheint es unwahrscheinlich, dass für die protektiven Effekte einer E-Cadherin-Überexpression die direkte Antikörper-abhängige Blockade der E-Cadherin-Funktion eine wesentliche Rolle spielt.

Eine mögliche Erklärung für die protektive Rolle von E-Cadherin könnte daher in der Erhöhung der interzellulären Adhäsion liegen. Dies wiederum könnte die Bindung zwischen den desmosomalen Cadherinen stabilisieren, so dass in der Folge die Wirkung der PV-IgG-abhängigen sterischen Inhibition desmosomaler Cadherine auf die Zell-Zell-Adhäsion vermindern wäre. In der Folge würde es dann zu einer verminderten Aktivierung intrazellulärer Signalwege und somit einer Verminderung PV-IgG-vermittelter Effekte kommen. Allerdings widerspricht dem, dass die E-Cadherin-Überexpression keinen Einfluss auf die PV-IgG-induzierte Dsg3-Reorganisation hatte, während nachfolgende Prozesse wie die Zell-Dissoziation und die Aktivierung der p38MAPK gehemmt waren. Somit kann aus morphologischer Sicht kein Hinweis auf eine Stabilisierung desmosomaler Cadherine durch eine E-Cadherin-Überexpression festgestellt werden.

Eine weitere mögliche Erklärung liegt darin, dass insbesondere E-Cadherin als ein wichtiger Sensor der epithelialen Zell-Zell-Adhäsion angesehen wird, dessen Transinteraktionsverlust zu einer Aktivierung zahlreicher intrazellulärer Signalwege führen kann (Sharma et al. 2007; Müller et al. 2008). So erscheint es möglich, dass auch der Verlust der E-Cadherin-Transinteraktion direkt an der Signaltransduktion im Rahmen der PV-Pathogenese beteiligt ist. Folglich könnte eine E-Cadherin-Überexpression die E-Cadherin-Transinteraktion stabilisieren und es käme hierüber zu einer von der Dsg3-Reorganisation unabhängigen verminderten Aktivierung PV-IgG-abhängiger intrazellulärer Signalwege. Daran ist insbesondere bemerkenswert, dass eine Dsg3-Reorganisation alleine nicht ausreichend zu sein scheint, nachfolgende intrazelluläre Prozesse zu initiieren. Es ist also möglich, dass sowohl Dsg3 als auch E-Cadherin Signalwege wie z.B. die p38MAPK-Aktivierung unterdrücken, welche letztendlich zum Verlust der Zell-Adhäsion führen. In diesem Fall würde die Überexpression eines der beiden Cadherine protektiv sein.

4.2 Actinfilamente haben eine wichtige Rolle für die PV-Pathogenese

Ähnlich wie die ZK-Retraktion korrelierte auch die PV-IgG-induzierte Actin-Reorganisation eng mit anderen Kennzeichen akanttholytischer Zellen, wie der Dsg3-Reorganisation oder dem Verlust der Zell-Zell-Adhäsion. Dies deutet an, dass auch dem

Actin-Zytoskelett eine wichtige Rolle in der PV-Pathogenese zukommt. Dabei scheint insbesondere die Dynamik der Actinfilamente von Bedeutung zu sein, da sich in FRAP-Experimenten eine frühe Erhöhung der Motilität der Actinfilamente in Antwort auf PV-IgG-Inkubation zeigte. Weiterhin hatte eine gezielte pharmakologische Modulation der Actinfilament-Dynamik Einfluss auf die PV-IgG-vermittelten Effekte. So konnten sowohl die Dsg3-Reorganisation als auch die Zell-Dissoziation durch eine Hemmung der Actin-Polymerisation verstärkt werden, während eine Stabilisierung der Filamente die Effekte abschwächte. Diese Ergebnisse zeigen eine übergeordnete Rolle der Actin-Dynamik für zentrale Prozesse der PV-Pathogenese.

Dies wirft die Frage nach möglichen Verbindungen auf zwischen der PV-Pathogenese auf der einen und der Actin-Dynamik auf der anderen Seite. Eine potentiell wichtige Schnittstelle in diesem Zusammenhang stellen die Rho-GTPasen dar. Diese sind nicht nur wichtige Regulatoren der Actin-Dynamik (Lee et al. 2010), sondern wurden auch als wichtiger intrazellulärer Signalweg der PV-Pathogenese identifiziert. So fand sich eine Inaktivierung von RhoA nach einer Inkubation mit PV-IgG, während eine RhoA-Aktivierung die PV-IgG-Effekte effektiv hemmen konnte (Waschke et al. 2006). Weiterhin war in diesen Experimenten auch eine Verstärkung des Junctions-assoziierten Actin-Ringes aufgefallen. Dies führte zu der Hypothese, dass insbesondere der Junctions-assoziierte Actin-Ring eine wichtige Rolle für die Rho-vermittelten PV-IgG-Effekte haben könnte. Dies konnte dadurch bestätigt werden, dass die Inhibition der Actin-Polymerisation durch Latrunculin zu einer Aufhebung der CNF-1-vermittelten Hemmung der PV-IgG-Effekte führte. Dies legt den Schluss nahe, dass die RhoA-vermittelte Protektion gegen PV-IgG-induzierte Effekte zumindest teilweise über Actinfilamente vermittelt wird.

Dies deckt sich mit anderen Studien, welche zeigen, dass Rho-GTPasen wesentlich über das Actinfilament-System auf die Regulation der interzellulären Adhäsion einwirken (Braga et al. 1997; Braga et al. 1999). So konnte gezeigt werden, dass RhoA-Inhibition zu einer Reduktion von E-Cadherin an der Zellmembran über eine Erhöhung der Endozytose führt (Braga et al. 1997). Interessanterweise wurde dieser Effekt durch Inhibition der Actin-Polymerisation durch Latrunculin gehemmt (Izumi et al. 2004), so dass die Wirkung von RhoA auf Adhärens-Kontakte zumindest teilweise über das Actin-Zytoskelett vermittelt zu sein scheint. Allerdings ist nach wie vor unklar, über

welche Wege die Rho-GTPasen ihre Wirkung auf die Actinfilamente vermitteln. Eine nachvollziehbare Hypothese besagt, dass dies über die Beeinflussung Actin-bindender-Proteine ablaufen könnte. Als ein Beispiel für diesen Mechanismus wurde das Protein IQGAP-1 gefunden. Dieses kann zum einen an die Rho-GTPasen Rac1 und Cdc42, zum anderen aber auch an F-Actin binden, um dann dort eine Quervernetzung der Filamente auszulösen (Bashour et al. 1997).

Es stellt sich die Frage, wie die Actin-Dynamik an der PV-IgG-induzierten Dsg3-Reorganisation beteiligt sein könnte. Eine Möglichkeit ist, dass Actinfilamente Einfluss auf die Neubildung und Stabilität und damit den Umsatz von Desmosomen nehmen könnten. Dies würde die Hypothese unterstützen, dass PV-IgG-induzierte Effekte wesentlich auf einer Inbalance von Desmosomen-Bildung und -Abbau basieren (Kottke et al. 2006). In Übereinstimmung dazu wurde gefunden, dass der Dsg3-Gehalt an der Zellmembran und in der Zelle in Reaktion auf eine Inkubation mit PV-IgG abnimmt (Aoyama et al. 1999; Calkins et al. 2006; Yamamoto et al. 2007). Dieser als Dsg3-Depletion bezeichnete Mechanismus wird durch eine verstärkte Endozytose erklärt (Calkins et al. 2006). Allerdings zeigten sich in unseren Experimenten sowohl nach Inkubation mit PV-IgG als auch nach Actin-Modulation keine Veränderungen des Dsg3-Gehalts der Zelle. Es kann also davon ausgegangen werden, dass eine Depletion von Dsg3 unter unseren experimentellen Bedingungen keine wesentliche Rolle für die PV-Pathogenese spielte. Es ist jedoch auch zu berücksichtigen, dass PV-IgG zu einer reduzierten Neubildung von Desmosomen führen könnte (Mao et al. 2009). Demnach scheint auch eine beeinträchtigte Neubildung von Desmosomen ein Charakteristikum der PV-Pathogenese zu sein. Wie bereits oben beschrieben, ist die Bildung von Desmosomen ein hochgradig dynamischer Prozess, in dem das Actin-Zytoskelett eine wesentliche Rolle spielt. So wurde zunächst ein Einfluss der Actin-Depolymerisation auf die Verteilung der desmosomalen Proteine Dsg1 und Desmoplakin beobachtet (Pasdar et al. 1993). Dies wurde in weiteren Experimenten bestätigt, in denen die Inhibition der Actinpolymerisation durch Cytochalasin D ebenfalls zu einer Störung der Desmosomen-Neubildung führte (Godsel et al. 2005). Dementsprechend ist man momentan der Meinung, dass Actin insbesondere für die Translokation von Desmoplakin und ZK-Filamenten zur Zellmembran eine Rolle spielt, während der

Transport von desmosomalen Cadherinen über Mikrotubulus-assoziierten Transport ablaufen soll (Green et al. 2007).

Die Aufrechterhaltung und Neubildung von Desmosomen könnte jedoch auch durch Actin-vermittelte „Einzäunung“ von interzellulären Adhäsionsmolekülen beeinflusst werden. Es ist etabliert, dass Actinfilamente eine wichtige Rolle für die lokale Motilität membranassoziierter interzellulärer Adhäsionsproteine, wie z.B. E-Cadherin, haben (Edidin et al. 1991; Sako et al. 1998; Baumgartner et al. 2003). Diese vermitteln sie zum einen durch die direkte Bindung an die Cadherine. Zum anderen wirken sie aber auch auf nicht-zytoskelettal gebundene Cadherine ein, indem sie deren Mobilität in der Zytoplasmamembran einschränken und diese damit „einzäunen“. Durch diese Vorgänge ist deren laterale Diffusion vermindert, so dass es in diesen Bereichen zu Ansammlungen von Cadherinen kommt. Durch die so verminderte Motilität der Cadherine wird deren Bindungswahrscheinlichkeit mit anderen Cadherinen vergrößert, so dass es in der Folge zu einer Zunahme der interzellulären Adhäsion kommt (Baumgartner et al. 2003). Die Fähigkeit der Actinfilamente die Motilität von Dsg3 zu vermindern und zu Ansammlungen von Dsg3 zu führen, welche für die Bildung und Aufrechterhaltung von Desmosomen wichtig sein könnte, könnte im Rahmen der PV-Pathogenese gestört sein und darüber zu einer Abnahme der interzellulären Adhäsion führen. Zu diesem Konzept passend fand sich in unseren Experimenten zum einen eine erhöhte Actin-Motilität nach Inkubation mit PV-IgG in FRAP-Experimenten und zum anderen eine verstärkte Zell-Dissoziation nach Zerstörung der Actinfilamente. Im Gegenzug könnte eine Stabilisierung der Actinfilamente durch Jasplakinolid und eine Rho-GTPasen-vermittelte Verstärkung des kortikalen Actin-Netztes nach CNF1-Behandlung die Motilität der Desmogleine reduzieren und darüber zu einer Reduktion PV-IgG-vermittelter Effekte beitragen. Da die genaue Rolle der Motilität von Desmogleinen nach Inkubation mit PV-IgG und deren Abhängigkeit von Actinfilamenten momentan noch im Unklaren liegt, wären weitere Untersuchungen in diesem Zusammenhang von großem Interesse, um tiefere Einblicke in die PV-Pathogenese zu gewinnen.

