



Charakterisierung der Desmoglein 1- vermittelten Adhäsion und ihre Beeinflussung durch Autoantikörper bei Pemphigus foliaceus

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Paola Bruggeman

**Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und –Embryologie der
Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Martin Bergmann**

und

**Institut für Anatomie und Zellbiologie der Julius-Maximilians-
Universität Würzburg
Betreuer: Prof. Dr. Detlev Drenckhahn**

Charakterisierung der Desmoglein 1- vermittelten Adhäsion und ihre Beein- flussung durch Autoantikörper bei Pemphigus foliaceus

**INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Eingereicht von
Paola Bruggeman
Tierärztin aus Bad Mergentheim**

Gießen 2005

**Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

**Gutachter: Prof. Dr. M. Bergmann
Prof. Dr. D. Drenckhahn**

Tag der Disputation: 07.07.2005

für
meine Eltern

1.	ZUSAMMENFASSUNG	4
1.1.	Zusammenfassung	4
1.2.	Summary	6
2.	EINLEITUNG.....	8
2.1.	Interzellularkontakte.....	8
2.2.	Desmosomen	8
2.3.	Cadherine	10
2.4.	Desmocadherine.....	12
2.5.	Klinische Bedeutung der Desmocadherine	14
2.6.	Pemphiguserkrankungen	14
2.7.	Zielsetzung	19
3.	MATERIAL	21
3.1.	Lebendmaterial	21
3.2.	Medien und Platten.....	22
3.3.	Zusätze für Medien und Agarplatten	22
3.4.	Puffer und Lösungen	23
3.5.	Molekulargewichtstandards	24
3.6.	Enzyme	25
3.7.	Vektoren, Plasmide und Primer	25
3.8.	Anwendungssätze	26
3.9.	Stabil transfizierte Zell-Klone	26
3.10.	Chemikalien.....	26
3.11.	Verbrauchsmaterialien, Antikörper/Patientenseren, Geräte	28
4.	METHODEN.....	33
4.1.	Molekularbiologie.....	33
4.1.1.	Bakterien	33
4.1.2.	Methoden zum Umgang mit DNA	34
4.2.	Zellkultur.....	40
4.2.1.	Nährmedien	40
4.2.2.	CHO-Standardkultur	40
4.2.3.	HaCaT-Standardkultur.....	40
4.2.4.	Kryokonservierung von Zellen.....	41

Inhaltsverzeichnis

4.2.5. Tranfektion mit Effectene®	41
4.2.6. Generierung von stabilen Zellklonen.....	42
4.2.7. Zelllysat	43
4.3. Proteinbiochemie	43
4.3.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	43
4.3.2. Elektrotransfer von Proteinen aus SDS-Gelen (<i>Immunoblotting</i>).....	44
4.3.3. Dot-Blot-Analyse.....	45
4.3.4. Proteinaufreinigung.....	46
4.3.5. Bradford-Analyse	47
4.3.6. Biotinylierung	47
4.3.7. Immunabsorption des PF2-IgG.....	48
4.4. Mikroskopie	48
4.4.1. Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	48
4.4.2. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	49
4.4.3. Rasterelektronenmikroskopie.....	50
4.4.4. Atomkraftmikroskopie (<i>atomic force microscopy</i> ; AFM).....	50
4.4.5. Laserpinzette	54
4.4.6. Messungen mit der Ca ²⁺ -Elektrode.....	56
5. ERGEBNISSE	58
5.1. Proteingewinnung und Charakterisierung der kultivierten humanen Keratinozyten.....	58
5.1.1. Umklonierung des Dsg 1-Fc-Fusionsproteins in einen eukaryontischen Expressionsvektor	58
5.1.2. Generierung einer stabil transfizierten Zelllinie	59
5.1.3. Proteinaufreinigung mit Protein A-Affinitätschromatographie	60
5.1.4. Charakterisierung der humanen Keratinozyten (HaCaT).....	61
5.1.5. Charakterisierung der Zell-Mikroperlen-Kontakte.....	63
5.2. Untersuchung der Adhäsionsstärke und Ca ²⁺ -Abhängigkeit der Desmoglein 1-Transinteraktion	65
5.2.1. Dsg 1-Bindung und Verteilung der auftretenden Kraft-populationen in Abhängigkeit von der Zuggeschwindigkeit.....	65
5.2.2. Ca ²⁺ -Abhängigkeit der homophilen Dsg 1-Transinteraktion	67

5.2.3.	Ca ²⁺ -Abhängigkeit der Dsg 1-Bindung zwischen Dsg 1-beschichteten Mikroperlen und Keratinozyten	68
5.3.	Einfluss von PF-IgG auf die Dsg 1-Transinteraktion.....	69
5.3.1.	Aufreinigung von PF-IgG	69
5.3.2.	Effekt von PF-IgG auf HaCaT-Zellkulturen.....	71
5.3.3.	Effekt von PF-IgG auf die Adhäsion Dsg 1-beschichteter Mikroperlen ..	77
5.3.4.	Effekt von PF-IgG auf die Dsg 1-Transinteraktion, gemessen mit AFM.	81
6.	DISKUSSION	83
6.1.	Nachweis von Dsg 1 ist in HaCaT-Zellen nur unter nicht-denaturierenden Bedingungen möglich.....	84
6.2.	Dsg 1 geht homophile Bindungen ein	84
6.3.	Die homophile Dsg 1-Transinteraktion ist Ca ²⁺ -abhängig.....	85
6.4.	Bindungsstärke der homophilen Dsg 1-Interaktion.....	87
6.5.	PF-IgG hemmt die Dsg 1-Transinteraktion nicht direkt.....	88
6.6.	PF-Serum verursacht Lückenbildung und den Verlust von Dsg 1 in HaCaT-Zellkulturen.....	91
6.7.	Spezifische Antikörper gegen Dsg 1 in den PF-IgG-Fractionen verursachten die Hemmung der Dsg 1-vermittelten Bindung, Zelldissoziation und Zytoskelettveränderungen	92
6.8.	PF2-IgG hemmt die Dsg 1-Bindung stärker als PF1-IgG.....	92
6.9.	Die direkte Hemmung der Dsg 1-Bindung löst keine Lückenbildung, kein Verlust von Dsg 1 und keine Zytoskelettveränderungen aus	93
6.10.	Ausblick	94
7.	LITERATUR	95
6.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	103
7.	ABKÜRZUNGEN.....	104
	DANKSAGUNG	106
	ERKLÄRUNG.....	107

1. Zusammenfassung

1.1. Zusammenfassung

Die blasenbildende Hauterkrankung Pemphigus foliaceus (PF) ist durch Bildung von Autoantikörpern gegen Desmoglein 1 (Dsg 1), ein desmosomales Adhäsionsprotein der Cadherin-Familie, bedingt. Die Charakterisierung der molekularen Bindungseigenschaften desmosomaler Cadherine ist daher von besonderer klinischer Bedeutung. Zur Untersuchung der Adhäsionsstärke und Ca^{2+} -Abhängigkeit der Dsg 1-Bindung diente ein Fusionsprotein aus den extrazellulären Domänen von Dsg 1 und dem Fc-Teil eines humanen IgG (Dsg 1-Fc).

Einzelmolekül-Kraftmessungen mit dem Atomkraftmikroskop (AFM) zeigten, dass die Stärke der homophilen Dsg 1-Bindung mit Abrisskräften von $\sim 37\text{--}68$ pN (bei Zuggeschwindigkeiten von $300\text{--}6000$ nm/s) in etwa denen anderer Cadherine entspricht. Bei höheren Zuggeschwindigkeiten und konstanter Interaktionszeit traten vermehrt Bindungsereignisse mit einem Vielfachen dieser ermittelten Kräfte auf. Das Abrissmuster der gemessenen Interaktionen deutet darauf hin, dass Mehrfachbindungen vorliegen. Zusätzliche Ergebnisse aus Messungen eines einzelnen transinteragierenden Moleküls bekräftigen die Vermutung, dass die Dsg 1-Moleküle sich mit mehreren Abschnitten überlappen und dass daraus multiple Abrissereignisse resultieren.

Die Untersuchungen der Ca^{2+} -Abhängigkeit der homophilen Dsg 1-Bindung mit dem AFM ergaben eine K_D von $0,79$ mM Ca^{2+} mit hoher Kooperativität (Hill Koeffizient $> 4,0$). Dagegen zeigten Messungen mit der Laserpinzette, bei denen die Anzahl der gebundenen mit Dsg 1 beschichteten Mikroperlen auf humanen Keratinozyten (HaCaT) bestimmt werden, eine deutlich höhere K_D ($1,6$ mM Ca^{2+}) bei vergleichbarer Kooperativität. Der Unterschied zu den AFM-Ergebnissen ist möglicherweise auf Effekte der multivalenten Bindungen oder auf heterophile Interaktionen von Dsg 1 mit anderen Desmocadherinen auf der Oberfläche der HaCaT-Zellen zurückzuführen.

Für die Entstehung von Hautblasen durch Dsg 1-Autoantikörper werden derzeit zwei Theorien diskutiert. Die eine geht davon aus, dass durch direkte sterische Blockierung der Dsg 1-vermittelten Adhäsion die Epithelzellen dissoziieren mit nachfolgender Blasenbildung. Die zweite Theorie postuliert, dass durch die Bindung von Auto-

antikörpern an den extrazellulären Abschnitt von Dsg 1 Signalwege in der Zelle ausgelöst werden, die zu Adhäsionsverlust und Blasenbildung führen.

Durch AFM und Laserpinzette wurde der Einfluss von Dsg 1-Autoantikörpern auf die durch Dsg 1 vermittelte Adhäsion untersucht. AFM-Messungen ergaben, dass PF-IgG-Fraktionen aus Seren von PF-Patienten die Dsg 1-Adhäsion nicht reduzierten. Wohingegen die Dsg 1-vermittelte Bindung durch einen inhibitorischen monoklonalen Antikörper gegen die externe Domäne von Dsg 1 gehemmt wurde.

Dagegen zeigten Laserpinzetten-Experimente an Zellkulturen, die mit Antikörpern inkubiert wurden, dass nicht nur der inhibitorische monoklonale Antikörper, sondern auch die PF-IgG-Fraktionen die Dsg 1-Bindung an endogenes Dsg 1 auf der Oberfläche der kultivierten Keratinozyten hemmten. Um zu untersuchen, ob für diese Hemmung der Dsg 1-Bindung zellabhängige Signalwege verantwortlich waren, wurden Mikroperlen bzw. Zellen mit PF-IgG vorinkubiert. Präinkubation der Keratinozyten mit PF-IgG führte zu einer starken Reduktion der Dsg 1-Adhäsion, Präinkubation der Mikroperlen mit PF-IgG hemmte die Bindung dagegen nicht.

Inkubationen von HaCaT-Kulturen mit PF-IgG (24 h) führten zu interzellulärer Lückenbildung in HaCaT-Kulturen. Die Lücken wurden von dünnen zytoplasmatischen Ausläufern überspannt, in denen Dsg 3 und das zytoskeletale Adapterprotein Plakoglobin nachweisbar waren. Die Dsg 1-Immunfärbung der Keratinozyten war nach PF-IgG-Inkubation insgesamt stark verringert. Diese durch PF-IgG verursachte Dissoziation der HaCaT-Zellen konnte durch Immunabsorption des Serums mit Dsg 1-beschichteten Mikroperlen verhindert werden. Inkubationen der HaCaT-Kulturen mit dem monoklonalen Dsg 1-Antikörper (24 h) lösten keine Lückenbildung aus.

Diese Experimente zeigen, dass PF-IgG die Dissoziation von Keratinozyten und die Reduktion der durch Dsg 1 vermittelten Adhäsion nicht direkt sterisch durch Blockierung der Bindung bewirkt. Dagegen scheinen durch Autoantikörper-Bindung ausgelöste zellabhängige Signalwege zu einer Reduktion der Zell-Zell-Haftung und zur Ausbildung des Pemphigus foliaceus-Phänotyps zu führen.

1.2. Summary

The autoimmune blistering skin disease pemphigus foliaceus (PF) is characterized by formation of autoantibodies against desmoglein1 (Dsg 1), a member of the cadherin superfamily found in desmosomes. Therefore characterization of the molecular mechanisms of Dsg 1-binding is of particular interest. To study the binding activity and calcium-dependency of the Dsg 1-mediated binding, a Dsg 1-Fc fusion protein was used. AFM-studies revealed that the binding activity of the homophilic Dsg 1 Transinteraction was about 37-68 pN (pulling velocity 300-6000 nm/s). This was similar to the binding activities of other members of the cadherin-family. Higher order unbinding forces increased with higher pulling velocities at constant interaction times. The unbinding pattern of the measured Dsg 1-interactions indicates multiple binding events. The results of measurements with one Dsg 1-molecule interacting with Dsg 1 affirmed these observations and indicate that the measured interactions are the result of overlap with multiple unbinding events. The Ca^{2+} dependency of Dsg 1 transinteraction was determined by two approaches, AFM and laser tweezer assay. The AFM studies measured binding activity of single molecules in a cell-free system, laser tweezer assays showed transinteraction of recombinant Dsg 1 with endogenous Dsg 1 expressed on the surface of cultured HaCaT-cells. The AFM studies revealed a pronounced cooperativity of Dsg 1-binding with a Hill coefficient > 4.0 and a Ca^{2+} -dependency of binding with an apparent K_D of 0.79 mM Ca^{2+} . However, Ca^{2+} dependency of the binding of beads coated with Dsg 1 to cultured keratinocytes displayed an apparent K_D of 1.6 mM Ca^{2+} but the same Hill coefficient of 4.0 . The difference in Ca^{2+} -dependency of binding obtained by laser tweezer assay and AFM may be explained by possible heterophilic transinteractions of Dsg 1-coated beads with the other desmocadherins of HaCaT cells.

Previous studies demonstrated that Dsg 1 antibodies in serum of PF patients are causative for PF pathogenesis. However, how Dsg 1-antibodies induce formation of epidermal blistering is unknown. At the moment two theories are discussed. It is possible that Dsg 1-mediated binding is inhibited by PF-IgG by steric hindrance. The other theory proposes that intercellular pathways are responsible for loss of Dsg 1 binding.

In this study PF-IgG did not interfere with homophilic transinteraction of recombinant Dsg 1 probed by atomic force microscopy, whereas an inhibitory monoclonal antibody abolished binding activity in this assay.

In contrast to transinteraction of single Dsg 1 molecules, cellular adhesion of Dsg 1-coated microspheres was inhibited by both PF-IgG and the monoclonal Dsg 1 antibody. However, pre-incubation of cells but not of beads with PF-IgG, resulted reduction of Dsg 1-mediated adhesion. When cultured human keratinocytes were incubated with PF-IgG for 24 h immunofluorescence staining revealed cell dissociation and loss of Dsg 1. In contrast, the inhibitory monoclonal Dsg 1 antibody did not affect monolayer integrity. By immunodepletion of Dsg 1 autoantibodies from the PF-IgG-fraction the disrupting effects of PF-IgG on keratinocytes were abolished showing that specific antibodies against Dsg 1 were responsible for these pathogenic activities.