Grundsätzlich ist auch möglich, dass die Actinfilamente die desmosomale Adhäsion über eine Beeinflussung der Adhärenskontakte und damit indirekt beeinflussen könnten (Sharma et al. 2007). Wie ausgeführt, ist dieser Ansatz interessant, da eine Überexpression von E-Cadherin die PV-IgG-vermittelten Effekte abschwächen konnte. Adhärenskontakte sind neben den Desmosomen die wichtigsten Vermittler interzellulärer Adhäsion, für deren Integrität Actinfilamente eine wichtige Rolle spielen. Entsprechend konnten Experimente zeigen, dass eine Inhibition der Actinpolymerisation zu einer Hemmung der Neubildung von Adhärenskontakten führt (Pasdar et al. 1993; Adams et al. 1998; Vasioukhin et al. 2000). Interessanterweise hatte dies auch eine Reduktion der Desmosomen an der Zellmembran zur Folge (Vasioukhin et al. 2000). Bezüglich der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten wird angenommen, dass Adhärenskontakte die ersten Strukturen sind, welche im Zusammenspiel mit Actinfilamenten reißverschlussartig die Zellmembranen benachbarter Zellen aktiv aneinanderbringen und dass es erst dann in der Folge zu einer Stabilisierung durch die Desmosomen kommt (Lewis et al. 1997; Vasioukhin et al. 2000). Es erscheint also insgesamt möglich, dass Actinfilamente auch über eine Beeinträchtigung der Adhärenskontakte indirekt Einfluss auf die desmosomale Adhäsion im Rahmen der PV-Pathogenese ausüben können.

Allerdings steht dem, wie oben beschrieben, entgegen, dass in unseren Experimenten sowohl nach PV-IgG-Inkubation als auch nach Actin-Modulation lediglich geringe morphologische Veränderungen der Verteilung von E-Cadherin beobachtet werden konnten. Dies ist in Einklang mit Befunden, welche berichten, dass Adhärenskontakte keine primären Ziele von PV-IgG-induzierten Mechanismen sind, da diese in akantholytischen Zellen nur wenig beeinträchtigt werden (Calkins et al. 2006; Waschke et al. 2006; de Bruin et al. 2007). Demnach erscheint die Actin-abhängige Modulation von Adhärenskontakten vermutlich kein zentraler Mechanismus der PV-Pathogenese zu sein.

4.3 Die ZK-Retraktion könnte im Rahmen der PV-Pathogenese zur Zell-Dissoziation beitragen

In den ersten Experimenten wurde der Beginn der akantholytischen Aktivität in Form der Dsg3-Reorganisation und der Zell-Dissoziation mit dem Beginn der ZK-Retraktion

korreliert, um auf diesem Wege eine Aussage bezüglich der Bedeutung der ZK-Filamente für die PV-Pathogenese ableiten zu können. In diesen Experimenten fand sich, dass die Dsg3-Reorganisation, die Zell-Dissoziation und die ZK-Retraktion frühe Ereignisse nach Zugabe von PV-IgG sind, welche sich in engem zeitlichem Zusammenhang zueinander entwickeln. Diese enge zeitliche Korrelation lässt einen kausalen Zusammenhang dieser Prozesse vermuten.

Um die Bedeutung der ZK-Filamente für die PV-Pathogenese näher zu beleuchten, wurde der Einfluss der p38MAPK auf die ZK-Retraktion untersucht. Die p38MAPK ist ein wichtiger intrazellulärer Signalweg, welcher über Phosphorylierungen Einfluss auf das ZK-Skelett ausüben kann (Ku et al. 2002; Woll et al. 2007). Eine Aktivierung dieser Kinase kann außer über PV-IgG auch unspezifisch durch verschiedenste Formen von Stress wie etwa Zytokine, Temperatur, osmotischer Schock (Garmyn et al. 2001; Cheng et al. 2002), Druck (Hofmann et al. 2004) oder den Verlust der Zell-Zell-Adhäsion (Rosen et al. 2002) ausgelöst werden. Dies führt in der Folge zu spezifischen Phosphorylierungen von ZK-Filamenten (Feng et al. 1999; Ku et al. 2002). Diese ZK-Phosphorylierungen werden daher als wichtiger Mechanismus der Zelle als Reaktion auf verschiedenste Formen von Stress angesehen (Liao et al. 1997; Ku et al. 1998; Caulin et al. 2000; Inada et al. 2001; Ridge et al. 2005; Ku et al. 2006; Pallari et al. 2006). und stellen einen wesentlichen Regulator des ZK-Zytoskeletts dar (Omary et al. 1998). Auch im Rahmen der PV-IgG-induzierten ZK-Retraktion fand sich eine Aktivierung der p38MAPK (Berkowitz et al. 2005; Berkowitz et al. 2006). Somit ist dieser intrazelluläre Signalweg eine interessante Schnittstelle zwischen der PV-Pathogenese auf der einen und den ZK-Filamenten auf der anderen Seite. Es stellte sich daher die Frage, ob die Aktivierung der p38MAPK möglicherweise wesentlich an der Ausbildung der PV-IgG-induzierten ZK-Retraktion beteiligt ist und welchen Stellenwert dies für die PV-Pathogenese hat.

In unseren Experimenten führte eine pharmakologische p38MAPK-Aktivierung durch Anisomycin zu einer ZK-Retraktion, welche vergleichbar zu derjenigen nach Inkubation mit PV-IgG war. Dies legt die Vermutung nahe, dass die PV-IgG-vermittelte ZK-Retraktion wesentlich durch eine Aktivierung der p38MAPK bedingt ist. Dies deckt sich mit Ergebnissen, bei denen die PV-IgG-induzierte ZK-Retraktion von einer Aktivierung der p38MAPK begleitet war, während eine Inhibierung der p38MAPK

neben weiteren PV-IgG-induzierten Veränderungen auch die ZK-Retraktion vermindern konnte (Berkowitz et al. 2005). Weiterhin führte die Aktivierung der p38MAPK zu einer Zell-Dissoziation, welche ebenfalls mit derjenigen nach PV-IgG-Inkubation vergleichbar war, während deren Hemmung die PV-IgG-induzierte Zell-Dissoziation hemmen konnte. Die p38MAPK scheint also eine wichtige Rolle für die PV-IgG-induzierte ZK-Retraktion und die Zell-Dissoziation zu haben. Interessanterweise konnte in unseren Experimenten eine pharmakologische Aktivierung der p38MAPK jedoch keine Dsg3-Reorganisation erzeugen. Passend zu diesem Ergebnis führte auch eine Inhibition der p38MAPK nur zu einer partiellen Blockade der Dsg3-Reorganisation. Aus dieser Beobachtung können zwei wesentliche Schlüsse gezogen werden. Zum einen ist die selektive Aktivierung des p38MAPK-Signalweges nicht ausreichend, eine Dsg3-Reorganisation zu erzeugen, so dass im Rahmen der PV-Pathogenese andere Mechanismen an der Dsg3-Reorganisation beteiligt sein müssen. Zum anderen ist bemerkenswert, dass eine ZK-Retraktion nicht zwangsläufig zu einer Veränderung der Dsg3-Verteilung an der Zellmembran führen muss, obwohl die Zell-Adhäsion in Keratinozyten-Dissoziations-Versuchen beeinträchtigt sein kann. Dies wirft die Frage auf, inwieweit die Anheftung der ZK-Filamente an die Desmosomen für die Integrität der Desmosomen und die Stabilität der Zell-Zell-Kontakte benötigt wird. Die Anheftung der ZK-Filamente an die Desmosomen über Desmoplakin hat vermutlich eine wichtige Bedeutung für die mechanische Stabilität der Epidermis. Demnach war sowohl in Experimenten mit Desmoplakin-defizienten Mäusen (Vasioukhin et al. 2001), als auch mit Zellen, welche ein Desmoplakin exprimierten, das ZK-Filamente nicht binden konnte (Huen et al. 2002), die Resistenz gegenüber mechanischem Stress reduziert. Die Bedeutung der Anheftung von ZK-Filamenten an die Desmosomen für deren Integrität ist hingegen weniger klar. Zum einen gibt es Experimente, bei denen eine durch Desmoplakin-Defizienz erzeugte Retraktion der ZK-Filamente von der Zellmembran nicht nur die mechanische Resistenz der Zellen reduzierte, sondern auch die Organisation und Anzahl der Desmosomen nachhaltig beeinträchtigte (Gallicano et al. 1998; Vasioukhin et al. 2001). Es gibt aber auch Experimente mit Desmoplakin-defizienten Mäusen (Vasioukhin et al. 2001) und anderen Zellen, deren Desmoplakin Keratine nicht binden konnte (Bornslaeger et al. 1996; Huen et al. 2002), welche darauf hindeuten, dass die Loslösung der ZK-Filamente von den Desmosomen keinen Einfluss

auf die Anzahl der Desmosomen in der Epidermis hat, sondern lediglich deren Funktion stören kann. Dies zeigen auch Experimente mit embryonalen Stammzellen von ZK-defizienten Mäusen, welche trotz gestörtem ZK-Zytoskelett eine normale Bildung von Desmosomen zeigen (Baribault et al. 1991). Somit erscheint es auch im Hinblick auf unsere Ergebnisse wahrscheinlich, dass die Anheftung der ZK-Filamente an die Desmosomen wichtig für die mechanische Stabilität der Desmosomen und folglich für die Zell-Zell-Haftung ist, wohingegen die Bedeutung für die Integrität und die Anzahl der Desmosomen vermutlich gering ist. In Bezug auf die PV-Pathogenese bedeutet dies, dass die p38MAPK-vermittelte ZK-Retraktion vermutlich ein wichtiger Mechanismus für den Verlust der Zell-Zell-Adhäsion darstellt, während für die Dsg3-Reorganisation weitere Mechanismen benötigt werden.