These results indicate that PF-IgG reduce desmoglein-mediated adhesion by mechanisms other than steric hindrance. More likely, cellular signalling pathways are necessary for skin blistering and cell dissociation.

2. Einleitung

Bei vielen blasenbildenden Hauterkrankungen ist die Funktion und Struktur desmosomaler Adhäsionsproteine beeinträchtigt. Daher ist die Charakterisierung der Bindungseigenschaften desmosomaler Adhäsionsproteine sowie der Mechanismen, die zur Blasenbildung führen, von besonderer medizinischer Bedeutung. Zunächst sollen die theoretischen Grundlagen dieser Arbeit dargestellt werden.

2.1. Interzellularkontakte

Die meisten Zellen des Wirbeltier-Organismus bilden Kontakte zu benachbarten Zellen aus. Diese können vorübergehend oder dauerhaft zwischen Zellen gleichen (homotypisch) oder anderen (heterotypisch) Typs ausgebildet werden. Je nach Funktion, Morphologie und Molekularbau der Kontakte unterscheidet man Adhäsionskontakte, Kommunikationskontakte und Barrierenkontakte.

Adhäsionskontakte erfüllen überwiegend mechanische Funktionen. Die Zelladhäsionsmoleküle gewährleisten die Haftung zwischen benachbarten Zellen. Zelladhäsionsmoleküle sind meist integrale Membranproteine, deren extrazellulären Abschnitte mit gleichen (homophil) oder andersartigen (heterophil) Zelladhäsionsmolekülen der Nachbarzelle in Kontakt treten. Strukturell können die Adhäsionskontakte in Desmosomen und Adhärenskontakte eingeteilt werden.

2.2. Desmosomen

Desmosomen (Bindekörperchen, gr. Bindung; Körper, Bindekörperchen) wurden von Skerrow und Matoltsy 1974 aus der Epidermis des Rindes isoliert, wonach die Komponenten eines Desmosoms nach und nach identifiziert werden konnten (Skerrow & Matoltsy, 1974). Desmosomen besitzen, wie auch Adhärenskontakte, Zytoplasmaverdichtungen (Plaques) auf der zytoplasmatischen Seite der Zellen, die jedoch bei Desmosomen dichter sind (Drenckhahn, 2002). Desmosomen und Adhärenskontakte unterscheiden sich in der Verankerung im Zytoskelett. Während die Cadherine der Adhärenskontakte über Adaptorproteine der Cateninfamilie (β , γ , δ) an Aktinfilamente gebunden sind, werden die Desmocadherine (Desmogleine und Desmocolline) der Desmosomen über Plakoglobin (= γ -Catenin), Plakophilin und Desmoplakin an Intermediärfilamenten verankert (Abb.1) (Nollet et al., 2000). Des

Weiteren kommen Desmosomen hauptsächlich in Epithelien und im Herzmuskel vor, Adhärenskontakte dagegen zwischen Zellen aller Gewebe.

Desmosomen stellen fleckenförmige Kontakte mit einem mittleren Durchmesser von typischerweise 0,1-0,3 μm dar. Im Bereich dieser Kontakte ist der Interzellularspalt 20-30 nm breit und mit filamentärer Desmoglea, die sich zur Mitte zu einer Linie (Mesophragma) verdichtet, gefüllt. Die Desmoglea besteht hauptsächlich aus den extrazellulären Anteilen der Desmocadherine (Abb.1). Deren intrazellulären Anteile bilden zusammen mit den Plaqueproteinen Plakoglobin und Plakophilin die Außenzone der zytoplasmatischen Verdichtungszone (Plaque). Plakoglobin kommt nicht nur in Desmosomen vor, sondern ist auch in Adhärenskontakten vertreten. Die Verbindung zur plasmamembranfernen Innenzone, die Intermediärfilamente und Plectin beherbergt, wird von Desmoplakin gebildet. Desmoplakin bindet direkt an die desmosomalen Cadherine und an die in die Plaques einstrahlenden Bündel von Intermediärfilamenten (Abb.1). Die Intermediärfilamente der Epithelzellen gehören zur Familie der Zytokeratine (Kowalczyk et al., 1999; Nollet et al., 2000).

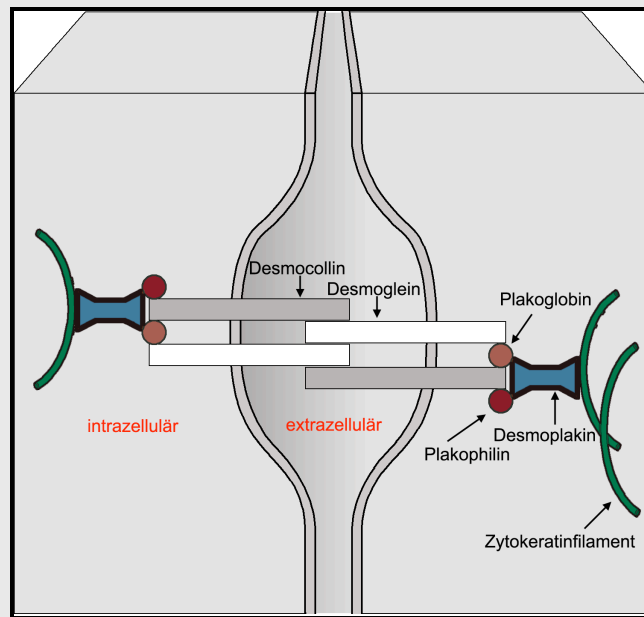


Abb. 1: Aufbau eines Desmosoms:

Die Abbildung zeigt schematisch den Aufbau eines Desmosoms. Die Desmocadherine Desmoglein und Desmocollin ragen in den interzellulären Raum und treten mit Desmocadherinen der Nachbarzelle in Kontakt. Die Desmocadherine bestehen aus einem extrazellulären, einem transmembranären und einem zyttoplasmatischen Anteil. Desmocadherine sind mit ihrer zyttoplasmatischen Domäne über die Adaptorproteine Plakoglobin, Plakophilin und Desmoplakin an Zytokeratinfilamente verankert.

2.3. Cadherine

Cadherine sind eine Großfamilie von Zelladhäsionsmolekülen, die in fünf Untergruppen untergliedert werden können. Sie spielen eine große Rolle bei der Aufrechterhaltung der Gewebestruktur und -integrität. Die Cadherine werden aufgrund von Sequenzhomologien in Typ-I Cadherine vom Typ der E, N-Cadherine (klassische Cadherine) und Typ-II Cadherine, wie zum Beispiel VE-Cadherin, unterteilt. Weitere Cadherine sind die desmosomalen Cadherine (Desmogleine und Desmocolline), die Protocadherine, die hauptsächlich im Nervensystem vorkommen und die Flamingo-Cadherine (atypische Cadherine) (Nollet et al., 2000). Die fünf Untereinheiten der extrazellulären Domänen der Cadherine (EC₁-EC₅) sind über vier Ca²⁺-Bindungsabschnitte miteinander verknüpft, die jeweils drei Ca²⁺-Ionen binden (Koch et al., 1999). Desmosomale und klassische Cadherine sind sich unter den Vertretern der Cadherin-Superfamilie am ähnlichsten. Ihre fünf extrazellulären Domänen ent-

halten die hochkonservierten Ca^{2+} -Bindungs-Motive Asp-X-Asp, Leu-Asp-Arg-Glu und Asp-X-Asn-Asp-Asn.

Die molekularen Adhäsionsflächen, die an der Interaktion zwischen Cadherinen beteiligt sind, sind noch nicht vollständig bekannt. Mutationsstudien und Versuche mit Antikörpern bzw. Peptiden, bei denen die Adhäsion inhibiert wurde, sprechen für eine Beteiligung von Tryptophan in Position 2 (W2) und einer Region mit einer konservierten HAV-Sequenz (Histidin-Alanin-Valin-Sequenz) der EC1-Domäne an der Adhäsion (Pertz et al., 1999; Chappuis-Flament et al., 2001). Strukturanalysen zeigten, dass vor allem die EC1-Domäne sowohl für die cis- als auch die Transinteraktion von Bedeutung ist. Cis-Interaktion bedeutet, dass Moleküle in gleicher Orientierung (parallel) miteinander interagieren, während bei der Transinteraktion die Moleküle in gegensätzlicher Orientierung (antiparallel) miteinander in Kontakt treten. Die cis-Interaktion führt zur Bildung von Dimeren innerhalb der Zellmembran, die Transinteraktion ist für die adhäsive Bindung zwischen Cadherinen benachbarter Zellen verantwortlich. Zunächst wurde angenommen, dass die Bindung von W2 an die HAV-Sequenz des Partnermoleküls zur Ausbildung von cis-Dimeren führt. Diese Cadherin-Dimere sollen durch Transinteraktion mit Dimeren benachbarter Zellen eine gestreckte, reißverschlussartige Anordnung bilden (Shapiro et al., 1995). Dieses Modell, das anhand von Röntgenstrukturanalysen an isolierten EC1-Domänen von N-Cadherin entworfen wurde, ist von der gleichen Arbeitsgruppe aufgrund von Untersuchungen an kompletten Extrazellulärdomänen von C-Cadherin modifiziert worden. Es zeigte sich, dass der symmetrische Austausch des W2 direkt zur Ausbildung von EC1-trans-Dimeren führt, für die eine cis-Interaktion nicht notwendig ist (Boggon et al., 2002). Aufgrund der Krümmung der extrazellulären Domänen kommt durch die Bindung der EC1 an die EC2 eines benachbarten Moleküls zusätzlich eine cis-Interaktion zustande. Übereinstimmend mit diesem Modell wurde in einer elektrentomographischen Strukturanalyse nativer Desmosomen eine trans-Dimerisierung vorgeschlagen. Dabei können die Desmocadherine eine S- oder W-förmige Anordnung eingehen. Zusätzlich kann auch über das W2 ein drittes Molekül eingebunden werden, wodurch eine knotenartige Oligomerisierung entsteht (He et al., 2003). Andere Untersuchungen führten zu der Annahme, dass sowohl cis- als auch trans-Dimerisierung über die EC1-Domäne vermittelt werden, wobei aufgrund von Mutationsanalysen berichtet wurde, dass W2 nicht direkt mit dem Partnermolekül intera-

giert, sondern durch Bindung an die HAV-Tasche desselben Moleküls erst die Adhäsionsfläche für die Transinteraktion freigelegt würde (Pertz et al., 1999). Im Gegensatz zu den Modellen, die basierend auf Strukturanalysen entwickelt wurden, deuten funktionelle Interaktionsstudien Überlappung zwischen Cadherin-Molekülen an. Kraftmessungen mit Cadherin-beschichteten Oberflächen zeigten Transinteraktionen überlappender Cadherine. Man nimmt an, dass die EC1-Domäne nicht nur an die EC1-Domäne, sondern auch an EC3 und EC5 des transinteragierenden Cadherins binden kann, und dass diese stärkere Überlappung der Moleküle für eine starke Adhäsion notwendig ist (Sivasankar et al., 2001; Zhu et al., 2003).

2.4. Desmocadherine

In Desmosomen findet man zwei verschiedene Untergruppen der Cadherine, die Desmogleine und die Desmocolline. Zunächst galt der Name Desmoglein für alle desmosomalen Glykoproteine, 1984 führten Cowin et al. den Namen Desmocolline ein, aufgrund des Unterschieds zu den Desmogleinen (Cowin et al., 1984). 1990 identifizierten Koch et al. die Desmogleine als Mitglied der Cadherin-Familie (Koch et al., 1990). Heute unterscheidet man bei den Desmocadherinen jeweils drei Untergruppen, Desmoglein 1-3 (Dsg 1-3) und Desmocollin 1-3 (Dsc 1-3). Bei den Desmocollinen findet man zusätzlich Formen mit langen (Dsc-a) und kurzen (Dsc-b) zytoplasmatischen Domänen (Garrod, 1993). Die verschiedenen Desmogleine und Desmocolline unterscheiden sich in ihrem Vorkommen in menschlichem Gewebe. So kommen Dsg 2 und Dsc 2 in allen Desmosomen-ausbildenden Geweben vor, in mehrschichtigen Plattenepithelien vor allem in den basalen Schichten (Schafer et al., 1994). Dsg 1 und 3 und Dsc1 und 3 sind hauptsächlich in mehrschichtigen Plattenepithelien und wenigen anderen Epithelien zu finden. So findet man diese sowohl in der Epidermis als auch in der Mundschleimhaut und im Thymusepithel (Dsg 1), in den Zungenpapillen (Dsc 1) und in Myoepithel-Zellen der Brustdrüse (Dsc 3). In der Epidermis ist Dsg 1 zwar in allen Schichten, jedoch hauptsächlich im oberen Stratum spinosum und Stratum granulosum lokalisiert. Dsg 3 kommt dagegen hauptsächlich im Stratum basale und im unterem Stratum spinosum vor (Arnemann et al., 1993). Im unverhornten mehrschichtigen Plattenepithel der Mundschleimhaut überwiegt Dsg 3. Bezüglich der Rolle der Desmocadherine Dsg 1 und Dsg 3 in der Pathogenese von

Pemphiguserkrankungen ist die Verteilung der Proteine in der Epidermis von großer Bedeutung (s.u.).

Die Desmocadherine lassen sich, wie alle Cadherine, in einen extrazellulären, transmembranären und einen zytoplasmatischen Anteil untergliedern. Der N-terminale extrazelluläre Anteil besteht aus den fünf extrazellulären Cadherin-Domänen (EC1-5), mit je etwa 110 Aminosäuren, wobei EC 1-4 homolog sind. Die Domänen sind über Ca^{2+} -bindende Sequenzabschnitte miteinander verbunden (Nollet et al., 2000). Die erste N-terminale extrazelluläre Domäne (EC 1) der Desmocolline und Desmogleine weist die Zell-Adhäsions-Sequenz (CAR=Cell Adhesion-Recognition) mit dem W2 und einem zentralen Alanin-Rest, auf. Während bei den meisten klassischen Cadherinen in diesem Bereich das Tripeptid HAV (Histidin/Alanin/Valin) zu finden ist, sind bei Dsg 1 und Dsc 1 hier die Tripeptidsequenzen YAT (Thyrosin/Alanin/Threonin) und RAL (Arginin/Alanin/Leucin) lokalisiert (Buxton & Magee, 1992). Die membranproximale zytoplasmatische Domäne (MPCD) ist bei Dsg 1 deutlich kürzer. Die zytoplasmatische Domäne der Desmogleine 1-3 dagegen ist länger als bei anderen Cadherinen. In ihr finden sich eine intrazelluläre Anker-Subdomäne, eine Catenin-Bindungssequenz, ein prolinreiches Verbindungsstück, eine typische Wiederholungs-Domäne und eine terminale Domäne. Desmocolline besitzen zytoplasmatisch lediglich die Catenin-Bindungssequenz (Nollet et al., 2000). Das C-terminale Ende der zytoplasmatischen Domäne ist über Adaptorproteine (Plakoglobin, Plakophilin und Desmoplakin) an Zytokeratinfilamenten verankert.