Darüber hinaus ist die Beobachtung, dass sich die ZK-Retraktion unabhängig von der Dsg3-Reorganisation ausbilden kann, auch deswegen von Interesse, da man früher davon ausging, dass die ZK-Retraktion sich passiv als sekundäre Folge aus dem Verlust von Desmosomen und dem daraus resultierenden Mangel an Fixpunkten für ZKs an der Membran entwickelt (Lever et al. 1969). Die Ergebnisse dieser Arbeit legen hingegen eine Regulation der ZK-Retraktion über intrazelluläre Signalwege nahe, welche sich unabhängig von der Dsg3-Reorganisation entwickeln kann. Die Ergebnisse stehen in diesem Punkt in Einklang mit der „Basal Cell Shrinkage“-Hypothese (Bystryn et al. 2006; Bystryn et al. 2009). Diese misst der ZK-Retraktion eine wichtige Rolle für die PV-IgG-induzierte Zell-Dissoziation zu, ohne dass dies jedoch experimentell belegt werden konnte. Die Spaltung der Desmosomen hingegen wird lediglich als sekundäre Folge zytoskelettaler Prozesse angesehen, welche zu einer Schrumpfung der Zelle führen. Diese Hypothese fußt u.a. auf elektronenmikroskopischen Studien. Diese zeigen, dass sich die PV-IgG-induzierte interzelluläre Spaltbildung vor allem zwischen den Desmosomen durch eine Schrumpfung der Zelle ausbildet, während die Desmosomen lange aneinander haften bleiben (Wilgram et al. 1961; Hashimoto et al. 1967; Hashimoto et al. 1967; Sams et al. 1982; Sharma et al. 2007). Weitere Unterstützung der „Basal Cell Shrinkage“-Hypothese stammt aus neueren ultrastrukturellen Studien, in welchen eine Spaltung der Desmosomen erst nach einer Lösung der ZK-Filamente von den Desmosomen beobachtet wurde (Diercks et al. 2009). Im Rahmen der „Basal Cell Shrinkage“-Hypothese wird auch ein neuer Ansatz

zur Erklärung der basalen Spaltbildung der Epidermis bei PV angeführt, welcher auf den differentiellen Keratin-Paaren in verschiedenen Schichten der Epidermis beruht. So ist, wie bereits erwähnt, in der basalen Epidermis das ZK-Paar 5/14 vorherrschend, während in den darüber liegenden Schichten vor allem das ZK 1 und ZK 10 zu finden ist (Boyce et al. 1983). Durch das unterschiedliche Verhalten verschiedener Keratine gegenüber PV-IgG könnte es nun vor allem in den basalen Zellen zu einer Schrumpfung der Zellen mit anschließender Spaltbildung kommen.

Entsprechend den Ergebnissen dieser Arbeit scheint die ZK-Retraktion eine wichtige Funktion für die PV-IgG-induzierte Zell-Dissoziation zu haben. Dies warf die Frage auf, ob die ZK-Retraktion gar das primäre Ereignis in der PV-Pathogenese darstellt, welches dann nachfolgend zu einer Fragmentation der Desmosomen und einem Verlust der Zell-Adhäsion führt, wie es in der „Basal Cell Shrinkage“-Hypothese vorgeschlagen wurde (Bystryn et al. 2006; Bystryn et al. 2009). Allerdings steht dem entgegen, dass in unseren Untersuchungen eine p38MAPK-Aktivierung zwar zu einer ZK-Retraktion führte, dies aber keine Auswirkungen auf die Dsg3-Verteilung an der Membran hatte, wie man es gemäß der „Basal Cell shrinkage“-Hypothese erwarten würde. Alternativ existiert die klassische Auffassung, dass den interzellulären Adhäsionsmolekülen als primäres Ziel pathogener Antikörper eine übergeordnete Rolle für die PV-Pathogenese zukommt, welche dann in der Folge zu einer ZK-Retraktion und einem Verlust der Zell-Adhäsion führen können (Hashimoto et al. 1967; Lever et al. 1969). Es ist bekannt, dass eine Dsg3-Überexpression nachfolgende PV-IgG-induzierte Effekte hemmen kann (Jennings et al. 2011). Außerdem zeigten in unseren Experimenten E-Cadherin-überexprimierenden Zellen eine Hemmung sowohl der Zell-Dissoziation als auch der ZK-Retraktion. Somit scheint Prozessen an den Cadherinen eine übergeordnete Rolle in der Vermittlung der PV-Pathogenese zuzukommen, welche dann erst nachfolgend zu einer ZK-Retraktion und dem Verlust der Zell-Zell-Adhäsion führen. Die Ergebnisse dieser Studie lassen es somit als unwahrscheinlich erscheinen, dass eine ZK-Retraktion ein primäres Ereignis der PV-Pathogenese ist, welches nachfolgend zu einer Spaltung der Desmosomen führen kann und widersprechen somit in diesem Punkt der „Basal Cell Shrinkage“-Hypothese.

Zusammenfassend lässt sich anhand dieser Ergebnisse folgendes Bild der PV-Pathogenese entwerfen. Zunächst kommt es durch die Antikörper zu einer Störung der

Transinteraktion von Cadherinen an der Zellmembran, welche unter anderem in der Reorganisation von Dsg3 ihren Ausdruck findet und zu einer Aktivierung intrazellulärer Signalwege wie z.B. der p38MAPK führt. Nachfolgend kommt es zu einer ZK-Retraktion, welche dann zu einer mechanischen Instabilität der Zelle führt. Dadurch kommt es zu einem zunehmenden Verlust der Zell-Zell-Adhäsion und somit letztendlich zur Akantholyse der Zellen und Blasenbildung.

4.4 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen eine wichtige Rolle des Zytoskeletts für die PV-Pathogenese. Zytoskelettale Reorganisationen im Rahmen dieser Erkrankung erscheinen nicht, wie früher angenommen, als sekundäre Ereignisse, sondern tragen selbst aktiv zum Zelladhäsionsverlust bei. Insbesondere der Junctions-assoziierte Actin-Ring scheint eine wichtige Rolle für zentrale Prozesse der Akantholyse zu spielen. Allerdings ist der genaue Mechanismus, über den Actinfilamente in die PV-Pathogenese eingreifen, nach wie vor unklar. Dabei erscheint vor allem die Frage interessant, über welche Wege Actin an der Modulation desmosomaler Adhäsion beteiligt sein könnte. Bisher war man der Auffassung, dass nur ZK-Filamente direkt an Desmosomen binden würden. Doch es erscheint vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse auch möglich, dass Actinfilamente nicht nur indirekt, sondern auch durch eine direkte Verbindung zu den desmosomalen Cadherinen Einfluss auf die Desmosomen nehmen können. Weiterhin könnte insbesondere die Untersuchung der Rolle der Actinfilamente für die Motilität extra-desmosomaler Desmogleine neue Einblicke in die PV-Pathogenese und die Regulation desmosomaler Adhäsion liefern. Bezüglich der ZK-Retraktion stellte sich heraus, dass diese im Rahmen der PV-Pathogenese eng mit dem Verlust der interzellulären Adhäsion korreliert. Aus diesem Grunde wäre es aufschlussreich, den genauen Mechanismus der ZK-Retraktion und deren Zusammenhang mit der interzellulären Adhäsion und der Integrität der Desmosomen näher zu untersuchen. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit ergibt sich eine Neubewertung des Zytoskeletts weg von einer passiven statischen hin zu einer dynamischen aktiven Rolle für die PV-Pathogenese. Aus diesem Grunde scheint eine weitere Untersuchung des Zytoskeletts sinnvoll, nicht nur, um neue Therapieansätze zu entwickeln, sondern auch, um die

zytoskelettale Interaktion untereinander und deren Bedeutung für die zelluläre Adhäsion besser zu verstehen.

Weiterhin betonen unsere Ergebnisse, dass neben den desmosomalen auch die klassischen Cadherine eine wichtige Rolle im Rahmen der PV-Pathogenese innehaben. Dabei scheint insbesondere der Verlust der Transinteraktion von Cadherinen zu einer Modulation intrazellulärer Signalwege zu führen. Dennoch sind sowohl die Prozesse, welche zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden führen, als auch die Effektoren, welche die Signale unter anderem an das Zytoskelett vermitteln, noch weitgehend unbekannt. Somit sollte es das Ziel weiterer Forschung sein, die enge Interaktion zwischen Cadherinen auf der einen und intrazellulären Signalwegen auf der anderen Seite weiter zu entschlüsseln, um damit eine möglichst umfassende Erklärung der PV-Pathogenese zu erhalten und somit dem Ziel einer spezifischeren Therapie mit geringeren Nebenwirkungen näher zu kommen.

5 Zusammenfassung

Pemphigus vulgaris (PV) ist eine blasenbildende Autoimmunerkrankung der Haut. Ein wesentliches Charakteristikum der Erkrankung sind Autoantikörper, welche gegen die humanen Zell-Adhäsionsmoleküle Desmoglein (Dsg) 3 und 1 gerichtet sind und zu zunehmender Zell-Dissoziation der Keratinozyten führen (Akantholyse). Neben der Dsg3-Reorganisation sind zytoskelettale Veränderungen in Form einer ZK-Retraktion und einer Reorganisation des Actin-Zytoskeletts als ein wichtiges Merkmal akantholytischer Zellen beschrieben worden. Dennoch ist der zeitliche Verlauf und die funktionelle Relevanz dieser zytoskelettalen Veränderungen im Vergleich zu anderen Prozessen, wie der Dsg3-Reorganisation oder der Zell-Dissoziation, unklar. In dieser Arbeit wurde daher die Rolle der ZK-Filamente und der Actinfilamente für die PV-Pathogenese untersucht. Inkubation von kultivierten Keratinozyten mit PV-IgG resultierte in einer ZK-Retraktion, welche eng mit dem Beginn der Dsg3-Reorganisation und der Zell-Dissoziation korrelierte. Weiterhin fand sich eine Abhängigkeit der PV-IgG-induzierten ZK-Retraktion und der Zell-Dissoziation von der p38MAPK-Signalkaskade, während die Beteiligung der p38MAPK an der Dsg3-Reorganisation von untergeordneter Rolle zu sein scheint. Übereinstimmend dazu führte eine Überexpression von E-Cadherin zu einer Hemmung der p38MAPK-Aktivierung, der ZK-Retraktion und der Zell-Dissoziation, so dass den Cadherinen eine übergeordnete Rolle in der Vermittlung der PV-Pathogenese zuzukommen scheint. Neben einer ZK-Retraktion zeigten die Zellen als Reaktion auf eine Inkubation mit PV-IgG auch wesentliche Reorganisationen der Actinfilamente, welche ebenfalls eng mit der Dsg3-Reorganisation und der Zell-Dissoziation korrelierten. Darüber hinaus interferierte die pharmakologische Modulation des Actin-Zytoskeletts mit den PV-IgG-Effekten. So führte eine Stabilisierung der Actinfilamente zu einer Reduktion sowohl der Dsg3-Reorganisation als auch der Zell-Dissoziation, während eine Zerstörung der Filamente die Effekte verstärkte. Zur Unterstützung dieser Ergebnisse wurde die Rolle des Actins für die durch Rho-GTPasen vermittelte Hemmung von PV-IgG-Effekten untersucht. Eine Aktivierung der Rho-GTPasen führte neben einer Hemmung PV-IgG-vermittelter Effekte auch zu einer Verstärkung des kortikalen Actin-Rings, während eine Hemmung

der Actin-Polymerisation die protektiven Effekte der Rho-GTPasen-Aktivierung aufheben konnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit eine übergeordnete Rolle sowohl der desmosomalen als auch der klassischen Cadherine für die PV-Pathogenese zeigen. Daneben scheint auch der Actin-Reorganisation eine wesentliche Position zuzukommen. Die ZK-Retraktion hingegen scheint, zumindest im Bezug auf die Dsg3-Reorganisation, sekundär zu sein, trägt aber möglicherweise im Anschluss an eine p38MAPK-Aktivierung wesentlich zum Verlust der Zell-Zell-Adhäsion bei.

6 Literaturverzeichnis

- Adams, C. L., Y. T. Chen, S. J. Smith und W. J. Nelson** (1998). "Mechanisms of epithelial cell-cell adhesion and cell compaction revealed by high-resolution tracking of E-cadherin-green fluorescent protein." *J Cell Biol* 142(4): 1105-19.
- Allen, E., Q. C. Yu und E. Fuchs** (1996). "Mice expressing a mutant desmosomal cadherin exhibit abnormalities in desmosomes, proliferation, and epidermal differentiation." *J Cell Biol* 133(6): 1367-82.
- Amagai, M.** (1994). "Autoantibodies against cell adhesion molecules in pemphigus." *J Dermatol* 21(11): 833-7.
- Amagai, M., A. R. Ahmed, Y. Kitajima, J. C. Bystryn, Y. Milner, R. Gniadecki, M. Hertl, C. Pincelli, H. Kurzen, M. Fridkis-Hareli et al.** (2006). "Are desmoglein autoantibodies essential for the immunopathogenesis of pemphigus vulgaris, or just "witnesses of disease"?" *Exp Dermatol* 15(10): 815-31.
- Amagai, M., S. Karpati, V. Klaus-Kovtun, M. C. Udey und J. R. Stanley** (1994). "Extracellular domain of pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) mediates weak homophilic adhesion." *J Invest Dermatol* 103(4): 609-15.
- Amagai, M., K. Tsunoda, D. Zillikens, T. Nagai und T. Nishikawa** (1999). "The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile." *J Am Acad Dermatol* 40(2 Pt 1): 167-70.
- Angres, B., A. Barth und W. J. Nelson** (1996). "Mechanism for transition from initial to stable cell-cell adhesion: kinetic analysis of E-cadherin-mediated adhesion using a quantitative adhesion assay." *J Cell Biol* 134(2): 549-57.
- Aoki, V., M. H. Huang, A. M. Perigo, L. M. Fukumori, C. W. Maruta, C. G. Santi, Z. N. Oliveira und E. Rivitti** (2004). "Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) and pemphigus vulgaris: immunoglobulin G heterogeneity detected by indirect immunofluorescence." *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 59(5): 251-6.
- Aoki, V., R. C. Millikan, E. A. Rivitti, G. Hans-Filho, D. P. Eaton, S. J. Warren, N. Li, J. Hilario-Vargas, R. G. Hoffmann und L. A. Diaz** (2004). "Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem)." *J Invest Dermatol Symp Proc* 9(1): 34-40.
- Aoyama, Y. und Y. Kitajima** (1999). "Pemphigus vulgaris-IgG causes a rapid depletion of desmoglein 3 (Dsg3) from the Triton X-100 soluble pools, leading to the formation of Dsg3-depleted desmosomes in a human squamous carcinoma cell line, DJM-1 cells." *J Invest Dermatol* 112(1): 67-71.
- Baribault, H. und R. G. Oshima** (1991). "Polarized and functional epithelia can form after the targeted inactivation of both mouse keratin 8 alleles." *J Cell Biol* 115(6): 1675-84.
- Bashour, A. M., A. T. Fullerton, M. J. Hart und G. S. Bloom** (1997). "IQGAP1, a Rac- and Cdc42-binding protein, directly binds and cross-links microfilaments." *J Cell Biol* 137(7): 1555-66.
- Bass-Zubek, A. E., L. M. Godsel, M. Delmar und K. J. Green** (2009). "Plakophilins: multifunctional scaffolds for adhesion and signaling." *Curr Opin Cell Biol* 21(5): 708-16.
- Bass-Zubek, A. E., R. P. Hobbs, E. V. Amargo, N. J. Garcia, S. N. Hsieh, X. Chen, J. K. Wahl, 3rd, M. F. Denning und K. J. Green** (2008). "Plakophilin 2: a

- critical scaffold for PKC alpha that regulates intercellular junction assembly." *J Cell Biol* 181(4): 605-13.
- Baumgartner, W., G. J. Schutz, J. Wiegand, N. Golenhofen und D. Drenckhahn** (2003). "Cadherin function probed by laser tweezer and single molecule fluorescence in vascular endothelial cells." *J Cell Sci* 116(Pt 6): 1001-11.
- Berkowitz, P., L. A. Diaz, R. P. Hall und D. S. Rubenstein** (2008). "Induction of p38MAPK and HSP27 phosphorylation in pemphigus patient skin." *J Invest Dermatol* 128(3): 738-40.
- Berkowitz, P., P. Hu, Z. Liu, L. A. Diaz, J. J. Enghild, M. P. Chua und D. S. Rubenstein** (2005). "Desmosome signaling. Inhibition of p38MAPK prevents pemphigus vulgaris IgG-induced cytoskeleton reorganization." *J Biol Chem* 280(25): 23778-84.
- Berkowitz, P., P. Hu, S. Warren, Z. Liu, L. A. Diaz und D. S. Rubenstein** (2006). "p38MAPK inhibition prevents disease in pemphigus vulgaris mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(34): 12855-60.
- Bornslaeger, E. A., C. M. Corcoran, T. S. Stappenbeck und K. J. Green** (1996). "Breaking the connection: displacement of the desmosomal plaque protein desmoplakin from cell-cell interfaces disrupts anchorage of intermediate filament bundles and alters intercellular junction assembly." *J Cell Biol* 134(4): 985-1001.
- Boukamp, P., R. T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham und N. E. Fusenig** (1988). "Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line." *J Cell Biol* 106(3): 761-71.
- Boyce, S. T. und R. G. Ham** (1983). "Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture." *J Invest Dermatol* 81(1 Suppl): 33s-40s.
- Braga, V. M., A. Del Maschio, L. Machesky und E. Dejana** (1999). "Regulation of cadherin function by Rho and Rac: modulation by junction maturation and cellular context." *Mol Biol Cell* 10(1): 9-22.
- Braga, V. M., L. M. Machesky, A. Hall und N. A. Hotchin** (1997). "The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts." *J Cell Biol* 137(6): 1421-31.
- Brennan, D., Y. Hu, S. Joubeh, Y. W. Choi, D. Whitaker-Menezes, T. O'Brien, J. Uitto, U. Rodeck und M. G. Mahoney** (2007). "Suprabasal Dsg2 expression in transgenic mouse skin confers a hyperproliferative and apoptosis-resistant phenotype to keratinocytes." *J Cell Sci* 120(Pt 5): 758-71.
- Brown, S. S. und J. A. Spudich** (1979). "Cytochalasin inhibits the rate of elongation of actin filament fragments." *J Cell Biol* 83(3): 657-62.
- Bubb, M. R., A. M. Senderowicz, E. A. Sausville, K. L. Duncan und E. D. Korn** (1994). "Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin." *J Biol Chem* 269(21): 14869-71.
- Bystryń, J. C.** (2002). "How should pemphigus be treated?" *J Eur Acad Dermatol Venereol* 16(6): 562-3.
- Bystryń, J. C. und S. Grandó** (2009). "The cause of acantholysis in pemphigus: further support for the 'basal cell shrinkage' hypothesis." *Br J Dermatol*.