Wie oben bereits erwähnt, werden verschiedene Modelle bezüglich der Transinteraktion diskutiert. Während die Bindungspartner anderer Cadherine bereits gut charakterisiert sind, werden die der Desmocadherine noch diskutiert. Für klassische Cadherine wird eine homophile Calcium-abhängige Zell-Zell-Adhäsion allgemein angenommen (Leckband & Sivasankar, 2000; Chappuis-Flament et al., 2001; Zhu et al., 2003). Zwischen Desmogleinen und Desmocollinen wurden auch heterophile Interaktionen diskutiert (Chitaev & Troyanovsky, 1997; Syed et al., 2002).

2.5. Klinische Bedeutung der Desmocadherine

Bei verschiedenen Hauterkrankungen sind Funktion und Struktur der Desmocadherine beeinträchtigt. Diese Erkrankungen sind teils genetisch bedingt, teils durch Autoantikörper und Bakterientoxine ausgelöst. Die einzig bekannte, genetisch bedingte Erkrankung beruht auf einer Deletion des aminoterminalen Bereichs von Dsg 1 und äußert sich in Form einer palmoplantaren Keratodermie (Hennies et al., 1995; Rickman et al., 1999; Whittock & Bower, 2003).

Das Staphylococcus scalded skin syndrome (SSSS) sowie die bullöse Impetigo zählen zu den infektiös bedingten Hauterkrankungen. Das Krankheitsbild wird ausgelöst durch das Exfoliative Toxin, das von Staphylokokkus aureus gebildet wird. SSSS war früher auch unter den Namen Dermatitis exfoliativa neonatorum, Pemphigus neonatorum und Morbus Ritter von Rittershain (1878), benannt nach dem Entdecker der Erkrankung, bekannt. Staphylokokkus aureus befindet sich bei der bullösen Impetigo im Bereich der Hautläsion, bei dem SSSS lösen extrakutan lokalisierte Staphylokokken-Herde, durch Bildung der exfoliativen Toxine, das Krankheitsbild aus. SSSS tritt vor allem bei Neugeborenen und Kleinkindern auf und beginnt mit einer Hautrötung, schnell gefolgt von einer schweren generalisierten Hautschädigung mit flächenhafter Epidermolyse. Die Ablösung tritt in den oberen Schichten der Epidermis im Bereich des Stratum granulosum auf (Amagai, 2003). Masayuki Amagai entdeckte, dass das exfoliative Toxin eine Protease ist und Desmoglein 1 zwischen EC 3 + 4 spaltet wodurch die Ablösung der Hautschichten verursacht wird. Gleiches konnte auch für die bullöse Impetigo nachgewiesen werden.

Die autoimmun bedingten Hauterkrankungen, an deren Pathogenese Desmocadherine beteiligt sind, sind die Pemphiguserkrankungen.

2.6. Pemphiguserkrankungen

Der Pemphigus ist eine lebensbedrohliche blasenbildende Autoimmunerkrankung der Haut und der Schleimhäute. Der Begriff Pemphigus stammt von dem griechischen Wort Pemphix (Blase) und wurde 1791 erstmals im Zusammenhang mit blasenbildenden Hautkrankheiten verwendet. Die Unterscheidung der Pemphigus- von Pemphigoiderkrankungen erfolgte 1953 durch Lever anhand klinischer und histologischer Beobachtungen (Lever, 1953). 1964 gelang Beutner und Jordan der

Nachweis von Autoantikörpern, die gegen intraepidermale Antigene gerichtet waren, im Serum von Pemphiguspatienten (Beutner & Jordon, 1964). Später wurde der Pemphigus zunächst in Pemphigus vulgaris und Pemphigus foliaceus eingeteilt. Nachdem sich mit Hilfe immunpathologischer und molekularbiologischer Methoden die Autoantikörper der Patienten näher charakterisieren ließen, konnten weitere Pemphiguserkrankungen abgegrenzt werden. Alle Pemphiguserkrankungen haben gemein, dass Autoantikörper gebildet werden, die gegen desmosomale Strukturproteine gerichtet sind. Die Antikörper führen zu Adhäsionsdefekten innerhalb der Epidermis und somit zur Blasenbildung. Die Spaltbildung tritt hauptsächlich in der Hautschicht auf, in der das Zielantigen lokalisiert ist. Pemphiguserkrankungen sind relativ selten. Genaue Angaben zur Inzidenz sind nicht verfügbar, Angaben zu jährlichen Neuerkrankungen schwanken zwischen 0,1–5 auf 100 000 Einwohner, je nach Pemphigustyp und Ethnologie der Bevölkerung (Zillikens, 2000). Der Pemphigus betrifft vor allem Menschen mittleren Alters und tritt bei beiden Geschlechtern gleich häufig auf. Es scheint eine genetische Prädisposition für Pemphigus vulgaris zu geben, die durch Einwirkung weiterer Faktoren zur klinisch manifesten Erkrankung führen (Brandsen et al., 1997). Bei Menschen macht der Pemphigus vulgaris 80 % der Pemphiguserkrankungen aus.

Pemphigus vulgaris (PV) ist gekennzeichnet durch schlaffe Blasen in der Haut und Schleimhaut. Bei PV-Patienten findet man die ersten Läsionen häufig in der Mundschleimhaut. Histologisch ist eine Akantholyse mit suprabasaler Spaltbildung zu sehen (Beutner & Jordon, 1964). Zielantigen der Autoantikörper des PV ist Dsg 3 das, wie oben ausgeführt, hauptsächlich basal und suprabasal vorkommt (Amagai et al., 1991). Weitere Zielantigene der Antikörper im Serum von PV-Patienten sind Dsg 1, Desmocolline und Plakoglobin (Emery et al., 1995; Hashimoto et al., 1995). Dass bei einer Erkrankung Antikörper gegen mehrere Zielantigene auftreten, wird unter anderem durch „epitop spreading“ erklärt, wobei Proteine oder Proteinabschnitte durch die Gewebedestruktion im Verlauf der Erkrankung demaskiert und ebenfalls zum Ziel der Immunantwort werden können (Chan et al., 1998). Häufig ist bei PV nur die Schleimhaut betroffen. Ob zusätzlich Läsionen in der Haut sichtbar sind, steht laut Ding et al. (1997) im Zusammenhang mit den im Serum betroffener Patienten vorkommenden Autoantikörpern. So konnte man im Serum von Patienten, bei denen klinisch Haut- und Schleimhaut betroffen sind, zusätzlich zu Antikörpern gegen Dsg 3 auch gegen

Dsg 1-gerichtete Antikörper nachweisen. Bei Patienten, denen Hautläsionen fehlten, gab es keine Antikörper gegen Dsg 1 (Shirakata et al., 1998; Mahoney et al., 1999). Basierend auf dieser Erkenntnis begründeten Amagai et al. (1999) die Desmoglein-Kompensationstheorie. Demnach entstehen, wenn nur Autoantikörper gegen Dsg 1 vorhanden sind, Blasen in den oberen Hautschichten. Das Fehlen der Dsg 1-Bindungen wird in den unteren Schichten von Dsg 3 kompensiert. Umgekehrt treten bei Vorkommen von Autoantikörpern gegen Dsg 3 Akantholyse und Blasen nur in Schichten auf, in denen der Verlust von Dsg 3 nicht kompensiert werden kann (Abb.2). Sind Autoantikörper gegen Dsg 1 und Dsg 3 vorhanden, kann der Verlust nicht kompensiert werden und es treten sowohl Haut- als auch Schleimhautläsionen auf.

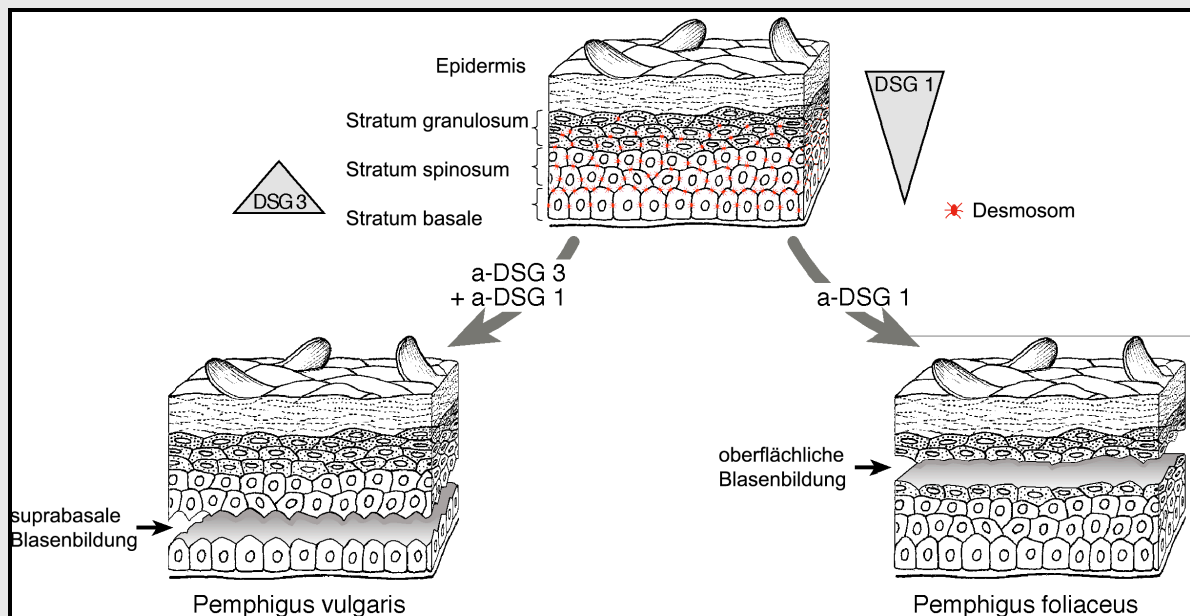


Abb. 2: Spaltbildung in der Epidermis bei Pemphigus vulgaris und Pemphigus foliaceus

In verhornender Epidermis ist Dsg 1 (Zielantigen bei PF) vor allem im Stratum granulosum und Stratum spinosum lokalisiert. Das Vorkommen nimmt zum Stratum basale hin ab. Die Dsg 3-Verteilung (Zielantigen PV) verhält sich umgekehrt. Bei PV kommt es zu suprabasaler Spaltbildung. Oberflächliche Spaltbildung wird bei PF beobachtet. Die Spaltbildung korreliert mit der Verteilung der Antigene in der Epidermis, gegen welche die Autoantikörper gerichtet sind.

Pemphigus foliaceus (PF)-Patienten entwickeln schlaaffe Blasen, die sich schnell eröffnen und Erosionen und Schuppungen hinterlassen (Abb.3). Die Blasen finden sich vor allem im Gesicht und am Oberkörper sowie in seborrhoischen Arealen. Im Gegensatz zum PV sind die Schleimhäute beim PF nicht betroffen. Die Spaltbildung liegt vor allem im Stratum granulosum der Epidermis (Abb.2) (Beutner & Jordon et al., 1964). In diesem Bereich erkennen PF-Patientenseren Dsg 1 (Koch et al. 1990, Wheeler et al., 1991). Weiterhin findet man in einigen Patientenseren auch Autoantikörper gegen Dsg 3, Desmoplakine und Plakoglobin, deren pathogenetische Bedeutung nicht geklärt ist (Korman et al., 1989; Joly et al., 1997).

In bestimmten Regionen Südamerikas ist eine Sonderform des **Pemphigus foliaceus** bekannt: Der **endemische Pemphigus foliaceus**, der dadurch gekennzeichnet ist, dass er familiär gehäuft, vermehrt bei Kindern, vor allem in ländlichen Regionen und verstärkt entlang von Gewässern auftritt. Man assoziiert das endemische Auftreten außerdem mit der Verbreitung einer bestimmten Stechfliegenart (Diaz et al., 1989). Der **paraneoplastische Pemphigus** wird seit 1997 als eigenständige Krankheit vom **Pemphigus vulgaris** abgegrenzt. Hier treten schwere Mundschleimhauterosionen mit polymorphen Hautveränderungen, die auch ohne Blasen auftreten können, zusammen mit einer malignen Erkrankung auf (Anhalt et al., 1997).

Pemphiguserkrankungen wurden auch von Tieren berichtet. Im Gegensatz zum Menschen ist PV bei Tieren sehr selten. In der veterinärmedizinischen Literatur sind für domestizierte Tierarten nur etwa 50 Fälle beschrieben, darunter Hunde, Katzen und Pferde. Hunde und Katzen mit **Pemphigus vulgaris** zeigen vesikobullöse Veränderungen, die rasch in Erosionen und Ulzerationen übergehen. Diese Veränderungen sind in der Maulhöhle, an den Übergängen von Haut zu Schleimhaut (alle Körperöffnungen betroffen) und auf der Haut lokalisiert. Nicht selten ist auch das Nagelbett betroffen. Sekundärinfektionen sind häufig. (Olivry, 2001)

PF ist unter Tieren weitaus häufiger verbreitet und wurde bei Hunden, Katzen, Pferden und Ziegen diagnostiziert. Bei Hunden konnte man eine Rassedisposition für Chow Chow und Akita-Rassen feststellen. In der Regel erkranken erwachsene Tiere, jedoch entwickeln manche Tiere die Krankheit auch schon im Alter von unter einem Jahr. Beim Hund entstehen die ersten Hautläsionen in der Regel auf oder oberhalb des Nasenspiegels, wobei häufig die normale Pigmentierung verloren geht (Abb.4). Anschließend sind Areale um Augen und Ohren betroffen, gelegentlich auch der

ganze Körper. Auch die Pfotenballen (Hyperkeratose) und das Krallenbett sind häufig befallen. Die Läsionen sind meist bilateral und symmetrisch. Wie auch beim Menschen ist die Schleimhaut nicht betroffen. Pemphigus foliaceus bei Tieren unterscheidet sich zu dem des Menschen in der Art der Blasen. Bei Hunden bilden sich nicht oberflächliche Blasen, die leicht ruptieren, sondern meist Pusteln (mit Eiter gefüllte Blasen). Diese können recht groß werden und konfluieren. Die Pusteln trocknen aus und hinterlassen oberflächliche Erosionen. Katzen entwickeln ein ähnliches Krankheitsbild, wobei die Läsionen vermehrt nur im Kopfbereich zu finden sind. Pferde und Ziegen entwickeln großflächige Krusten, die Läsionen erscheinen generalisierter als bei Kleintieren (Olivry, 2001).



Abb. 3: PF Mensch

Am Rücken finden sich mehrere Blasen sowie Erosionen unterschiedlicher Größe mit Blasenresten und Krusten. Ein in dieser Arbeit verwendetes PF-IgG stammte von dieser Patientin.