- Bystryn, J. C. und S. A. Grando** (2006). "A novel explanation for acantholysis in pemphigus vulgaris: the basal cell shrinkage hypothesis." *J Am Acad Dermatol* 54(3): 513-6.
- Bystryn, J. C. und J. L. Rudolph** (2005). "Pemphigus." *Lancet* 366(9479): 61-73.
- Caldelari, R., A. de Bruin, D. Baumann, M. M. Suter, C. Bierkamp, V. Balmer und E. Muller** (2001). "A central role for the armadillo protein plakoglobin in the autoimmune disease pemphigus vulgaris." *J Cell Biol* 153(4): 823-34.
- Calkins, C. C., S. V. Setzer, J. M. Jennings, S. Summers, K. Tsunoda, M. Amagai und A. P. Kowalczyk** (2006). "Desmoglein endocytosis and desmosome disassembly are coordinated responses to pemphigus autoantibodies." *J Biol Chem* 281(11): 7623-34.
- Campbell, J. J. und M. M. Knight** (2007). "An improved confocal FRAP technique for the measurement of long-term actin dynamics in individual stress fibers." *Microsc Res Tech* 70(12): 1034-40.
- Campellone, K. G. und M. D. Welch** (2010). "A nucleator arms race: cellular control of actin assembly." *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(4): 237-51.
- Carlier, M. F., V. Laurent, J. Santolini, R. Melki, D. Didry, G. X. Xia, Y. Hong, N. H. Chua und D. Pantaloni** (1997). "Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility." *J Cell Biol* 136(6): 1307-22.
- Casella, J. F., M. D. Flanagan und S. Lin** (1981). "Cytochalasin D inhibits actin polymerization and induces depolymerization of actin filaments formed during platelet shape change." *Nature* 293(5830): 302-5.
- Caulin, C., C. F. Ware, T. M. Magin und R. G. Oshima** (2000). "Keratin-dependent, epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis." *J Cell Biol* 149(1): 17-22.
- Chan, A. Y., M. Bailly, N. Zebda, J. E. Segall und J. S. Condeelis** (2000). "Role of cofilin in epidermal growth factor-stimulated actin polymerization and lamellipod protrusion." *J Cell Biol* 148(3): 531-42.
- Chang, L. und R. D. Goldman** (2004). "Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk." *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(8): 601-13.
- Cheng, H., J. Kartenbeck, K. Kabsch, X. Mao, M. Marques und A. Alonso** (2002). "Stress kinase p38 mediates EGFR transactivation by hyperosmolar concentrations of sorbitol." *J Cell Physiol* 192(2): 234-43.
- Chernyavsky, A. I., J. Arredondo, Y. Kitajima, M. Sato-Nagai und S. A. Grando** (2007). "Desmoglein versus non-desmoglein signaling in pemphigus acantholysis: characterization of novel signaling pathways downstream of pemphigus vulgaris antigens." *J Biol Chem* 282(18): 13804-12.
- Chidgey, M., C. Brakebusch, E. Gustafsson, A. Cruchley, C. Hail, S. Kirk, A. Merritt, A. North, C. Tselepis, J. Hewitt et al.** (2001). "Mice lacking desmocollin 1 show epidermal fragility accompanied by barrier defects and abnormal differentiation." *J Cell Biol* 155(5): 821-32.
- Chidgey, M. A., K. K. Yue, S. Gould, C. Byrne und D. R. Garrod** (1997). "Changing pattern of desmocollin 3 expression accompanies epidermal organisation during skin development." *Dev Dyn* 210(3): 315-27.
- Chitaev, N. A., A. Z. Averbakh, R. B. Troyanovsky und S. M. Troyanovsky** (1998). "Molecular organization of the desmoglein-plakoglobin complex." *J Cell Sci* 111 (Pt 14): 1941-9.

- Cirillo, N., A. Lanza und S. S. Prime** (2010). "Induction of hyper-adhesion attenuates autoimmune-induced keratinocyte cell-cell detachment and processing of adhesion molecules via mechanisms that involve PKC." *Exp Cell Res* 316(4): 580-92.
- Coue, M., S. L. Brenner, I. Spector und E. D. Korn** (1987). "Inhibition of actin polymerization by latrunculin A." *FEBS Lett* 213(2): 316-8.
- de Bruin, A., R. Caldelari, L. Williamson, M. M. Suter, T. Hunziker, M. Wyder und E. J. Muller** (2007). "Plakoglobin-dependent disruption of the desmosomal plaque in pemphigus vulgaris." *Exp Dermatol* 16(6): 468-75.
- DePianto, D. und P. A. Coulombe** (2004). "Intermediate filaments and tissue repair." *Exp Cell Res* 301(1): 68-76.
- Diaz, L. A., L. A. Arteaga, J. Hilario-Vargas, J. G. Valenzuela, N. Li, S. Warren, V. Aoki, G. Hans-Filho, D. Eaton, V. dos Santos et al.** (2004). "Anti-desmoglein-1 antibodies in onchocerciasis, leishmaniasis and Chagas disease suggest a possible etiological link to Fogo selvagem." *J Invest Dermatol* 123(6): 1045-51.
- Diercks, G. F., H. H. Pas und M. F. Jonkman** (2009). "The ultrastructure of acantholysis in pemphigus vulgaris." *Br J Dermatol* 160(2): 460-1.
- Ding, X., V. Aoki, J. M. Mascaró, Jr., A. Lopez-Swidorski, L. A. Diaz und J. A. Fairley** (1997). "Mucosal and mucocutaneous (generalized) pemphigus vulgaris show distinct autoantibody profiles." *J Invest Dermatol* 109(4): 592-6.
- Drenckhahn, D.** (2008). Benninghoff Drenckhahn, Anatomie. makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie ; Band 1. München, Elsevier, Urban & Fischer.
- Edidin, M., S. C. Kuo und M. P. Sheetz** (1991). "Lateral movements of membrane glycoproteins restricted by dynamic cytoplasmic barriers." *Science* 254(5036): 1379-82.
- Elias, P. M., N. Matsuyoshi, H. Wu, C. Lin, Z. H. Wang, B. E. Brown und J. R. Stanley** (2001). "Desmoglein isoform distribution affects stratum corneum structure and function." *J Cell Biol* 153(2): 243-9.
- Eshkind, L., Q. Tian, A. Schmidt, W. W. Franke, R. Windoffer und R. E. Leube** (2002). "Loss of desmoglein 2 suggests essential functions for early embryonic development and proliferation of embryonal stem cells." *Eur J Cell Biol* 81(11): 592-8.
- Evangelista, F., D. A. Dasher, L. A. Diaz, P. S. Prisanh und N. Li** (2008). "E-cadherin is an additional immunological target for pemphigus autoantibodies." *J Invest Dermatol* 128(7): 1710-8.
- Feng, L., X. Zhou, J. Liao und M. B. Omary** (1999). "Pervanadate-mediated tyrosine phosphorylation of keratins 8 and 19 via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway." *J Cell Sci* 112 (Pt 13): 2081-90.
- Franke, W. W.** (2009). "Discovering the molecular components of intercellular junctions--a historical view." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1(3): a003061.
- Franklin-Tong, V. E. und C. W. Gourelay** (2008). "A role for actin in regulating apoptosis/programmed cell death: evidence spanning yeast, plants and animals." *Biochem J* 413(3): 389-404.
- Frusic-Zlotkin, M., D. Raichenberg, X. Wang, M. David, B. Michel und Y. Milner** (2006). "Apoptotic mechanism in pemphigus autoimmunoglobulins-induced

- acantholysis--possible involvement of the EGF receptor." *Autoimmunity* 39(7): 563-75.
- Fuchs, E.** (1994). "Intermediate filaments and disease: mutations that cripple cell strength." *J Cell Biol* 125(3): 511-6.
- Fuchs, E. und S. Raghavan** (2002). "Getting under the skin of epidermal morphogenesis." *Nat Rev Genet* 3(3): 199-209.
- Futei, Y., M. Amagai, M. Sekiguchi, K. Nishifuji, Y. Fujii und T. Nishikawa** (2000). "Use of domain-swapped molecules for conformational epitope mapping of desmoglein 3 in pemphigus vulgaris." *J Invest Dermatol* 115(5): 829-34.
- Galletta, B. J. und J. A. Cooper** (2009). "Actin and endocytosis: mechanisms and phylogeny." *Curr Opin Cell Biol* 21(1): 20-7.
- Gallicano, G. I., P. Kouklis, C. Bauer, M. Yin, V. Vasioukhin, L. Degenstein und E. Fuchs** (1998). "Desmoplakin is required early in development for assembly of desmosomes and cytoskeletal linkage." *J Cell Biol* 143(7): 2009-22.
- Garmyn, M., T. Mammine, A. Pupe, D. Gan, L. Declercq und D. Maes** (2001). "Human keratinocytes respond to osmotic stress by p38 map kinase regulated induction of HSP70 and HSP27." *J Invest Dermatol* 117(5): 1290-5.
- Garrod, D.** (2010). "Desmosomes in vivo." *Dermatol Res Pract* 2010: 212439.
- Garrod, D. R.** (1996). "Epithelial development and differentiation: the role of desmosomes. The Watson Smith Lecture 1996." *J R Coll Physicians Lond* 30(4): 366-73.
- Garrod, D. R., A. J. Merritt und Z. Nie** (2002). "Desmosomal cadherins." *Curr Opin Cell Biol* 14(5): 537-45.
- Gliem, M., W. M. Heupel, V. Spindler, G. S. Harms und J. Waschke** (2010). "Actin reorganization contributes to loss of cell adhesion in pemphigus vulgaris." *Am J Physiol Cell Physiol* 299(3): C606-13.
- Gloushankova, N. A., T. Wakatsuki, R. B. Troyanovsky, E. Elson und S. M. Troyanovsky** (2003). "Continual assembly of desmosomes within stable intercellular contacts of epithelial A-431 cells." *Cell Tissue Res* 314(3): 399-410.
- Godsel, L. M., R. P. Hobbs und K. J. Green** (2008). "Intermediate filament assembly: dynamics to disease." *Trends Cell Biol* 18(1): 28-37.
- Godsel, L. M., S. N. Hsieh, E. V. Amargo, A. E. Bass, L. T. Pascoe-McGillicuddy, A. C. Huen, M. E. Thorne, C. A. Gaudry, J. K. Park, K. Myung et al.** (2005). "Desmoplakin assembly dynamics in four dimensions: multiple phases differentially regulated by intermediate filaments and actin." *J Cell Biol* 171(6): 1045-59.
- Grando, S. A.** (2000). "Autoimmunity to keratinocyte acetylcholine receptors in pemphigus." *Dermatology* 201(4): 290-5.
- Green, K. J., B. Geiger, J. C. Jones, J. C. Talian und R. D. Goldman** (1987). "The relationship between intermediate filaments and microfilaments before and during the formation of desmosomes and adherens-type junctions in mouse epidermal keratinocytes." *J Cell Biol* 104(5): 1389-402.
- Green, K. J. und C. L. Simpson** (2007). "Desmosomes: new perspectives on a classic." *J Invest Dermatol* 127(11): 2499-515.
- Hans-Filho, G., V. dos Santos, J. H. Katayama, V. Aoki, E. A. Rivitti, S. A. Sampaio, H. Friedman, J. R. Moraes, M. E. Moraes, D. P. Eaton et al.** (1996). "An active focus of high prevalence of fogo selvagem on an Amerindian