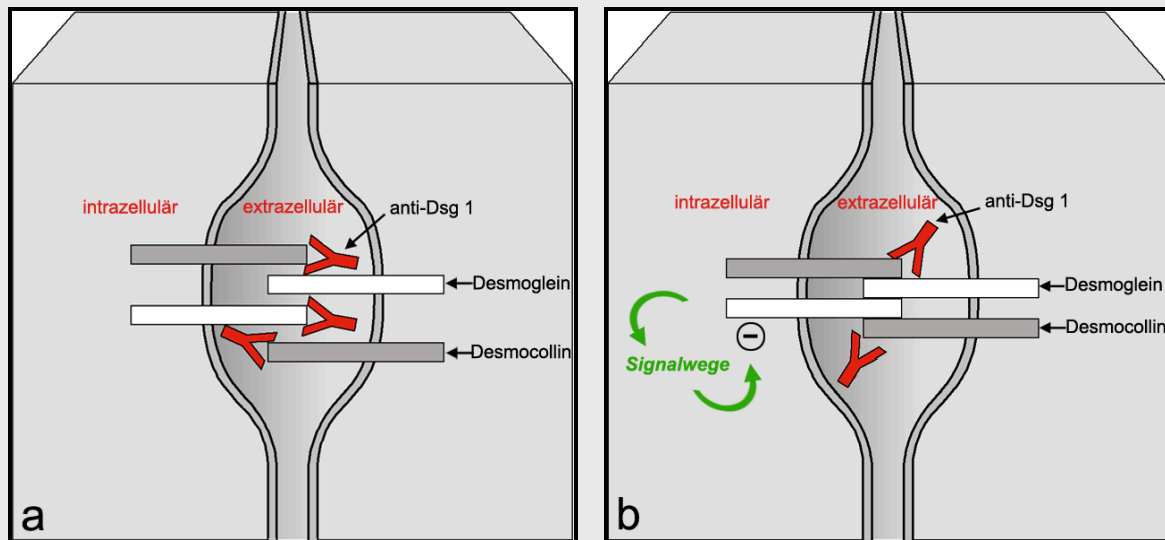
Abb. 4: PF Hund

Typische Läsionen und Depigmentierung des Nasenspiegels bei PF des Hundes.

2.7. Zielsetzung

Desmocadherine spielen bei der Entstehung von blasenbildenden Hauterkrankungen eine wichtige Rolle. Es gilt als erwiesen, dass die Blasenbildung in der Haut von Pemphiguspatienten durch Autoantikörper gegen Desmocadherine verursacht wird. (Stanley et al, 1982/1984; Amagai et al., 1992/1995). Die genauen Mechanismen, die der Blasenbildung zugrunde liegen, sind jedoch unklar. Daher sind die therapeutischen Möglichkeiten zur Behandlung von Pemphigus-erkrankungen auf Immunsuppression (u.a. durch Kortisonpräparate) und eine Reduktion zirkulierender Autoantikörper durch Plasmapharese beschränkt.

In dieser Arbeit werden zunächst die molekularen Bindungseigenschaften von Dsg 1, wie Adhäsionsstärke, Lebensdauer und Ca^{2+} -Abhängigkeit der Dsg 1-vermittelten Bindung, untersucht. Weiterhin sollen Untersuchungen einen tieferen Einblick in die Pathogenese der Pemphiguserkrankungen liefern. In der Literatur sind zwei Theorien beschrieben, wie es durch Autoantikörper zur Bildung von Hautblasen kommen kann. Zum einen sollen Autoantikörper die Dsg-vermittelte Bindung durch sterische Blockierung direkt herabsetzen (Abb.5, links). Die zweite Theorie postuliert, dass Autoantikörper indirekt, durch die Induktion intrazellulärer Signalwege, die Dsg 1-Bindung hemmen und auf diesem Wege die Entstehung von Hautblasen hervorrufen (Abb.5, rechts). Mit AFM und Laserpinzette sollen die Mechanismen zur Entstehung von Hautblasen bei PF charakterisiert und der Einfluss von PF-IgG auf kultivierte Keratinozyten untersucht werden. Mit diesem experimentellen Ansatz soll geklärt werden, ob die sterische Blockierung der Dsg 1-Bindung durch Autoantikörper im Serum von PF-Patienten ausreicht oder ob zellabhängige Signalwege für die Genese des PF die entscheidende Rolle spielen.



PF durch sterische Blockierung

PF durch Signalwege der Zelle

Abb. 5: Theorien zur Entstehung von Hautblasen bei Pemphiguserkrankungen

Dsg 1-Antikörper binden an Dsg 1 und lösen den Kontakt zwischen den Desmocadherinen benachbarter Zellen. Die direkte Bindung des Antikörpers reicht aus, um die Bildung von Blasen zu verursachen (Abb. a).

Die Bindung des Antikörpers an Dsg 1 löst Signalwege in der Zelle aus, die zur Destabilisierung der Adhäsionskontakte führen. Erst durch das Auslösen dieser Signalwege entstehen Hautblasen (Abb. b).

3. Material

3.1. Lebendmaterial

3.1.1. Zellkulturen

3.1.1.1. Kulturzellen

Chinese-Hamster-Ovary-Zellen (CHO)

CHO ist die Abkürzung für "Chinese Hamster Ovary" Zellen die 1958 aus einer syrischen Hamsterart isoliert wurden (Puck, 1958). Diese Zellen eignen sich aufgrund ihrer hohen Proliferations- und Expressionsrate besonders gut zur Transfektion.

Humane Keratinozyten (HaCaT)

Bei der Zelllinie HaCaT (*human adult low calcium temperature keratinocytes*) handelt es sich um spontan immortalisierte humane Keratinozyten (Boukamp, 1988). Sie wurden freundlicherweise von Prof Fusenig (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Zu Beginn ihrer Entwicklung sind HaCaT-Zellen stark von einer genau eingehaltenen Temperatur und Ca^{2+} -Konzentration abhängig. Die Zellen sind jedoch nach etwa 10 Passagen relativ unempfindlich gegenüber veränderten Wachstumsbedingungen. Die Zelllinie ist aufgrund ihrer gleich bleibenden Replikations- und Proliferationsraten einfach zu handhaben.

3.1.1.2. Bakterien

Stamm	Genotyp	Referenz	Verwendungszweck
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Δ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1 endA1 gyrA96</i> <i>thi-1 relA1</i>	Hanahan, 1983	Transformation

Die DH5 α -Bakterien wurden von der Firma Invitrogen, Carlsbad bezogen.

3.2. Medien und Platten

3.2.1. Medium für die Kultivierung von Zellen

Als Kultivierungsmedium für die CHO- und HaCaT-Zellen diente Dulbeccos modified Eagle medium (DMEM) (life technologies, Karlsruhe). Das Medium wurde mit 10 % FCS und 50 U/ml Penicillin/Streptomycin supplementiert.

3.2.2. Medien und Platten für die Kultivierung von Bakterien

Die Medien wurden wie folgt hergestellt:

LB-Medium	10 g Casein-Hydrolysat (Bacto-Tryptone) 5 g Hefeextrakt (Bacto-Yeast) 10 g NaCl ad 1 l mit H ₂ O pH 7,5; Autoklavieren
LB-Plattenmedium	wie LB-Medium, nur vor dem Autoklavieren 15 g Agar je Liter Medium einwiegen; nach dem Autoklavieren abkühlen lassen, nach Bedarf Antibiotika zugeben und gießen
SOB-Medium	20 g Casein-Hydrolysat (Bacto-Tryptone) 10 g Hefeextrakt (Bacto-Yeast) 0,5 g NaCl in 950 ml H ₂ O lösen, 10 ml 250 mM KCl zugeben pH 7,0; Autoklavieren
SOC-Medium	wie SOB-Medium und zusätzlich mit 20 ml einer 1 M Glukoselösung supplementiert

3.3. Zusätze für Medien und Agarplatten

verwendete Endkonzentrationen:

100 µg/ml	Ampicillin
25 µg/ml	Kanamycin
1,2 µg/ml	Geneticin, G418
50 U/l	Penicillin
50 U/l	Streptomycin

Stammlösungen:

100 mg/ml in H ₂ O, sterilfiltriert
50 mg/ml in H ₂ O, sterilfiltriert
50 µg/ml
12,87 g/ml in PBS, pH 5,5
6,01 g/ml in PBS, pH 5,5

Die Stammlösungen wurden bei –20° C gelagert.

Die Zugabe der Antibiotika erfolgte jeweils nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums oder beim Giessen der Agarplatten.

3.4. Puffer und Lösungen

Verwendete Puffer und Lösungen, die selbst angesetzt wurden:

Agaroselösung: 0,8 % Agarose in 1 x TBE aufkochen	Blotpuffer: 25 mM Tris 195 mM Glycin 20 % Methanol 0,1 % SDS
Coomassie-Lösung: 2,5 g Coomassie Brilliant Blau G 250 454 ml Isopropanol 92 ml Eisessig H ₂ O ad 10 l	Coumarinsäure: 90 mM Coumarinsäure in DMSO
ECL-Lösung I: 1 ml Luminol 0,44 ml Coumaric-Acid 10 ml 1 M Tris/HCl, pH 8,5 H ₂ O ad 100 ml	ECL-Lösung II: 64 µl 30 % H ₂ O 10 ml 1 M Tris/HCl, pH 8,5 H ₂ O ad 100 ml
Luminol: 250 mM 3-Aminophthalhydrazid in DMSO	5 x PBS: 400,3 g NaCl 10 g KCl 65,3 g Na ₂ HPO ₄ H ₂ O ad 10 l
PBS/EDTA: 0,5 % EDTA in PBS	PBS-Tween: 1,0 g Tween 20 1 l PBS
Ponceau-Lösung: 5 g Ponceau S 30 g Trichloressigsäure H ₂ O ad 1 l	

Material	
3 x Probenpuffer: 0,454 g Tris 1,2 g SDS 7,56 g Glycerin, pH 6,0 400 µl Bromphenolblau H ₂ O ad 20 ml (30 mg DTT)	6 x Probenpuffer: 0,2 ml 100 mM EDTA, pH 8,0 10 g Glycerin 30 mg Bromphenolblau 50 mg Xylencyanol H ₂ O ad 20 ml
SDS-Sammelgel 5 %: 3,1 ml H ₂ O 0,6 ml 30 % Acrylamid 1,3 ml 0,5 M Tris, pH 6,8 50 µl 10 % SDS 15 µl APS 7,4 µl TEMED	SDS-Trenngel 7,5 %: 4,05 ml H ₂ O 3,35 ml 30 % Acrylamid 2,5 ml 1,5 M Tris, pH 8,8 100 µl 10 % SDS 30 µl APS 15 µl TEMED
Trypsin: 0,05 % Trypsin 0,02 % EDTA in PBS	10 x TBE: 50 mM Tris/HCl 50 mM Borsäure 2,5 mM EDTA

3.5. Molekulargewichtstandards

Lambda DNA/Eco91I (*Bst*II) Marker; Fermentas, St. Leon-Rot

8453 bp
7242 bp
6369 bp
5687 bp
4822 bp
4324 bp
3675 bp
2323 bp
1929 bp
1371 bp
1264 bp
702 bp

Prestained protein ladder (PPL); Fermentas, St. Leon-Rot

180 kDa
130 kDa
100 kDa
73 kDa
54 kDa
50 kDa
35 kDa
24 kDa
16 kDa
10 kDa

3.6. Enzyme

<i>Bg</i> III	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Kpn</i> I	Fermentas, St. Leon-Rot
T ₄ -Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot

Die Enzyme wurden, soweit nicht anders angegeben, jeweils mit den vom Hersteller gelieferten Standardpuffer unter den angegebenen Reaktionsbedingungen eingesetzt.

3.7. Vektoren, Plasmide und Primer

3.7.1. Vektoren

Als eukaryontischer Expressionsvektor diente pEGFP-N₃. Dieser Vektor wurde von Clontech, Palo Alto, CA bezogen und enthält eine Kanamycin-Resistenz.

3.7.2. Plasmide

Das verwendete Plasmid wurde als pEV-mod-Dsg 1-Fc bezeichnet. Die Dsg 1-Fc-Sequenz setzte sich aus den extrazellulären Domänen von Dsg 1 und dem Fc-Teil eines humanen IgG zusammen, an das zusätzlich ein Histidin-Rest angehängt war. Das Plasmid wurde uns freundlicherweise von Masayuki Amagai (Kelomedical school, Tokyo, Japan) zur Verfügung gestellt.

3.7.3. Sequenzierungsprimer

Die Dsg 1-Fc-Sequenz wurde nach Umklonierung in pEGFPN₃ komplett überprüft. Im Folgenden sind die hierfür verwendeten Primer, die erstellt wurden, aufgeführt:

Name:	Sequenz:
Dsg 1-ab672 Gen	5`-CCC TCC AGT GTT TTC AAT GG-3`
Dsg 1-ab1179Gen	5`-GAA TGA AAG AAC AAA TGT GGG-3`
Dsg 1-ab1681Gen	5`-GAC AGG ACT AAT ACA GAG CC-3`

Des Weiteren wurden die Primer CMV-forward und pEGFPN₁-reward, die von der Firma MWG zur Verfügung gestellt wurden, verwendet.

Name:	Sequenz:
CMV-forward	5`CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG-3`
pEGFPN ₃ -reward	5`GTC CAG CTC GAC CAG GAT G-3

3.8. Anwendungssätze

Plasmidaufreinigung	NucleoSpin, Marchery-Nagel, Düren
Gelextraktion	DNA Extraktion Kit, MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Transfektion	Effectene, Qiagen, Hilden

3.9. Stabil transfizierte Zell-Klone

Die CHO-Zelllinie wurde mit einem Plasmidkonstrukt transfiziert, dass die extrazellulären Domänen von Desmoglein 1, den Fc-Teil eines humanen Immunglobulin G und einen Histidin-Rest enthält. Die Transfektion und Selektion erfolgte wie unter 3.2.5. beschrieben.

3.10. Chemikalien

Acrylamid, reinst	Serva, Heidelberg
Acrylamidlösung, 40 %	Roth, Karlsruhe
Agarose	GIBCO BRL, Eggenstein
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Bacto-Agar	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Bacto-Trypton	GIBCO BRL, Eggenstein

Material

Bacto-Yeast	BD Biosciences, Heidelberg
Borsäure	AppliChem, Darmstadt
Bradford-Reagenz	Roth, Karlsruhe
BSA	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	AppliChem, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau R250	Merck, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
Dithioreitol (<i>DTT</i>)	Roth, Karlsruhe
Dimethyl-pimelimidat-dihydrochlorid (DMP)	Pierce, Rockford
Dimethylsulfoxid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamin-Tetraessigsäure(EDTA)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol, reinst	Roth, Karlsruhe
Ethanolamin	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Genitacin, G418	PAA, Cölbe
Glukose	AppliChem, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
HBSS	AppliChem, Darmstadt
HEPES	Serva, Heidelberg
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogensulfat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	ICN Biomedicals Inc, Aurora
Magnesiumchlorid	AppliChem, Darmstadt
2-Morpholinoethan-Sulfonsäure (MES)	Roth, Karlsruhe
Methanol, reinst	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	privat
Natriumacetat	AppliChem, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
NHS-Biotin	Pierce, Rockford
Normal goat serum (NGS)	Sigma, Deisenhofen
N-propyl-gallat (NPG)	Sigma, Deisenhofen

Material	
Salzsäure	AppliChem, Darmstadt
N-Succinimidyl3-(acetylthio)propionat (<i>SATP</i>)	Fluka Chemie, Buchs
SDS	Serva, Heidelberg
N',N',N',N',-Tetrametrylethylen- diamin (<i>TEMED</i>)	Roth, Karlsruhe
Polyethylenglycol (PEG 800)	Prof Gruber, Universität Linz
Penicillin	Sigma, Deisenhofen
Phenol-Chloroform-Lösung	Rotiphenol; Roth, Karlsruhe
Proteaseinhibitoren:	AppliChem, Darmstadt
Aprotinin	
Pepstatin	
Leupeptin	
Streptomycin	Sigma, Deisenhofen
Tris	AppliChem, Darmstadt
Triton-X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypsin	Serva, Heidelberg
Tween 20	Merck, Darmstadt

3.11. Verbrauchsmaterialien, Antikörper/Patientenseren, Geräte

3.11.1. Verbrauchsmaterialien

AFM–Glimmerplatten	MICA V5; SPI supplies, München
AFM–Nadeln	Coated Microlever; Veeco Metrology Group, Mannheim
Dialyseschläuche	Zellutrans; Roth Karlsruhe
Eppendorfgefäße	Eppendorf, Hamburg
Gasflammer	Gasi; Schütt, Göttingen
Gelatinekapseln	W. Plannet GmbH, Wetzlar
Gel Blotting Filterpapier	Whatman, Middlesex
Glaswaren	Schott, Wertheim
Handschuhe	Kimberly-Clark, Mainz
Frischhaltefolie	Dow, Midland

Material	
Kryoröhrchen	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Latexperlen	Interfacial Dynamics, Portland
Nitrylhandschuhe	Ansell Protective Products, Coshoc-ton
Nitrocellulosemembran	Amersham, Braunschweig
Papier	Kimwipes; Kimberly-Clark, Mainz
Parafilm	Pechiney plastic packaging, Menasha
Petrischalen (div. Größen)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Photolaborchemikalien	Kodak, Paris
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
Plastikpipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Plastikreaktionsgefäße (div. Größen)	Eppendorf, Hamburg
Plastikröhrchen (div. Größen)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Polaroidfilme	Polaroid, Enschede
Protein-A-Mikroperlen	Dynal, Oslo
Protein-A-Agarose	Oncogene, Darmstadt
Protein-A-Säule:	
Filter	Mo Bi Tec, Göttingen
Spritze	B Braun, Melsungen
Röntgenfilme	Amersham Biosciences, Buckinghamshire
Sterilfilter	Roth, Karlsruhe
Zellkulturflaschen (div. Größen)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (div. Größen)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen

3.11.2. Antikörper

3.11.2.1. Primärantikörper

Die im Folgenden aufgeführten Primärantikörper wurden in der Immunfluoreszenz und/oder im Immunoblot verwendet.

Bezeichnung	Ref./Quelle	Antigen	Typ	Herkunft
a-Dsg 1 p124	Progen, Heidelberg	Dsg 1	monoklonal	Maus
a-Dsg 1 p23	Progen, Heidelberg	Dsg 1	monoklonal	Maus
a-Dsg 3	Zymed, Berlin	Dsg 3	monoklonal	Maus
a-Plakoglobin	Serva, Heidelberg	Plakoglobin	monoklonal	Maus
a-Desmoplakin	Serva, Heidelberg	Desmoplakin	monoklonal	Maus
a-Cytokeratin 18	Progen, Heidelberg	Cytokeratin	monoklonal	Maus

3.11.2.2. Sekundärantikörper

Antikörper	Markierung	Quelle
Ziege-anti-Maus	Peroxidase	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Maus	Cy ₂ /Cy ₃	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Mensch	Peroxidase	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Mensch	Cy ₂ /Cy ₃	Dianova, Hamburg
Kaninchen-anti-Ziege	Peroxidase	Dako, Glostrup
Fab	-	Sigma, Deisenhofen

Zur Darstellung von F-Actin wurde das Farbstoff-gekoppelte Toxin ALEXA-Phalloidin eingesetzt. ALEXA-Phalloidin ist das Toxin des Knollenblätterpilzes und eignete sich zur Darstellung von F-Actin (Mabtec, Göttingen).

3.11.2.3 Patientenseren

Die in dieser Arbeit verwendeten Seren von Pemphigus foliaceus-Patienten wurden uns freundlicherweise von Prof. Zillikens (Universitätshautklinik, Lübeck) zur Verfügung gestellt. Das Kontrollserum stammte von einem Probanden ohne Hauterkrankung. Die Seren wurden mit PF1-Serum (aufgereinigt PF1-IgG) und PF2-Serum (PF2-IgG) benannt. PF1-Serum hatte einen Dsg 1-Antikörper-Titer von 95 U/ml, PF2-Serum einen Titer von 330 U/ml.

3.11.3. Geräte

Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Varioklav, Oberschleißheim
Automatikpipetten	Eppendorf, Hamburg
Blot-Kammer	Sigma, Deisenhofen
Brutschränke	Heraeus, Hanau
Ca ²⁺ -Messelektrode	detectION, Huntingdon Valley
Elektrophoresekammern für	Spezialanfertigung der Fa. Noras, Würzburg
Polyacrylamid-Minigele	
Exsikkator	Schott, Wertheim
Filtrationsapparat für Dot-Blot	Schleicher und Schüll, Dassel
Folienschweißgerät	handelsübliche Haushaltsware
Gefrierschrank	Heraeus, Hanau
Gelkammern	GIBCO BRL, Keutz
Heizwasserbad	Haake Messtechnik, Karlsruhe
Kühlwasserbad	Lauda, Lauda
Magnetrührer	Janke & Kunkel, Staufen
Mikrowelle	Moulinex, Leipzig
Mikroskope:	
• Atomkraftmikroskop	Bioscope AFM; Nanoscope III controller;
• Fluoreszenz-Mikroskop:	Digital Instruments, Santa Barbara
• Konfokales UV Laserscanning-	Axioskop 2 mot plus; Zeiss Hamburg

Material	
mikroskop mit Zeiss LSM 510:	Zeiss, Hamburg
• Optische Pinzette:	Eigenbau mit Nd:Yag-Laser (1064 nm) und NA-Objektiv (100 x 1.3, Öl; Zeiss); Mikroskop: Axiovert 135; Zeiss, Oberkochen
• Rasterkraftmikroskop:	JSM-840 Rasterelektronenmikroskop
• Transmissionselektronenmikroskop:	LEO AB 912 Transmissionselektronenmikroskop
Netzgeräte	GIBCO BRL, Keutz
pH-Meter	Hanna-Instruments, Kehl am Rhein
Photometer	LKB Biochrom Ultraspec II; Pharmacia Biosystems, Freiburg
Schüttler	Unimax 2010; Heidolph, Schwabach
Spektrophotometer	LKB bromma, Muskegon
Sputter-coater	SP7620, Bal-Tec, Witten
Sterilisator	Heraeus, Hanau
Thermoblock	Liebisch, Bielefeld
Ultraschallgerät	Branson Sonifier 250; Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Vakuumsaugpumpe	Heinse Ziller, Würzburg
Vortex-Gerät	Bender & Hobein AG, Zürich
Waage	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen/Rotoren Hamburg	Tischzentrifuge 5415C; Eppendorf, 5804 R; Eppendorf, Hamburg SorvallRC5B und SorvallRC5B Plus mit Rotoren GSA und SS-34; L-80 Ultrazentrifuge mit Rotoren; Beckmann, München SW 55 Ti und 50.2 Ti

4. Methoden

4.1. Molekularbiologie

4.1.1. Bakterien

4.1.1.1. Bakterienkulturen

4.1.1.1.1. Plattenkulturen

Plattenkulturen wurden in Petrischalen (Ø 10 cm) gegossen. Erhitzter LB Agar wurde mit der benötigten Menge des entsprechenden Antibiotikums (AB) versetzt und noch warm in die Platten gegossen. War der Agar erstarrt, konnten die Platten bei 4° C gelagert werden. Plattenkulturen ermöglichten die Isolation von Einzelkolonien, wie zum Beispiel Plasmidklonen, die dann erneut auf Platten vereinzelt oder zur Animpfung von Flüssigkulturen verwendet werden konnten. Einzelklone erhielt man entweder durch Ausstreichen mit einer sterilen Impföse, beispielsweise aus Glycerinkulturen oder durch Ausstreichen einer Bakteriensuspension mit Hilfe eines Dri-galskyspatels. Die beimpften Platten wurden über Nacht bei 37° C stehen gelassen und anschließend im Kühlraum bei 4° C gelagert. Um Pilzbefall und Austrocknung der Platten zu verhindern, wurden diese mit Parafilm verschlossen.

4.1.1.1.2. Flüssigkulturen

Flüssigkulturen wurden als Kleinkulturen bis zu 5 ml oder als Großkulturen angesetzt. LB-Medium mit AB-Zusatz wurde in Reagenzgläser gefüllt. Mit Hilfe eines Zahnstochers, mit dem man einzelne Klone von der Platte aufnehmen konnte, wurden Kleinkulturen angeimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 37° C auf einem Drehrad in sterilen Reagenzgläsern inkubiert. Bei Großkulturen gab man einen Teil einer frischen Übernacht-Vorkultur zu dem benötigten Endvolumen, das zwischen 200 und 500 ml lag. Die Menge der zugegebenen Übernacht-Vorkultur betrug in den meisten Fällen etwa ein Hundertstel des Gesamtvolumens. Die Großkulturen wurden in einem 1000 ml Erlenmeyerkolben auf einem Horizontalschüttler bei 200 U/min über Nacht bei 37° C belassen.

4.1.1.2. Lagerung von Bakterien

Zur Lagerung über einen längeren Zeitraum wurden Glycerinkulturen angelegt. Solche Kulturen sind über mehrere Jahre bei -80° C lagerbar. 1 ml Flüssigkultur wurde mit 250 µl 85 % Glycerin vermischt und in flüssigen Stickstoff zwischengelagert. Zur Aufbewahrung wurden die Glycerinkulturen bei -80° C gelagert.

4.1.1.3 Isolation von Einzelkolonien

Für die Isolation von Einzelkolonien wurde entweder eine Impföse oder einen Drigalskyspatel verwendet. Die Impföse eignete sich am besten für einen Ausstrich aus einer Glycerinkultur, wobei die Bakterienzahl sukzessiv auf der Platte verdünnt wurde. Der Drigalskyspatel konnte für das Ausplattieren von Flüssigkulturen verwendet werden, indem man einen Teil der Kultur (100 µl) mit dem Spatel auf der Platte verteilte. Die Einzelklone konnten nach Inkubation über Nacht bei 37° C mit einem Zahnstocher aufgenommen werden.

4.1.2. Methoden zum Umgang mit DNA

4.1.2.1. Isolierung doppelsträngiger Plasmid-DNA

4.1.2.1.1. Plasmid-Minipräparation

Die Minipräparationen wurden nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. 1,5 ml einer Übernachtskultur wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 30 sek bei 11 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 250 µl Lösung A1 resuspendiert. Anschließend wurden 250 µl Lösung A2 zugegeben und vorsichtig durch invertieren gemischt. Dann wurden 300 µl der Lösung A3 zugegeben. Die Lösungen A1-A3 dienten dazu, die Bakterienwände anzugreifen (Zelllysis). Durch die in Lösung A1 enthaltene RNase wurde die in den Bakterien enthaltene RNA verdaut. Anschließend wurde das Lysat gereinigt, indem es 10 min bei 11,000 x g zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde in ein NucleoSpin Plasmid Gefäß überführt, das in ein 2 ml Auffanggefäß platziert wurde, und zentrifugiert (1 min, 11 000 x g). Die DNA war an das NucleoSpin Säulenmaterial gebunden und der Durchfluss wurde verworfen.

Das Säulematerial wurde folgendermaßen gewaschen:

500 μ l auf 50° C erhitze Lösung AW

600 μ l Lösung A4

Zwischen den Waschschritten wurde die Lösung 1 min bei 11 000 x g zentrifugiert und der Durchfluss aus dem Auffanggefäß entfernt. Erneutes Zentrifugieren (2 min, 11 000 x g) trocknete das Säulenmaterial. Die gereinigte DNA wurde mit 50 μ l H₂O eluiert und in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß aufgefangen, in das man das Nucleo-Spin Plasmid Gefäß platziert hatte.

4.1.2.1.2. Plasmid-Midipräparation

Zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA wurde eine 5 ml Bakterienkultur als Großkultur (s.o.) behandelt und eine Plasmidpräparation mit entsprechend größeren Mengen durchgeführt.

4.1.2.2. Reinigung von DNA

4.1.2.2.1. Phenol-Chloroform-Extraktion

Eine Phenol-Chloroform-Extraktion wurde durchgeführt, um DNA-Lösungen von kontaminierenden Proteinen zu reinigen. Das Volumen der Lösung wurde mit H₂O zunächst auf 450 μ l erweitert und dann mit dem gleichen Volumenanteil eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) auf 900 μ l aufgefüllt und gut gemischt. Zentrifugation für 2 min bei 11 000 x g führte zu einer klaren Phasentrennung der Lösung. Die obere wässrige Phase enthielt die DNA und wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 450 μ l eines Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (24:1) extrahiert und zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und zur Volumeneinengung mit Ethanol präzipitiert.

4.1.2.2.2. Ethanolfällung

Die Ethanolfällung eignet sich dazu, DNA von Salzen zu reinigen oder DNA zu konzentrieren. Die DNA-Lösung wurde mit Ethanol gefällt und anschließend lyophilisiert oder in einem beliebigen Volumen H₂O wieder gelöst. Der DNA-Lösung wurde 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und das 2-3 fache Volumen absolutes Ethanol (-20° C) zugesetzt und gut gemischt. Inkubation der Lösung entweder 1 h bei -80° C oder über Nacht bei -20° C. Durch Zentrifugation (15 min, 11 000 x g, 4° C) wurde

die DNA sedimentiert und mit 70 % Ethanol 2 x gewaschen, dazwischen zentrifugiert, getrocknet und je nach Verwendung in H₂O aufgenommen.

4.1.2.2.3. Fällung mit Polyethylenglycol (PEG)

0,065 g PEG 8000 wurden in 500 μ l H₂O gelöst. 10 μ l davon wurden mit 10 μ l DNA (1-2 μ g) und 1,6 μ l 5 M NaCl in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und 20 min auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde 25 min bei 11000 x g bei 4° C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die sedimentierte DNA wurde 2 x mit 95 % Ethanol (-20° C) gewaschen, zentrifugiert und das Sediment an der Luft getrocknet.