- reservation in Brazil. Cooperative Group on Fogo Selvagem Research." *J Invest Dermatol* 107(1): 68-75.
- Hardman, M. J., K. Liu, A. A. Avilion, A. Merritt, K. Brennan, D. R. Garrod und C. Byrne** (2005). "Desmosomal cadherin misexpression alters beta-catenin stability and epidermal differentiation." *Mol Cell Biol* 25(3): 969-78.
- Harman, K. E., S. Albert und M. M. Black** (2003). "Guidelines for the management of pemphigus vulgaris." *Br J Dermatol* 149(5): 926-37.
- Harper, E. G., S. M. Alvares und W. G. Carter** (2005). "Wounding activates p38 map kinase and activation transcription factor 3 in leading keratinocytes." *J Cell Sci* 118(Pt 15): 3471-85.
- Hashimoto, K. und W. F. Lever** (1967). "An electron microscopic study on pemphigus vulgaris of the mouth and the skin with special reference to the intercellular cement." *J Invest Dermatol* 48(6): 540-52.
- Hashimoto, K. und W. F. Lever** (1967). "The intercellular cement in pemphigus vulgaris, an electron microscopic study." *Dermatologica* 135(1): 27-34.
- Hatzfeld, M., C. Haffner, K. Schulze und U. Vinzens** (2000). "The function of plakophilin 1 in desmosome assembly and actin filament organization." *J Cell Biol* 149(1): 209-22.
- Helfand, B. T., L. Chang und R. D. Goldman** (2004). "Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture." *J Cell Sci* 117(Pt 2): 133-41.
- Hennings, H. und K. A. Holbrook** (1983). "Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture. An ultrastructural study." *Exp Cell Res* 143(1): 127-42.
- Heupel, W. M., P. Engerer, E. Schmidt und J. Waschke** (2009). "Pemphigus vulgaris IgG cause loss of desmoglein-mediated adhesion and keratinocyte dissociation independent of epidermal growth factor receptor." *Am J Pathol* 174(2): 475-85.
- Heupel, W. M., T. Muller, A. Efthymiadis, E. Schmidt, D. Drenckhahn und J. Waschke** (2009). "Peptides Targeting the Desmoglein 3 Adhesive Interface Prevent Autoantibody-induced Acantholysis in Pemphigus." *J Biol Chem* 284(13): 8589-95.
- Heupel, W. M., D. Zillikens, D. Drenckhahn und J. Waschke** (2008). "Pemphigus vulgaris IgG directly inhibit desmoglein 3-mediated transinteraction." *J Immunol* 181(3): 1825-34.
- Hitchcock-DeGregori, S. E., P. Sampath und T. D. Pollard** (1988). "Tropomyosin inhibits the rate of actin polymerization by stabilizing actin filaments." *Biochemistry* 27(26): 9182-5.
- Hofmann, M., J. Zaper, A. Bernd, J. Bereiter-Hahn, R. Kaufmann und S. Kippenberger** (2004). "Mechanical pressure-induced phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase in epithelial cells via Src and protein kinase C." *Biochem Biophys Res Commun* 316(3): 673-9.
- Holzinger, A.** (2001). "Jasplakinolide. An actin-specific reagent that promotes actin polymerization." *Methods Mol Biol* 161: 109-20.
- Holzinger, A. und U. Meindl** (1997). "Jasplakinolide, a novel actin targeting peptide, inhibits cell growth and induces actin filament polymerization in the green alga *Micrasterias*." *Cell Motil Cytoskeleton* 38(4): 365-72.
- Huen, A. C., J. K. Park, L. M. Godsel, X. Chen, L. J. Bannon, E. V. Amargo, T. Y. Hudson, A. K. Mongiu, I. M. Leigh, D. P. Kelsell et al.** (2002). "Intermediate

- filament-membrane attachments function synergistically with actin-dependent contacts to regulate intercellular adhesive strength." *J Cell Biol* 159(6): 1005-17.
- Inada, H., I. Izawa, M. Nishizawa, E. Fujita, T. Kiyono, T. Takahashi, T. Momoi und M. Inagaki** (2001). "Keratin attenuates tumor necrosis factor-induced cytotoxicity through association with TRADD." *J Cell Biol* 155(3): 415-26.
- Ishii, K. und K. J. Green** (2001). "Cadherin function: breaking the barrier." *Curr Biol* 11(14): R569-72.
- Ishii, K., C. Lin, D. L. Siegel und J. R. Stanley** (2008). "Isolation of pathogenic monoclonal anti-desmoglein 1 human antibodies by phage display of pemphigus foliaceus autoantibodies." *J Invest Dermatol* 128(4): 939-48.
- Ivanov, A. I., I. C. McCall, B. Babbin, S. N. Samarina, A. Nusrat und C. A. Parkos** (2006). "Microtubules regulate disassembly of epithelial apical junctions." *BMC Cell Biol* 7: 12.
- Izumi, G., T. Sakisaka, T. Baba, S. Tanaka, K. Morimoto und Y. Takai** (2004). "Endocytosis of E-cadherin regulated by Rac and Cdc42 small G proteins through IQGAP1 and actin filaments." *J Cell Biol* 166(2): 237-48.
- Jamora, M. J., D. Jiao und J. C. Bystryk** (2003). "Antibodies to desmoglein 1 and 3, and the clinical phenotype of pemphigus vulgaris." *J Am Acad Dermatol* 48(6): 976-7.
- Jennings, J. M., D. K. Tucker, M. D. Kottke, M. Saito, E. Delva, Y. Hanakawa, M. Amagai und A. P. Kowalczyk** (2011). "Desmosome disassembly in response to pemphigus vulgaris IgG occurs in distinct phases and can be reversed by expression of exogenous Dsg3." *J Invest Dermatol* 131(3): 706-18.
- Jolly, P. S., P. Berkowitz, M. Bektas, H. E. Lee, M. Chua, L. A. Diaz und D. S. Rubenstein** (2010). "p38MAPK Signaling and Desmoglein-3 Internalization Are Linked Events in Pemphigus Acantholysis." *J Biol Chem* 285(12): 8936-41.
- Kee, S. H. und P. M. Steinert** (2001). "Microtubule disruption in keratinocytes induces cell-cell adhesion through activation of endogenous E-cadherin." *Mol Biol Cell* 12(7): 1983-93.
- Kim, S., P. Wong und P. A. Coulombe** (2006). "A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth." *Nature* 441(7091): 362-5.
- Kitajima, Y., Y. Aoyama und M. Seishima** (1999). "Transmembrane signaling for adhesive regulation of desmosomes and hemidesmosomes, and for cell-cell detachment induced by pemphigus IgG in cultured keratinocytes: involvement of protein kinase C." *J Invest Dermatol Symp Proc* 4(2): 137-44.
- Kitajima, Y., S. Inoue und H. Yaoita** (1986). "Effects of pemphigus antibody on the organization of microtubules and keratin-intermediate filaments in cultured human keratinocytes." *Br J Dermatol* 114(2): 171-9.
- Klekotka, P. A., S. A. Santoro und M. M. Zutter** (2001). "alpha 2 integrin subunit cytoplasmic domain-dependent cellular migration requires p38 MAPK." *J Biol Chem* 276(12): 9503-11.
- Kolsch, A., R. Windoffer und R. E. Leube** (2009). "Actin-dependent dynamics of keratin filament precursors." *Cell Motil Cytoskeleton* 66(11): 976-85.
- Kottke, M. D., E. Delva und A. P. Kowalczyk** (2006). "The desmosome: cell science lessons from human diseases." *J Cell Sci* 119(Pt 5): 797-806.
- Kowalczyk, A. P., J. E. Borgwardt und K. J. Green** (1996). "Analysis of desmosomal cadherin-adhesive function and stoichiometry of desmosomal cadherin-plakoglobin complexes." *J Invest Dermatol* 107(3): 293-300.

- Kowalczyk, A. P., M. Hatzfeld, E. A. Bornslaeger, D. S. Kopp, J. E. Borgwardt, C. M. Corcoran, A. Settler und K. J. Green** (1999). "The head domain of plakophilin-1 binds to desmoplakin and enhances its recruitment to desmosomes. Implications for cutaneous disease." *J Biol Chem* 274(26): 18145-8.
- Ku, N. O., S. Azhar und M. B. Omary** (2002). "Keratin 8 phosphorylation by p38 kinase regulates cellular keratin filament reorganization: modulation by a keratin 1-like disease causing mutation." *J Biol Chem* 277(13): 10775-82.
- Ku, N. O., J. Liao und M. B. Omary** (1998). "Phosphorylation of human keratin 18 serine 33 regulates binding to 14-3-3 proteins." *EMBO J* 17(7): 1892-906.
- Ku, N. O., S. A. Michie, R. M. Soetikno, E. Z. Resurreccion, R. L. Broome und M. B. Omary** (1998). "Mutation of a major keratin phosphorylation site predisposes to hepatotoxic injury in transgenic mice." *J Cell Biol* 143(7): 2023-32.
- Ku, N. O. und M. B. Omary** (2006). "A disease- and phosphorylation-related nonmechanical function for keratin 8." *J Cell Biol* 174(1): 115-25.
- Lee, S. H. und R. Dominguez** (2010). "Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells." *Mol Cells* 29(4): 311-25.
- Lever, W. F. und K. Hashimoto** (1969). "The etiology and treatment of pemphigus and pemphigoid." *J Invest Dermatol* 53(6): 373-89.
- Lewis, J. E., J. K. Wahl, 3rd, K. M. Sass, P. J. Jensen, K. R. Johnson und M. J. Wheelock** (1997). "Cross-talk between adherens junctions and desmosomes depends on plakoglobin." *J Cell Biol* 136(4): 919-34.
- Liao, J., N. O. Ku und M. B. Omary** (1997). "Stress, apoptosis, and mitosis induce phosphorylation of human keratin 8 at Ser-73 in tissues and cultured cells." *J Biol Chem* 272(28): 17565-73.
- Liao, J. und M. B. Omary** (1996). "14-3-3 proteins associate with phosphorylated simple epithelial keratins during cell cycle progression and act as a solubility cofactor." *J Cell Biol* 133(2): 345-57.
- Liebig, T., J. Erasmus, R. Kalaji, D. Davies, G. Loirand, A. Ridley und V. M. Braga** (2009). "RhoE Is required for keratinocyte differentiation and stratification." *Mol Biol Cell* 20(1): 452-63.
- Lippincott-Schwartz, J., N. Altan-Bonnet und G. H. Patterson** (2003). "Photobleaching and photoactivation: following protein dynamics in living cells." *Nat Cell Biol* Suppl: S7-14.
- Lock, F. E. und N. A. Hotchin** (2009). "Distinct roles for ROCK1 and ROCK2 in the regulation of keratinocyte differentiation." *PLoS One* 4(12): e8190.
- Lorenowicz, M. J., M. Fernandez-Borja, A. M. van Stalborch, M. A. van Sterkenburg, P. S. Hiemstra und P. L. Hordijk** (2007). "Microtubule dynamics and Rac-1 signaling independently regulate barrier function in lung epithelial cells." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293(5): L1321-31.
- Lüllmann-Rauch, R.** (2004). Benninghoff Drenckhahn, Anatomie. makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie ; Band 2. München Urban & Schwarzenberg.
- Maciver, S. K. und P. J. Hussey** (2002). "The ADF/cofilin family: actin-remodeling proteins." *Genome Biol* 3(5): reviews3007.
- Maeda, O., N. Usami, M. Kondo, M. Takahashi, H. Goto, K. Shimokata, K. Kusugami und Y. Sekido** (2004). "Plakoglobin (gamma-catenin) has TCF/LEF

- family-dependent transcriptional activity in beta-catenin-deficient cell line." *Oncogene* 23(4): 964-72.
- Mahoney, M. G., Y. Hu, D. Brennan, H. Bazzi, A. M. Christiano und J. K. Wahl, 3rd** (2006). "Delineation of diversified desmoglein distribution in stratified squamous epithelia: implications in diseases." *Exp Dermatol* 15(2): 101-9.
- Mahoney, M. G., Z. Wang, K. Rothenberger, P. J. Koch, M. Amagai und J. R. Stanley** (1999). "Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris." *J Clin Invest* 103(4): 461-8.
- Mao, X., E. J. Choi und A. S. Payne** (2009). "Disruption of desmosome assembly by monovalent human pemphigus vulgaris monoclonal antibodies." *J Invest Dermatol* 129(4): 908-18.
- Marchenko, S., A. I. Chernyavsky, J. Arredondo, V. Gindi und S. A. Grando** (2010). "Antimitochondrial autoantibodies in pemphigus vulgaris: a missing link in disease pathophysiology." *J Biol Chem* 285(6): 3695-704.
- Marcozzi, C., I. D. Burdett, R. S. Buxton und A. I. Magee** (1998). "Coexpression of both types of desmosomal cadherin and plakoglobin confers strong intercellular adhesion." *J Cell Sci* 111 (Pt 4): 495-509.
- Mathur, M., L. Goodwin und P. Cowin** (1994). "Interactions of the cytoplasmic domain of the desmosomal cadherin Dsg1 with plakoglobin." *J Biol Chem* 269(19): 14075-80.
- McGough, A., B. Pope, W. Chiu und A. Weeds** (1997). "Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function." *J Cell Biol* 138(4): 771-81.
- McMullan, R., S. Lax, V. H. Robertson, D. J. Radford, S. Broad, F. M. Watt, A. Rowles, D. R. Croft, M. F. Olson und N. A. Hotchin** (2003). "Keratinocyte differentiation is regulated by the Rho and ROCK signaling pathway." *Curr Biol* 13(24): 2185-9.
- McNeill, H., T. A. Ryan, S. J. Smith und W. J. Nelson** (1993). "Spatial and temporal dissection of immediate and early events following cadherin-mediated epithelial cell adhesion." *J Cell Biol* 120(5): 1217-26.
- Meng, W., Y. Mushika, T. Ichii und M. Takeichi** (2008). "Anchorage of microtubule minus ends to adherens junctions regulates epithelial cell-cell contacts." *Cell* 135(5): 948-59.
- Merritt, A. J., M. Y. Berika, W. Zhai, S. E. Kirk, B. Ji, M. J. Hardman und D. R. Garrod** (2002). "Suprabasal desmoglein 3 expression in the epidermis of transgenic mice results in hyperproliferation and abnormal differentiation." *Mol Cell Biol* 22(16): 5846-58.
- Müller, E. J., L. Williamson, C. Kolly und M. M. Suter** (2008). "Outside-in signaling through integrins and cadherins: a central mechanism to control epidermal growth and differentiation?" *J Invest Dermatol* 128(3): 501-16.
- Muller, E., R. Caldelari, A. De Bruin, D. Baumann, C. Bierkamp, V. V. Balmer und M. M. Suter** (2000). "Pathogenesis in pemphigus vulgaris: A central role for the armadillo protein plakoglobin." *J Invest Dermatol* 115(2): 332.
- Muller, R., V. Svoboda, E. Wenzel, H. H. Muller und M. Hertl** (2008). "IgG against extracellular subdomains of desmoglein 3 relates to clinical phenotype of pemphigus vulgaris." *Exp Dermatol* 17(1): 35-43.

- Nguyen, V. T., A. Ndoye und S. A. Grando** (2000). "Pemphigus vulgaris antibody identifies pemphaxin. A novel keratinocyte annexin-like molecule binding acetylcholine." *J Biol Chem* 275(38): 29466-76.
- Nguyen, V. T., A. Ndoye, L. D. Shultz, M. R. Pittelkow und S. A. Grando** (2000). "Antibodies against keratinocyte antigens other than desmogleins 1 and 3 can induce pemphigus vulgaris-like lesions." *J Clin Invest* 106(12): 1467-79.
- Niessen, C. M.** (2007). "Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function." *J Invest Dermatol* 127(11): 2525-32.
- Nikolova, E., V. Mitev, F. Minner, C. F. Deroanne und Y. Poumay** (2008). "The inhibition of the expression of the small Rho GTPase Rac1 induces differentiation with no effect on cell proliferation in growing human adult keratinocytes." *J Cell Biochem* 103(3): 857-64.
- Omary, M. B., P. A. Coulombe und W. H. McLean** (2004). "Intermediate filament proteins and their associated diseases." *N Engl J Med* 351(20): 2087-100.
- Omary, M. B., N. O. Ku, J. Liao und D. Price** (1998). "Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro." *Subcell Biochem* 31: 105-40.
- Oshima, R. G.** (2007). "Intermediate filaments: a historical perspective." *Exp Cell Res* 313(10): 1981-94.
- Pallari, H. M. und J. E. Eriksson** (2006). "Intermediate filaments as signaling platforms." *Sci STKE* 2006(366): pe53.
- Parsons, J. T., A. R. Horwitz und M. A. Schwartz** (2010). "Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension." *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(9): 633-43.
- Pasdar, M. und Z. Li** (1993). "Disorganization of microfilaments and intermediate filaments interferes with the assembly and stability of desmosomes in MDCK epithelial cells." *Cell Motil Cytoskeleton* 26(2): 163-80.
- Pasdar, M., Z. Li und V. Chlumecky** (1995). "Plakoglobin: kinetics of synthesis, phosphorylation, stability, and interactions with desmoglein and E-cadherin." *Cell Motil Cytoskeleton* 32(4): 258-72.
- Pasdar, M., Z. Li und K. A. Krzeminski** (1992). "Desmosome assembly in MDCK epithelial cells does not require the presence of functional microtubules." *Cell Motil Cytoskeleton* 23(3): 201-12.
- Pasdar, M. und W. J. Nelson** (1988). "Kinetics of desmosome assembly in Madin-Darby canine kidney epithelial cells: temporal and spatial regulation of desmoplakin organization and stabilization upon cell-cell contact. I. Biochemical analysis." *J Cell Biol* 106(3): 677-85.
- Pasdar, M. und W. J. Nelson** (1989). "Regulation of desmosome assembly in epithelial cells: kinetics of synthesis, transport, and stabilization of desmoglein I, a major protein of the membrane core domain." *J Cell Biol* 109(1): 163-77.
- Perlson, E., S. Hanz, K. Ben-Yaakov, Y. Segal-Ruder, R. Seger und M. Fainzilber** (2005). "Vimentin-dependent spatial translocation of an activated MAP kinase in injured nerve." *Neuron* 45(5): 715-26.
- Ridge, K. M., L. Linz, F. W. Flitney, E. R. Kuczmarski, Y. H. Chou, M. B. Omary, J. I. Sznajder und R. D. Goldman** (2005). "Keratin 8 phosphorylation by protein kinase C delta regulates shear stress-mediated disassembly of keratin intermediate filaments in alveolar epithelial cells." *J Biol Chem* 280(34): 30400-5.

- Rosen, K., W. Shi, B. Calabretta und J. Filmus** (2002). "Cell detachment triggers p38 mitogen-activated protein kinase-dependent overexpression of Fas ligand. A novel mechanism of Anoikis of intestinal epithelial cells." *J Biol Chem* 277(48): 46123-30.
- Runswick, S. K., M. J. O'Hare, L. Jones, C. H. Streuli und D. R. Garrod** (2001). "Desmosomal adhesion regulates epithelial morphogenesis and cell positioning." *Nat Cell Biol* 3(9): 823-30.
- Sako, Y., A. Nagafuchi, S. Tsukita, M. Takeichi und A. Kusumi** (1998). "Cytoplasmic regulation of the movement of E-cadherin on the free cell surface as studied by optical tweezers and single particle tracking: corralling and tethering by the membrane skeleton." *J Cell Biol* 140(5): 1227-40.
- Sams, W. M., Jr. und W. R. Gammon** (1982). "Mechanism of lesion production in pemphigus and pemphigoid." *J Am Acad Dermatol* 6(4 Pt 1): 431-52.
- Sato, M., Y. Aoyama und Y. Kitajima** (2000). "Assembly pathway of desmoglein 3 to desmosomes and its perturbation by pemphigus vulgaris-IgG in cultured keratinocytes, as revealed by time-lapsed labeling immunoelectron microscopy." *Lab Invest* 80(10): 1583-92.
- Sekiguchi, M., Y. Futei, Y. Fujii, T. Iwasaki, T. Nishikawa und M. Amagai** (2001). "Dominant autoimmune epitopes recognized by pemphigus antibodies map to the N-terminal adhesive region of desmogleins." *J Immunol* 167(9): 5439-48.
- Shapiro, L., A. M. Fannon, P. D. Kwong, A. Thompson, M. S. Lehmann, G. Grubel, J. F. LeGrand, J. Als-Nielsen, D. R. Colman und W. A. Hendrickson** (1995). "Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins." *Nature* 374(6520): 327-37.
- Sharma, G. D., J. He und H. E. Bazan** (2003). "p38 and ERK1/2 coordinate cellular migration and proliferation in epithelial wound healing: evidence of cross-talk activation between MAP kinase cascades." *J Biol Chem* 278(24): 21989-97.
- Sharma, P., X. Mao und A. S. Payne** (2007). "Beyond steric hindrance: the role of adhesion signaling pathways in the pathogenesis of pemphigus." *J Dermatol Sci* 48(1): 1-14.
- Sheu, H. M., Y. Kitajima und H. Yaoita** (1989). "Involvement of protein kinase C in translocation of desmoplakins from cytosol to plasma membrane during desmosome formation in human squamous cell carcinoma cells grown in low to normal calcium concentration." *Exp Cell Res* 185(1): 176-90.
- Soderling, S. H.** (2009). "Grab your partner with both hands: cytoskeletal remodeling by Arp2/3 signaling." *Sci Signal* 2(55): pe5.
- Spindler, V., D. Drenckhahn, D. Zillikens und J. Waschke** (2007). "Pemphigus IgG causes skin splitting in the presence of both desmoglein 1 and desmoglein 3." *Am J Pathol* 171(3): 906-16.
- Spindler, V., W. M. Heupel, A. Efthymiadis, E. Schmidt, R. Eming, C. Rankl, P. Hinterdorfer, T. Muller, D. Drenckhahn und J. Waschke** (2009). "Desmocollin 3-mediated binding is crucial for keratinocyte cohesion and is impaired in pemphigus." *J Biol Chem* 284(44): 30556-64.
- Stanley, J. R. und M. Amagai** (2006). "Pemphigus, bullous impetigo, and the staphylococcal scalded-skin syndrome." *N Engl J Med* 355(17): 1800-10.
- Stoll, S. W., S. Kansra und J. T. Elder** (2003). "Keratinocyte outgrowth from human skin explant cultures is dependent upon p38 signaling." *Wound Repair Regen* 11(5): 346-53.