4.1.2.3. Restriktionsanalyse von DNA-Proben

Bei einer Restriktionsanalyse sollte der Ansatz, je nach eingesetzter DNA-Menge, mindestens 10-20 μ l betragen. Die eingesetzte Enzymmenge sollte nicht mehr als ein Zehntel des Gesamtansatzes sein, da die Enzympuffer Glyzerin enthalten, das die Enzymaktivität in zu hohen Dosen verringert. Restriktionsenzyme erkennen 4–8 bp-Sequenzen, die als Restriktionsschnittstellen bezeichnet werden. Dies sind meist palindromische Sequenzen. Es gibt Enzyme die „gerade“ schneiden und „blunt ends“ bilden und andere, die so schneiden, dass überhängende Einzelstränge entstehen, so genannte „sticky ends“. Sticky ends renaturieren leicht bei RT durch Wechselwirkung der Basen in den komplementären Einzelsträngen. Die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 kann jegliche geraden und überhängenden Enden ligieren.

Restriktionsendonucleasen werden aus Bakterien gewonnen, die sie produzieren, um fremde DNA z.B. von Viren zu zerstören, wobei sie ihre eigene DNA durch Modifikation, meist durch Methylierung, an den entsprechenden Stellen schützen. Benannt sind die Enzyme nach dem Bakterienstamm, aus dem sie gewonnen wurden. Bei einem Restriktionsverdau geht man nach den Angaben des Herstellers vor.

Eine Restriktion wurde in einem 20 μ l Gesamtansatz durchgeführt. Zur Restriktion von 2-3 μ g DNA wurden etwa 3–5 μ g des benötigten Enzyms eingesetzt, bzw. wenn 2 Enzyme verwendet wurden, diese Menge Gesamt-Enzym (Verhältnis DNA zu Enzym = 1 zu 3) sowie 6,5 μ l des zehnfach konzentrierten Reaktionspuffers. Für die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme gab es keinen handelsüblichen Reaktionspuffer, der sich für einen Doppelverdau eignete, deshalb wurden ein 10 x PCR-Puffer und MgCl₂ verwendet. Mit H₂O wurde der Ansatz auf 20 μ l Endvolumen aufgefüllt. Die Inkubationsdauer betrug 2 h bei 37° C. 10 μ l des Ansatzes wurden anschließend

auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen und so die Vollständigkeit des Verdaus überprüft. War es für eine Ligation notwendig, das im Gel aufgetrennte DNA-Fragment nach der Gelelektrophorese aus dem Gel wieder zu gewinnen, so wählte man einen größeren Gesamtansatz (80-100 μ l bei gleich bleibendem Verhältnis zwischen DNA und Enzymen) und trug die gesamte Menge auf ein Agarosegel auf. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente und DNA-Färbung mit Ethidiumbromid wurde das gefärbte Fragment unter UV-Licht herausgeschnitten und eluiert.

4.1.2.4. Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten verwendet man Agarosegele (Johnson, 1977). Aufgrund der negativen Ladung der Phosphatreste der DNA bei alkalischem pH-Wert wandern die Nukleinsäuren im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode, wobei Fragmente unterschiedlicher Größe verschieden schnell wandern. Die Migrationsgeschwindigkeit der Fragmente ist dem Logarithmus des Molekulargewichtes umgekehrt proportional. Durch die gelelektrophoretische Auftrennung werden die DNA-Fragmente von Verunreinigungen, wie Proteinen (z.B. Enzymen) oder hohen Salzkonzentrationen, befreit. Dies ist unter anderem für nachfolgende Reaktionen, wie z.B. Ligationen, von Bedeutung. Die Agarose-konzentration übt einen entscheidenden Einfluss auf das Auftrennungsvermögen der Gele aus. Im Normalfall wurde eine Agarosekonzentration von 0,8 % gewählt. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1 x TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlung auf ca. 50° C in einen Gelschlitten mit Taschenkamm gegossen. Sobald das Gel durch Abkühlung ausgehärtet war, wurden die Proben, versetzt mit der entsprechenden Menge 6 x Puffer aufgetragen. Zusätzlich zu den Proben wurde ein Größenmarker aufgetragen. Durch das im Gelladepuffer enthaltene Glycerol sanken die Proben in die Geltaschen. Darüber hinaus enthielt der Gelladepuffer die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol, um die Wanderungstrecke der DNA-Moleküle während der Elektrophorese zu verfolgen. Das Gel wurde in eine mit 1 x TBE Laufpuffer gefüllte Kammer gelegt und mittels einer angelegten Spannung wurden die DNA-Fragmente im Gel aufgetrennt. Nach der Gelelektrophorese wurde die aufgetragene DNA durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

4.1.2.5. Ethidiumbromidfärbung

Ethidiumbromid ist ein durch UV-Licht anregbarer Fluoreszenzfarbstoff, der zwischen die Basenpaare der DNA interkaliert. Es absorbiert Strahlung im UV-Bereich (302 nm) und emittiert sichtbares Licht im orangeroten Bereich. Nach der Gelelektrophorese wurde das Agarosegel für etwa 10 min in einer 0,1 %igen Ethidiumbromidlösung gefärbt und anschließend auf einem UV-Tisch betrachtet. Mit Hilfe einer Polaroidkamera wurden die Gele photographiert, und anschließend bei Bedarf das entsprechende DNA-Fragment aus dem Gel geschnitten.

4.1.2.6. DNA-Gelextraktion

Die DNA-Gelextraktionen wurden nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Dafür wurden in einem 2 ml Eppendorfgefäß zu einem Volumenanteil des herausgeschnittenen Agarosegelstücks 4,5 Volumen der Binde-Lösung, und $\frac{1}{2}$ Volumenanteil TBE-Konversionspuffer pipettiert und die Agarose bei 55° C in 5 min gelöst. Diesem Ansatz wurden 5 μ l Silikatpuder zugegeben und weitere 5 min bei 55° C inkubiert. Der Ansatz wurde nach 2 und nach 4 min auf dem Vortexer gemischt. Anschließend wurde die Lösung 5 sek zentrifugiert, um ein Sediment zu erhalten, und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde 3 x in 500 μ l eiskalten Waschpuffer gelöst und zentrifugiert, der Überstand jeweils verworfen. Nach den drei Waschschritten wurde das Sediment 10–15 min luftgetrocknet und in 50 μ l H₂O aufgenommen. Anschließend wurde die Lösung erhitzt und zentrifugiert, um die DNA von dem Silikatpuder zu lösen. Die im Überstand verbliebene DNA wurde zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen.

4.1.2.7. Ligation von DNA-Fragmenten

Um zwei DNA-Fragmente zu ligieren, verwendet man üblicherweise T4-Ligase. Diese ist in der Lage, DNA-Enden miteinander zu verknüpfen, sofern eines eine 3'-OH-Gruppe und das andere eine 5'-Phosphatgruppe besitzt. Bei einem durchschnittlichen Ligationsansatz werden etwa 100 ng Vektor-DNA (ca 3 μ l einer Minipräparation) und die vier- bis sechsfach molare Menge des zu klonierenden DNA-Fragmentes eingesetzt. Die Ligationen wurden über Nacht bei 16° C durchgeführt.

4.1.2.8. Transformation von Plasmiden in Bakterien

Für die Transformationen wurden MAX Efficiency® DH5 α TM Competent Cells verwendet. Für eine Transformation wurden 50 μ l DH5 α verwendet. Sie wurden mit etwa $\frac{1}{5}$ des Ligationsansatzes gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend einem 45 sec dauernden Hitzeschock (42° C) unterzogen und 2 min auf Eis gelagert, bevor 950 μ l SOC Medium zugegeben wurde. Der Ansatz wurde 1 h bei 37° C auf dem Drehrad belassen. 100 μ l dieser Suspension wurden auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikazusatz ausgestrichen, die gewachsenen Klone am folgenden Tag mit einem Zahnstocher aufgenommen und in Reagenzgläser, mit LB-Medium und entsprechendem AB versehen, über Nacht inkubiert. Von den angereicherten Bakterien wurden Minipräparationen durchgeführt.

4.1.2.9. Analyse der Plasmide durch Sequenzierung

Hat man durch den Restriktionsverdau der Ligation die Information erhalten, dass eine Sequenz mit der richtigen Basenpaar-Länge aufgenommen wurde, so wurde durch Sequenzierung überprüft, ob tatsächlich die richtige Sequenz vorliegt. Sequenzierungen wurden von MWG-Biotech AG durchgeführt. Dazu wurden 1-2 μ g der DNA-Probe mit Ethanol gefällt und an MWG gesandt (<https://ecom.mwgdna.com/register/index.tcl>). Die Sequenz wurde mit im Internet veröffentlichten Sequenzen verglichen, um deren Identität zu verifizieren (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Die für die Sequenzierung verwendeten Primer sind in Kapitel 3.7.3. aufgeführt.

4.2. Zellkultur

4.2.1. Nährmedien

Als Kultivierungsmedium für die CHO- und HaCaT-Zellen diente DMEM (*Dulbeccos modified Eagle medium*). Das Medium wurde als fertige Pulvermischung geliefert, für den Gebrauch in H₂O gelöst und durch Zugabe von NaHCO₃ gepuffert. Das Medium wurde steril filtriert und auf diese Weise mehrere Monate bei 4° C lagerbar. Vor dem Gebrauch wurde das Medium mit 50 U/ml Penicillin-G, 50 U/ml Streptomycin und 10 % FCS supplementiert. Die Zellen lagerten im Brutschrank bei 5 % CO₂ und 37° C.

4.2.2. CHO-Standardkultur

CHO-Zellen wuchsen bis zur Konfluenz und wurden in einem Verhältnis von 1:20 bis 1:50 geteilt, je nach Bedarf. Sie wurden konstant in T25 Flaschen gehalten und für Versuche auf größere Flaschen oder Deckgläser ausgesät. Die Ablösung der Zellen von den Kulturflaschen erfolgte mittels Trypsinlösung (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA). Zunächst wurde das Medium mit einer Saugpumpe abgesaugt und die Zellen mit PBS gespült. Das PBS wurde entfernt und die Zellen mit Trypsin von der Flasche gelöst. Die in Trypsin gelösten Zellen wurden in Medium aufgenommen, um das Trypsingemisch zu neutralisieren, und nach gründlicher Resuspension der Zellen mit einer Pipette auf neue Flaschen verteilt. Die Zellen wurden zwei bis drei mal in der Woche auf Morphologie und Konfluenzgrad im Phasenkontrastmikroskop untersucht. War eine Teilung nicht erforderlich, wurde das Kulturmedium lediglich erneuert.

4.2.3. HaCaT-Standardkultur

Die adhärent wachsenden HaCaT-Zellen wurden in DMEM in Kulturflaschen (T25, T75, T175) bei 37° C und 5 % CO₂ kultiviert. Bei einem Konfluenzgrad von etwa 90 % wurden sie im Verhältnis 1:5 bis 1:10 geteilt und auf neue Kulturflaschen oder auf Deckgläser überführt oder für den späteren Gebrauch kryokonserviert. Die Ablösung der HaCaT-Zellen erfolgte mit Trypsinlösung. Zuvor wurden die Zellen 20 min in einer PBS + 0,1 % EDTA-Lösung inkubiert. Der Ca²⁺-Entzug unterstützte dabei die Lösung der Zellen von den Kulturflaschen. Die Zellen wurden in Nährmedium aufgenommen, resuspendiert und neu verteilt.

4.2.4. Kryokonservierung von Zellen

Die Passagezahl der Zelllinien ist häufig begrenzt, da sich die Wahrscheinlichkeit für morphologische und genetische Veränderungen der Zellen mit steigender Passagezahl erhöht. Um diesem Problem entgegen zu wirken, ist es sinnvoll, mit möglichst niedrigen Passagezahlen zu arbeiten. Daher wurden die Zellen regelmäßig kryokonserviert um bei Bedarf auf niedrige Passagen zurückgreifen zu können.

4.2.4.1. Einfrieren von Zellen

Adhärente Kulturzellen einer Flasche (T75) wurden zunächst trypsiniert und bei RT sechs min (9000 g) zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 0° C temperiertem Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden anschließend in einer Einfrierbox für eine Woche bei -80° C zwischengelagert und schließlich in flüssigem Stickstoff bis zur Wiederverwendung aufbewahrt. Einfriermedium: 90 % Medium (mit 10 % FCS) und 10 % DMSO.

4.2.4.2. Auftauen von Zellen

Zum Auftauen wurde die auf 0° C erwärmte Zellsuspension mit 10 ml Medium vermischt und bei RT zentrifugiert (9000 rpm, 5 min). Der Überstand wurde mit einer Saugpumpe entfernt. Die Zellen wurden in 5 ml Medium resuspendiert, in eine T25 pipettiert und im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden tote Zellen durch Mediumwechsel entfernt.

4.2.5. Transfektion mit Effectene®

Die Transfektion der Zellen erfolgte mit Effectene® nach den Angaben des Herstellers. Bei dieser Form der Transfektion werden Micellen gebildet, die im Gegensatz zu liposomalen Transfektionsreagenzien in Größe und Menge nicht variieren. Die Zellen wuchsen auf 6-well-Platten bis zu einer Dichte von 70-80 % und wurden dann mit Effectene® transfiziert. Für eine Transfektion wurden 10 μ l (1 μ g DNA) einer Plasmid-DNA-Minipräparation (Dsg 1-Fc in pEGFP-N₃) eingesetzt. Diese wurden mit EC-Puffer auf 150 μ l aufgefüllt und dazu anschließend 16 μ l Enhancer dazu pipettiert. Der Ansatz wurde mit einem Vortex-Gerät kurz gemischt, 10 sek zentrifugiert und 5 min bei RT stehen gelassen. Dann wurden 20 μ l Effectene zugegeben, gemischt, zentrifugiert und 10 min bei RT stehen gelassen. In der Zwischenzeit wurde bei den Zellen das Medium entfernt und 1,6 ml frisches Medium zugegeben. Nach Ablauf der

Inkubationszeit wurden 600 μ l des Mediums zu dem Transfektionsansatz pipettiert, mit diesem vermischt, und auf die Zellen überführt. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und der Erfolg der Transfektion überprüft. Um die anschließende Selektionierung stabil transfizierter Zellklone zu vereinfachen wurden die Zellen mit einem pEGFP-N₃-Vektor zeitgleich co-transfiziert. Das transfizierte Plasmid selbst zeigte kein GFP-Signal, da der Dsg 1-Fc-Sequenz ein Stop-Codon folgte, dass die Expressierung des GFP-Signals verhinderte.

4.2.6. Generierung von stabilen Zellklonen

Im Vergleich zu transient transfizierten Zellen besitzen stabil transfizierte Kulturen den Vorteil, dass das transfizierte Konstrukt in das Genom der Zellen integriert ist, und man somit stets auf denselben Klon zurückgreifen kann. Bei transienten Kulturen geht im Laufe der Zellteilungen das extrachromosomal vorliegende transfizierte Plasmid verloren. Um eine stabile Zelllinie zu erhalten, wurden die Zellen zunächst wie oben beschrieben transfiziert. Am folgenden Tag wurden die Zellen in eine Flasche (T25) umgesetzt und Geneticin (G 418) zur Selektionierung in einer Konzentration von 15 μ g/ml Medium zugegeben. Waren die Zellen konfluent, wurden sie auf eine 96 well Platte ausgesät. Zunächst wurden die Zellen gezählt und anschließend die Verdünnung errechnet, bei der auf ein Well nur eine Zelle kommt. Das G 418 wurde in entsprechender Konzentration mit dem Medium zu den Zellen gegeben. Die einzelnen Wells wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop nach leuchtenden Zellen durchsucht. Bei Konfluenz wurden die leuchtenden Zellen auf 6-well-Platten umgesetzt und wuchsen dort erneut bis zur Konfluenz. Der Überstand der Zellen wurde im Immunoblot auf den Gehalt an Dsg 1-Fc überprüft. Die Selektionierung wurde so lange durchgeführt, bis alle Zellen Dsg 1-Fc produzierten. Dies wurde durch Immunfluoreszenz verifiziert. Die stabil transfizierte Zelllinie wurde kryokonserviert und bei Bedarf wieder aufgetaut.

4.2.7. Zelllysat

Um Zelllysat für Immunnachweisanalysen zu erhalten, wurden die Zellen einer T175-Flasche in 200 µl 1 x Probenpuffer aufgenommen und mit einem Zellschaber von der Flasche gelöst. Die in dem Probenpuffer gelösten Zellen wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Das Lysat wurde durch wiederholtes Aufziehen in eine Insulinspritze homogenisiert.

4.3. Proteinbiochemie

4.3.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Um Proteine nach ihrem molekularen Gewicht aufzutrennen, bedient man sich der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Hierbei werden Proteine in Gegenwart eines Überschusses an Natriumdodecylsulfat (**Sodium-DodecylSulfat**, **SDS**) und Denaturierungsreagenzien elektrophoretisch aufgetrennt. Das negativ geladene SDS lagert sich an die Proteine und kompensiert die positive Ladung der Proteine, sodass alle Proteine, nach Anlegen einer Spannung, zur Anode wandern. Außerdem werden die Proteine denaturiert und wandern daher entsprechend ihrer Molmasse unterschiedlich weit im Gel. Die in dieser Arbeit angewandte SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde nach der Laemmli-Methode (1970) durchgeführt. Hierbei wurden die aufzutragenden Proben erst in einem Sammelgel angereichert, um dann in das Trenngel hineinzuwandern. Zunächst wurde zwischen zwei Glasplatten, die durch ca. 1 mm dicke Abstandshalter voneinander getrennt und in einer Halterung verankert waren, ein Trenngel mit einem Polyacrylamidanteil von 7,5 % gegossen. Das Trenngel wurde mit H₂O überschichtet, um eine gerade Oberfläche zu erhalten. War das Gel polymerisiert, wurde das Wasser wieder entfernt und ein 5 %iges Sammelgel auf das Trenngel aufgebracht. Im noch flüssigen Zustand des Sammelgels wurde ein Taschenkamm eingesetzt, der das Einfüllen der Proben gewährleistete. Der Kamm wurde, nachdem das Gel fest war, wieder entfernt. Die Probe wurde vor dem Auftragen im Verhältnis 1:3 mit dem 3 x Probenpuffer vermischt und für 5 min bei 95° C aufgekocht. Die Probenpuffer wurden mit und ohne DTT verwendet. Zusammen mit den Proben wurde immer ein Größenmarker aufgetragen. Die Elektrophorese in 1 x Elektrophoresepuffer wurde bei einer Spannung von 80 V im Sammelgel und 180 V im Trenngel durchgeführt. Anschließend wurde das Gel ent-

weder mit Coomassie® Brilliant-Blau gefärbt und nach ca. einer halben Stunde über Nacht in Leitungswasser entfärbt oder für einen Immunoblot genutzt.

4.3.2. Elektrotransfer von Proteinen aus SDS-Gelen (*Immunoblotting*)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel wurden die Proteine aus dem Gel in einem halbtrockenen („semi-dry“) Elektroblotverfahren nach Kyhse-Anderson auf eine Protein absorbierende Nitrocellulosemembran transferiert (Kyhse-Anderson, 1984). Hierbei wurde das Gel und die Nitrocellulosemembran luftblasenfrei auf die Graphitelektroden der Laufkammer zwischen jeweils drei in Blotpuffer getränkten Filterpapierstücke gleicher Größe gelegt. Das Gel lag dabei auf der Kathodenseite der Laufkammer. Der Proteintransfer erfolgte bei einer Stromstärke von 42 mA, dies entsprach 0,8 mA pro cm² SDS-Gel, über einen Zeitraum von 1,5 h. Um die einzelnen Laufspuren voneinander abgrenzen zu können, wurden die Proteinbanden nach dem Transfer 2 min in Ponceaulösung angefärbt. Die Spuren wurden nummeriert und unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran wurden mit 5 % Magermilchpulver in PBS+0,05 % Tween 20 blockiert.

Gebloottete Antigene konnten mit Peroxidase-markierten Antikörpern sichtbar gemacht werden. Der Blot wurde zuerst mit anti-Antigen-Antikörper (1. AK) inkubiert. Diese Inkubation erfolgte über Nacht in 5 % Magermilch in PBS + 0,05 % Tween 20 verdünnt. Am folgenden Tag wurde die Membran 3 x 5 min mit PBS/0,05 % Tween 20 gewaschen und 45 min bei RT mit einem Peroxidase-markierten 2. Antikörper, der an den 1. AK band, inkubiert. Anschließend folgten erneute 3 x 5 min Waschschrte mit PBS/0,05 % Tween. Die Nitrocellulosemembran wurde in einer 1 zu 1 Mischung aus den ECL-Lösungen I und II 1 min geschwenkt, in der Dunkelkammer in eine Röntgenfilmkassette gelegt und mit Klarsichtfolie abgedeckt. Die Ecken der Nitrocellulosemembran wurden mit einem Edding markiert und ein Stück Röntgenfilm von der Größe der Membran passgenau auf die Membran gelegt. Bei Dunkelheit wurde die Röntgenfilmkassette für 1-5 min geschlossen gehalten. Hierbei katalysierte die Peroxidase die Oxidation des in der ECL I-Lösung enthaltenen Luminol und löste somit eine Chemilumineszenz aus. Das so entstandene Lichtsignal wurde auf den Röntgenfilm übertragen. Der Röntgenfilm wurde anschließend 1 min in Entwicklerlösung gebadet und dann in Fixierflüssigkeit gelegt. Der entwickelte Röntgenfilm wurde

zum Trocknen bei 37° C aufgestellt. Der Größenmarker der Nitrocellulosemembran wurde auf den Röntgenfilm übertragen.

Aufbau einer Blot-Kammer:

Graphitboden der Laufkammer (Kathode)

3 Filterpapiere

Nitrocellulosemembran

SDS-Polyacrylamidgel

3 Filterpapiere

Graphitdeckel der Laufkammer

4.3.3. Dot-Blot-Analyse

Eine einfache Methode, um Proteine nachzuweisen, ist die Dot-Blot-Analyse. Im Dot-Blot-Verfahren wurde das Antigen an die Nitrocellulosemembranen absorbiert. Dazu wurde eine Nitrocellulosemembran für etwa 5 min in PBS eingeweicht und auf die Unterseite eines Filtrationsapparates gelegt. Die Oberseite, die mit runden Aussparungen versehen war, um die Proben auf die Nitrocellulosemembran aufzutropfen, wurde aufgelegt und der Apparat fest verschlossen, damit die aufgetragenen Proben nicht in Bereiche außerhalb der Aussparungen diffundierten. Die Proteinproben wurden in PBS verdünnt und in die Löcher pipettiert. In dieser Arbeit wurden Dsg 1-Fc-Fusionsprotein und HaCaT-Zellen auf die Nitrocellulosemembran aufgetragen. Dsg 1-Fc wurde in Konzentrationen von 0,1-1 µg eingesetzt. HaCaT-Zellen einer T25 wurden trypsinisiert und in 150 µl PBS aufgenommen. Etwa 50 µl wurden pro Aussparung eingesetzt. An die untere Seite der Blotkammer wurde eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen und die Probe so durch die Nitrocellulosemembran gesogen. Mit PBS wurde die Membran insgesamt 3 x gewaschen, bevor die Pumpe abgestellt, die Nitrocellulosemembran aus der Kammer entfernt und in PBS + 0,05 %Tween 20 gelöstem Magermilchpulver (5 %) 10 min gelagert wurde. Die Inkubation mit Antikörpern erfolgte wie unter 3.2.2. beschrieben.

4.3.4. Proteinaufreinigung

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Fusionsprotein, bestehend aus den extrazellulären Domänen von Dsg 1, an die der Fc-Teil eines humanen IgG ist, erfolgte die Aufreinigung mittels Protein A Säule, die Fc-Teile von Immunglobulinen zu binden vermag, mit der auch die in dieser Arbeit verwendeten Seren aufgereinigt wurden. Die stabil transfizierten CHO-Zellen wuchsen nach der letzten Aufteilung vor der Aufreinigung in Medium mit Immunglobulin reduziertem Serum, um zu verhindern, dass Immunglobuline des Mediums an der Protein-A-Agarose haften und die Aufreinigung verunreinigen. Nachdem das Medium in eine Glasflasche überführt und gesammelt wurde, wurden die Proteaseinhibitoren Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin (je 1 µg/ml) zugegeben und der Überstand bei 11 000 g 25 min zentrifugiert.

4.3.4.1. Protein A-Affinitätschromatographie

Protein A (MG 42 kDa) stammt aus dem Bakterium *Staphylokokkus aureus* und bindet Antikörper reversibel über ihre Fc-Domäne. Dabei bindet 1 Mol Protein A etwa 2 Mol IgG. Die Protein A-Affinitätschromatographie wurde mit Hilfe einer Säule bestehend aus einer 2,5 ml Spritze, in welche 1 ml der Protein A-Agarose gefüllt wurde, durchgeführt. Unterhalb und oberhalb des Säulenmaterials wurden Fritten positioniert, um das Auslaufen, Austrocknen und die Kompression der Protein A-Agarose zu verhindern. Sobald sich das Säulenmaterial am unteren Teil der Spritze gesammelt hatte, wurde die Säule mit 20 ml HBSS gespült und anschließend mit der zu reinigenden Probe beladen. Der Durchbruch der Säule wurde in einem Becherglas aufgefangen, und in einem Immunoblot wurde überprüft, ob das zu reinigende Protein darin enthalten war. Die Säule wurde vor der Elution mit 20 ml HBSS gespült. Die Elution erfolgte mit 20 mM Na-Citrat pH 2,4. Das Eluat wurde in 0,5 ml Aliquots in Eppendorfgläsern aufgefangen, in die zuvor 15 µl 2 M Na-Carbonat-Lösung vorgelegt worden war. Sofort nachdem 0,5 ml aufgefangen worden waren, wurde das Eppendorfglas geschwenkt, der pH-Wert des Eluats bestimmt und, falls nötig, auf pH 7 eingestellt. Um den pH-Wert einzustellen, wurden 1 N HCl- und 1 N NaOH-Lösungen verwendet. Insgesamt wurden pro Aufreinigung 4 Fraktionen aufgefangen. Diese wurden über Nacht in Dialyseschläuchen gegen 2 l HBSS dialysiert. Die Dialyseschläuche wurden zuvor in 2 l H₂O mit einer Spatelspitze EDTA und anschließend 3 x in reinem H₂O aufgekocht. Am folgenden Tag wurden die Eluate aus den Dialy-

seschläuchen zurück in Eppendorfgefäße überführt. Die Eluate wurden auf die Menge und Reinheit des gereinigten Proteins mittels Immunoblot und Coomassiegele überprüft, und die Proteinkonzentration wurde in einem Bradford-Test bestimmt.

Die Proteinfraktionen wurden in 20-100 µl Portionen bis zur Verwendung tiefgefroren. Sowohl das Dsg 1-Fc-Protein, als auch die in dieser Arbeit verwendeten IgG-Fraktionen der Pemphigus foliaceus Seren (PF1 und PF2) und ein Serum eines Probanden ohne Hauterkrankung (Kontroll-Serum) wurden mit dieser Methode gereinigt.

4.3.5. Bradford-Analyse

Die Bradford-Analyse wurde von Bradford (1976) zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen entwickelt. Bei der Bindung von Coomassie-brilliant-Blau an Protein verschiebt sich das Absorptionsmaximum auf 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung.

Zu 1 ml Bradford-Reagenz wurden 20 µl der Proteinlösung pipettiert und durch Kippen des Eppendorfgefäßes vermischt. Die anschließende photometrische Messung erforderte die Bestimmung von Standardwerten in Form von BSA-Standards mit festgelegter Proteinkonzentration von 0–2 mg/ml. Die Bradford-Analyse wurde zur Konzentrationsbestimmung der Eluate aus den Dsg 1-Aufreinigungen und der Aufreinigungen der IgG-Fraktionen aus den verwendeten Seren angewandt.

4.3.6. Biotinylierung

Um den Nachweis zu erbringen, dass das gereinigte Serum von Pemphigus foliaceus Patienten das Dsg 1-Fc-Protein im Dot-Blot erkannte, musste das Serum biotinyliert werden. Der gegen das PF-IgG gerichtete und Meerrettichperoxidase markierte Zweitantikörper (anti-human-pox) hätte auch den Fc-Teil des Dsg 1-Fc-Fusionsproteins erkannt. Als Kontrolle wurden zusätzlich IgG-Fraktionen eines Freiwilligen ohne Hauterkrankung biotinyliert. Für die Biotinylierung wurden 20 µg/µl NHS-Biotin zu 300 µg IgG-Fraktionen gegeben und 2 h bei RT auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde erneut NHS-Biotin zugegeben und die Lösung nochmals 2 h inkubiert. Die Reaktion wurde nach Ablauf der Inkubationszeit mit 10 µl gesättigter Glycin-Lösung gestoppt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4° C gegen PBS dialysiert. Die Bindung der IgG-Fraktionen an Dsg 1-Fc konnte durch Bindung von Peroxidase-markierten Streptavidin (1:1500) an das Biotin durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht.

4.3.7. Immunabsorption des PF2-IgG

Für die Immunabsorption des PF2-IgG wurden 30 µl Protein-A-Mikroperlen mit 15 µg gereinigtem Dsg 1-Fc bzw. für die Kontrollabsorption mit 15 µg gereinigtem VE-Cadherin beschichtet (Beschichtung siehe 3.4.5.3.). Die beschichteten Perlen wurden anschließend 1 h bei RT mit den IgG-Fraktionen in einem Eppendorfgefäß inkubiert, um eventuelle freie Protein-A-Bindungsstellen abzusättigen. Das Eppendorfgefäß wurde in einen Magnethalter platziert und, nachdem sich die Perlen am Gefäßrand gesammelt hatten, wurden die IgG-Fraktionen entfernt. Die Perlen wurden mit PBS gewaschen. Für die Messungen mit der Laserpinzette und die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden 100 µl PF2-IgG in 1000 µl DMEM eingesetzt, und die Perlen darin über Nacht inkubiert. Für die Dot-Blot-Analysen wurde biotinyliertes PF2-IgG verwendet. 50 µl PF2-IgG wurden zu 170 µl HBSS pipettiert und anschließend über Nacht die Perlen darin inkubiert. Für die Dot-Blot-Analyse wurde das immunabsorbierte PF2-IgG in 250 µl Magermilch (10 %) aufgenommen.