- Syed, S. E., B. Trinnaman, S. Martin, S. Major, J. Hutchinson und A. I. Magee** (2002). "Molecular interactions between desmosomal cadherins." *Biochem J* 362(Pt 2): 317-27.
- Takahashi, Y., H. P. Patel, R. S. Labib, L. A. Diaz und G. J. Anhalt** (1985). "Experimentally induced pemphigus vulgaris in neonatal BALB/c mice: a time-course study of clinical, immunologic, ultrastructural, and cytochemical changes." *J Invest Dermatol* 84(1): 41-6.
- Tondeleir, D., D. Vandamme, J. Vandekerckhove, C. Ampe und A. Lambrechts** (2009). "Actin isoform expression patterns during mammalian development and in pathology: insights from mouse models." *Cell Motil Cytoskeleton* 66(10): 798-815.
- Troyanovsky, S. M., R. B. Troyanovsky, L. G. Eshkind, V. A. Krutovskikh, R. E. Leube und W. W. Franke** (1994). "Identification of the plakoglobin-binding domain in desmoglein and its role in plaque assembly and intermediate filament anchorage." *J Cell Biol* 127(1): 151-60.
- Troyanovsky, S. M., R. B. Troyanovsky, L. G. Eshkind, R. E. Leube und W. W. Franke** (1994). "Identification of amino acid sequence motifs in desmocollin, a desmosomal glycoprotein, that are required for plakoglobin binding and plaque formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(23): 10790-4.
- Tsunoda, K., T. Ota, M. Aoki, T. Yamada, T. Nagai, T. Nakagawa, S. Koyasu, T. Nishikawa und M. Amagai** (2003). "Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3." *J Immunol* 170(4): 2170-8.
- van Hengel, J., L. Gohon, E. Bruyneel, S. Vermeulen, M. Cornelissen, M. Mareel und F. von Roy** (1997). "Protein kinase C activation upregulates intercellular adhesion of alpha-catenin-negative human colon cancer cell variants via induction of desmosomes." *J Cell Biol* 137(5): 1103-16.
- Vasioukhin, V., C. Bauer, M. Yin und E. Fuchs** (2000). "Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion." *Cell* 100(2): 209-19.
- Vasioukhin, V., E. Bowers, C. Bauer, L. Degenstein und E. Fuchs** (2001). "Desmoplakin is essential in epidermal sheet formation." *Nat Cell Biol* 3(12): 1076-85.
- Vassar, R., P. A. Coulombe, L. Degenstein, K. Albers und E. Fuchs** (1991). "Mutant keratin expression in transgenic mice causes marked abnormalities resembling a human genetic skin disease." *Cell* 64(2): 365-80.
- Vu, T. N., T. X. Lee, A. Ndoye, L. D. Shultz, M. R. Pittelkow, M. V. Dahl, P. J. Lynch und S. A. Grando** (1998). "The pathophysiological significance of nondesmoglein targets of pemphigus autoimmunity. Development of antibodies against keratinocyte cholinergic receptors in patients with pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus." *Arch Dermatol* 134(8): 971-80.
- Wahl, J. K., 3rd** (2005). "A role for plakophilin-1 in the initiation of desmosome assembly." *J Cell Biochem* 96(2): 390-403.
- Wallis, S., S. Lloyd, I. Wise, G. Ireland, T. P. Fleming und D. Garrod** (2000). "The alpha isoform of protein kinase C is involved in signaling the response of desmosomes to wounding in cultured epithelial cells." *Mol Biol Cell* 11(3): 1077-92.

- Waschke, J.** (2008). "The desmosome and pemphigus." *Histochem Cell Biol* 130(1): 21-54.
- Waschke, J., P. Bruggeman, W. Baumgartner, D. Zillikens und D. Drenckhahn** (2005). "Pemphigus foliaceus IgG causes dissociation of desmoglein 1-containing junctions without blocking desmoglein 1 transinteraction." *J Clin Invest* 115(11): 3157-65.
- Waschke, J., V. Spindler, P. Bruggeman, D. Zillikens, G. Schmidt und D. Drenckhahn** (2006). "Inhibition of Rho A activity causes pemphigus skin blistering." *J Cell Biol* 175(5): 721-7.
- Waterman-Storer, C. M., W. C. Salmon und E. D. Salmon** (2000). "Feedback interactions between cell-cell adherens junctions and cytoskeletal dynamics in newt lung epithelial cells." *Mol Biol Cell* 11(7): 2471-83.
- Weber, K. L. und W. M. Bement** (2002). "F-actin serves as a template for cyokeratin organization in cell free extracts." *J Cell Sci* 115(Pt 7): 1373-82.
- Wilgram, G. F., J. B. Caulfield und W. F. Lever** (1961). "An electron microscopic study of acantholysis in pemphigus vulgaris." *J Invest Dermatol* 36: 373-82.
- Williamson, L., N. A. Raess, R. Caldelari, A. Zakher, A. de Bruin, H. Posthaus, R. Bolli, T. Hunziker, M. M. Suter und E. J. Muller** (2006). "Pemphigus vulgaris identifies plakoglobin as key suppressor of c-Myc in the skin." *EMBO J* 25(14): 3298-309.
- Winder, S. J. und K. R. Ayscough** (2005). "Actin-binding proteins." *J Cell Sci* 118(Pt 4): 651-4.
- Windoffer, R., A. Kolsch, S. Woll und R. E. Leube** (2006). "Focal adhesions are hotspots for keratin filament precursor formation." *J Cell Biol* 173(3): 341-8.
- Windoffer, R., S. Woll, P. Strnad und R. E. Leube** (2004). "Identification of novel principles of keratin filament network turnover in living cells." *Mol Biol Cell* 15(5): 2436-48.
- Woll, S., R. Windoffer und R. E. Leube** (2007). "p38 MAPK-dependent shaping of the keratin cytoskeleton in cultured cells." *J Cell Biol* 177(5): 795-807.
- Wu, H., Z. H. Wang, A. Yan, S. Lyle, S. Fakharzadeh, J. K. Wahl, M. J. Wheelock, H. Ishikawa, J. Uitto, M. Amagai et al.** (2000). "Protection against pemphigus foliaceus by desmoglein 3 in neonates." *N Engl J Med* 343(1): 31-5.
- Yamamoto, Y., Y. Aoyama, E. Shu, K. Tsunoda, M. Amagai und Y. Kitajima** (2007). "Anti-desmoglein 3 (Dsg3) monoclonal antibodies deplete desmosomes of Dsg3 and differ in their Dsg3-depleting activities related to pathogenicity." *J Biol Chem* 282(24): 17866-76.
- Yin, T. und K. J. Green** (2004). "Regulation of desmosome assembly and adhesion." *Semin Cell Dev Biol* 15(6): 665-77.
- Yonemura, S., M. Itoh, A. Nagafuchi und S. Tsukita** (1995). "Cell-to-cell adherens junction formation and actin filament organization: similarities and differences between non-polarized fibroblasts and polarized epithelial cells." *J Cell Sci* 108 (Pt 1): 127-42.
- Yoon, K. H., M. Yoon, R. D. Moir, S. Khuon, F. W. Flitney und R. D. Goldman** (2001). "Insights into the dynamic properties of keratin intermediate filaments in living epithelial cells." *J Cell Biol* 153(3): 503-16.
- Zheng, B., M. Han, M. Bernier und J. K. Wen** (2009). "Nuclear actin and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression." *FEBS J* 276(10): 2669-85.

Zhurinsky, J., M. Shtutman und A. Ben-Ze'ev (2000). "Plakoglobin and beta-catenin: protein interactions, regulation and biological roles." *J Cell Sci* 113 (Pt 18): 3127-39.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Waschke für die freundliche Überlassung des Themas und die Möglichkeit, an seinem Lehrstuhl wissenschaftlich arbeiten zu dürfen. Durch seine uneingeschränkte Unterstützung sowie seine konstruktive Kritik, trug er entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Weiterhin gilt mein Dank meinem Betreuer Herrn Dr. Heupel für dessen unermüdlichen Einsatz für meine Arbeit. Durch sein enormes Engagement und Wissen wurde mir der Einstieg in wissenschaftliches Arbeiten und Denken leicht gemacht. Dadurch, dass er auch nach seinem beruflichen Ausscheiden stets als kritischer Ansprechpartner zur Verfügung stand, lernte ich ihn nicht nur auf wissenschaftlicher, sondern auch auf persönlicher Ebene als wertvollen Menschen schätzen.

Daneben gebührt meine Anerkennung Herrn Dr. Spindler, welcher nach dem beruflichen Ausscheiden von Herrn Dr. Heupel meine Doktorarbeit mit unverändertem Elan vorantrieb

Ich danke weiterhin den Mitarbeitern des Instituts, insbesondere Fr. Lisa Bergauer, Fr. Nadja Niedermeier und Fr. Veronica Heimbach, dafür, dass sie mich geduldig in zahlreiche Arbeitstechniken einführten und auch später gerne mit Rat und Tat zur Verfügung standen. Durch ihre offene und freundliche Art trugen sie zur positiven Stimmung im Labor bei und gaben mir stets das Gefühl Teil der Arbeitsgruppe zu sein. Mein Dank gilt auch den weiteren Doktoranden des Instituts, welche mir durch ihre Aufmunterungen halfen, manche Frustration zu überwinden und neuen Mut zu fassen.

Ganz besonders danke ich meiner Freundin Carla für ihre selbstlose Unterstützung meiner oft zeitintensiven Arbeit und das Gefühl immer für mich da zu sein, wenn ich sie brauchte.

Zu guter Letzt gilt mein Dank und meine Anerkennung meinen Eltern, deren uneingeschränkter Unterstützung ich mir stets sicher sein konnte. Durch ihre Förderung und Motivation schafften sie mir erst die Möglichkeiten zu Studium und Promotion.