4.4. Mikroskopie

4.4.1. Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Zellen wurden auf 12 mm Ø Deckgläser in Petrischalen ausgesät. Die konfluenten Zellen wurden in 2 % Formalin (frisch angesetzt aus Paraformaldehyd) in PBS 10 min bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen kurz mit PBS gewaschen. Die folgende Inkubation (5 min) mit 0,1 % Triton X-100 in PBS diente der Permeabilisierung der Zellen. Alternativ wurden die Zellen in eiskaltem Aceton für 2 min fixiert und permeabilisiert. Es folgte erneut ein Waschschriff mit PBS. Die Deckgläser wurden aus den Petrischalen auf Objektträger umgelagert und Flüssigkeit mit Papier abgetupft. Unspezifische Bindungsstellen wurden 30 min mit BSA/NGS abgesättigt und die Zellen anschließend über Nacht mit dem Primärantikörper in einer feuchten Kammer bei 4° C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit einem markierten Sekundärantikörper 45 min bei RT inkubiert und vor und nach der Inkubation 3 x in PBS gewaschen. Die Deckgläser wurden mit Papier abgetupft und mit der Zellseite nach unten, zum Schutz vor Verbleichen, in einen auf einem Objektträger befindlichen Tropfen NPG (60 % Glycerin in PBS + 1,5 % N-propyl-gallat) eingebettet. Die eingesetzten Antikörper wurden in PBS verdünnt. Seren und Latexperlen wurden in

Medium verdünnt 30 min auf den Zellen inkubiert und anschließend wie beschrieben zur Färbung fixiert.

Beschichtung von Latexperlen:

Für die Immufluoreszenzen mit Dsg 1-Fc-beschichteten Mikroperlen konnten die Protein-A-Mikroperlen, wie sie in den Laserpinzettenexperimenten (s.u.) verwendet wurden nicht genutzt werden, da diese eine starke Autofluoreszenz bewirken. Deshalb wurden Latexperlen mit einem Durchmesser von 4,9 μm verwendet. 125 μl Perlenlösung (entsprechen 5 μl komprimierte Perlen) wurden 2x mit 25 mM MES-Puffer pH 6,0 gewaschen und bei 3000 g für 10 min zentrifugiert. Die Perlen wurden in 500 μl MES mit 2,5 μg Dsg 1-Fc-Protein aufgenommen. Die Perlensuspension wurde über Nacht auf einem Drehrad bei RT inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Perlen bei 3000 g 10 min zentrifugiert und 3 x mit 1 ml PBS + 0,1 % BSA gewaschen. Die Perlen konnten 10 Tage bei 4°C auf einem Drehrad aufbewahrt werden.

4.4.2. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

4.4.2.1. Eponeinbettung

HaCaT-Zellen wurden mit Mikroperlen in Kulturmedium 30 min inkubiert und anschließend in Epon eingebettet. Um eine gute Membranstruktur zu erhalten, erfolgte die Einbettung nach folgendem Protokoll:

Die Zellen wuchsen auf 12 mm Ø Deckgläser in einer Petrischale bis zur Konfluenz. Sie wurden 30 min mit Dsg 1-beschichteten Mikroperlen inkubiert. Die Keratinozyten wurden kurz mit PBS gewaschen und mit 2,5 % Glutaraldehyd, dem 0,01 % Ruthenium-Rot in 0,1 M Sodium cacodylat zugesetzt war für 1 h bei 4 °C fixiert. Im Folgenden wurden die Zellen mit 0,1 M Cacodylat-Lösung gespült und in 2 % OSO_4 in 0,1 M Cacodylat-Lösung 1 h bei RT fixiert. Die Zellen wurden wiederum in 0,1 M Cacodylat gespült und in aufsteigenden Konzentrationen Methanol (25 %, 50 %, 70 %, jeweils 10 min) entwässert. Die Zellen wurden in gesättigter Uranylacetatlösung in 70 % Methanol 1 h in Aluminiumfolie zum Schutz vor Licht inkubiert. Es folgten 10 min Inkubationen in 80 %, 95 % und 100 % Methanol. Die entwässerten Zellen wurden 2 x 10 min mit Propylenoxid äquilibriert und anschließend in Epon 812 eingebettet. Hierfür wurden Gelatine kapseln mit Epon gefüllt und die Kapsel auf die Zellseite des Deckglases gestürzt. Anschließend konnte die Kapsel bei 60° C 24 h polymerisieren. Nach Aushärten des Epons wurde das Deckglas mit Flusssäure abgelöst, die Zell-

oberfläche abgesägt und in eine Flacheinbettungsform überführt. Diese wurde mit Epon aufgefüllt und nochmals 24 h bei 60° C polymerisiert. Semidünnschnitte (1 µm) wurden mit Toluidin-Blau gefärbt.

4.4.2.2. Ultraschnitte und deren Kontrastierung

Nach Zutrimmen des Eponblocks wurden mit einem Ultramikrotom 60-80 nm dicke Schnitte angefertigt und mit Hilfe einer an einen Zahnstocher befestigten Wimper auf ein mit Formvar beschichtetes Nickelnetzchen aufgenommen. Die Schnitte wurden mit 2 % Uranylacetatlösung in H₂O 20 min in Dunkelheit kontrastiert. Nach Waschen in H₂O erfolgte eine Kontrastierung mit Bleicitrat (0,2 % in H₂O). Die Schnitte wurden nochmals gewaschen und anschließend mit dem Elektronenmikroskop betrachtet.

4.4.3. Rasterelektronenmikroskopie

Auf 22 mm Ø Deckgläsern wuchsen Zellen bis zur Konfluenz. Sie wurden in 6,25 % Glutaraldehyd in HBSS über Nacht bei RT fixiert, mit PBS gewaschen und mit einer aufsteigenden Acetonreihe (30 %; 15 min, 50 %; 20 min, 70 %; 30 min, 90 %; 45 min, 6 x 100 %; 30 min) entwässert. Anschließend wurde die Kritische-Punkt-Trocknung durchgeführt und die Zellen mit Palladium-Gold bedampft.

4.4.4. Atomkraftmikroskopie (*atomic force microscopy*; AFM)

Mit der Atomkraftmikroskopie lässt sich die Oberflächenstruktur vieler Materialien darstellen. Zusätzlich zur Bildgebung kann das AFM auch zur Messung kleinster Kräfte eingesetzt werden. Entwickelt wurde diese Untersuchungsmethode von G. Binnig aus der Rastertunnelmikroskopie (Binnig et al., 1986). Das Auflösungsvermögen des Rasterkraftmikroskops liegt für biologische Objekte im Bereich von 2-200 nm je nach Probe (Cadherine im Bereich von ~ 2 nm). Untersuchungen müssen nicht im Vakuum durchgeführt werden, wodurch Messungen in wässriger Lösung möglich sind. Die Proben müssen nicht vorbehandelt werden, wodurch lebendige Zellen in physiologischen Pufferlösungen untersucht werden können.

4.4.4.1. Prinzip der Atomkraftmikroskopie (AFM)

Das AFM eignet sich auch für die Bestimmung von Adhäsionskräften zwischen an der Spitze angebrachten Einzelmolekülen und einer mit Adhäsionsmolekülen (oder Zellen) beschichteten Platte (Baumgartner et al., 2000). Eine kristallartige Sensor-

nadel (2-5 μm) des AFMs mit atomarer Spitzenstruktur befindet sich am Ende eines Federbügels mit den Maßen 0,5 x 200 x 20 μm (Dicke, Länge, Breite). An diese und an eine Glimmerplatte ist das zu untersuchende Protein gebunden. Als Maß für die zwischen Spitze der Nadel und Platte herrschende Kraft dient die Verbiegung des Federbügels, welche mit Lichtzeigerdetektion gemessen wird. Dabei wird ein Laserstrahl auf die Oberseite des Federbügels direkt über die Nadel fokussiert. Die Ablenkung des Laserstrahls, und somit die Verbiegung des Federbügels, wird über Photodioden detektiert (Verbiegungen ab 0,1 $\text{\AA}$).

Für die Kraftmessungen werden Bindungspartner über flexible Kopplungsmoleküle an die Oberfläche der Platte und an die AFM-Spitze gekoppelt und die Nadel periodisch der Platte angenähert und entfernt. Zur Kopplung der Bindungspartner an Nadel und Platte hat sich ein heterobifunktionelles Polyethylenglycol-(PEG) Derivat mit Amin-reaktiven Ende (N-Hydroxysuccinimid, NHS-Gruppe) und einem Schwefel-reaktiven Ende (Pyridyldithiophosphat, PDP-Gruppe) als Kopplungsmolekül besonders bewährt (PEG800; MW = 800; 20 Ethylenglycoleinheiten, ca. 8 nm im gestreckten Zustand). Die Moleküle sind so in einem gewissen Radius frei beweglich. Die Oberflächen der Spitze (Si oder Si_3N_4) und der Platteweisen freie SiOH-Gruppen auf. Durch Inkubation mit Ethanolamin entstehen freie Aminogruppen, an die das Amino-reaktive Ende des funktionalisierten PEG angehängt werden kann (Abb.6) (Baumgartner, 2000).

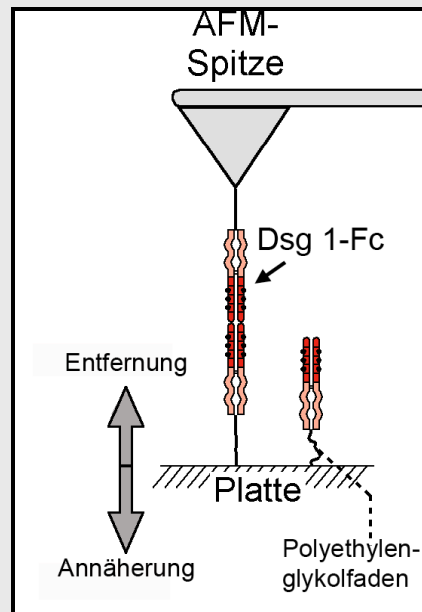


Abb. 6: Schematischer Aufbau eines Atomkraftmikroskops

Dsg 1-Fc wurde über flexible Polyethylenglykolfäden (PEG) an Nadel und Platte des AFM gebunden. Durch Annähern der Nadelspitze an die Platte gelangen die Moleküle in Kontakt.

Zur Kraftmessung bedient man sich so genannter Kraft-Abstandszyklen. Kraft-Abstand-Messungen können, je nach Federbügel, Probe und Umgebungsbedingung in Messbereichen von etwa 20 pN bis zu einigen hundert nN durchgeführt werden. Die Spitze wird zyklisch an die Probe angenähert und wieder entfernt. Interaktionen zwischen Platte und Nadelspitze führen beim Entfernen der Nadel von der Platte zu einer Ablenkung des Federbügels nach unten (Abb.7, a), d.h. zur Platte hin. Die Interaktion reißt ab, sobald eine spezifische Kraft (Abrisskraft) erreicht wird, dadurch kommt es zum sprunghaftigen Entspannen des Federbügels (Abrissereignis, siehe Abb.7, b). Aus der Ablenkung des Federbügels lässt sich bei bekannter Federsteifigkeit (Federkonstante) des Federbügels die Interaktionskraft zwischen Spitze und Platte ermitteln. In Kraft-Abstands-Kurven wird der Abstand der Nadelspitze von der Platte auf der Abzisse und die gemessene Auslenkung des Federbalkens auf der Ordinate aufgetragen (Abb.7, a unten). Mit dieser Form der Kraftmessung wurden in dieser Arbeit homophile Dsg 1-Interaktionen auf Einzelmolekülebene untersucht.

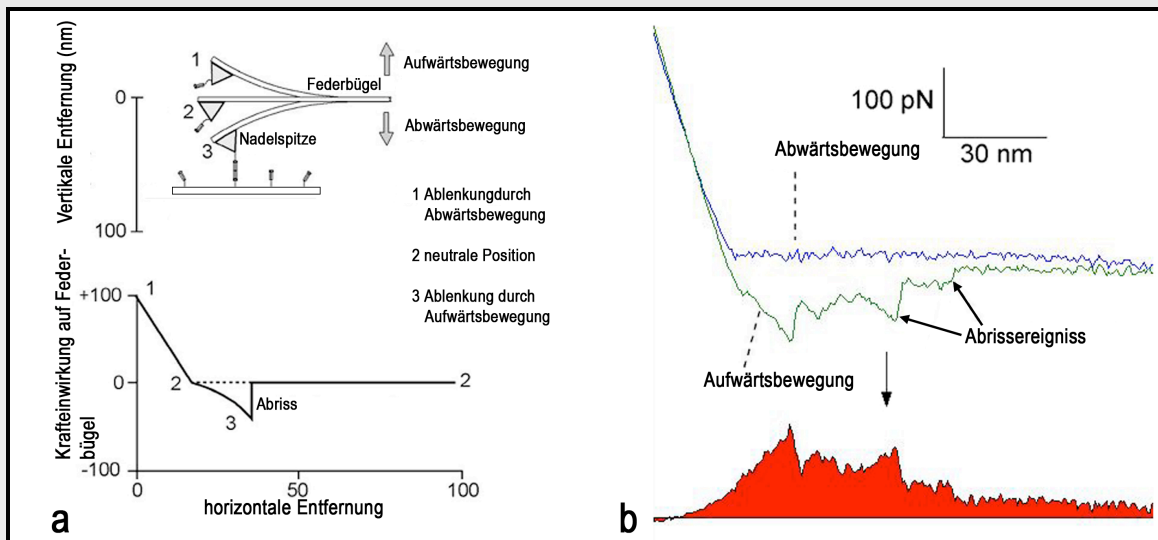


Abb.7: Prinzip der Kraft-Abstands-Messungen

Abb. a: Das Protein wird mit einem Kopplungsmolekül (PEG) an Nadel und Platte gebunden. Durch zyklische Auf- und Abwärtsbewegung der Nadel gelangen die Moleküle miteinander in Kontakt (Frequenz 1Hz-10Hz). Während der Abwärtsbewegung trifft die Nadel des Federbügels auf die Platte und bei weiterer Abwärtsbewegung wird die Nadel allmählich nach oben abgelenkt bis die Abwärtsbewegung endet (1). Bei der folgenden Rückbewegung der Nadel biegt sich diese zurück bis die Nadel wieder die Position vor Ablenkung erreicht (neutrale Position) (2). In dieser nicht-deflektierten Position verbleibt die Nadel bei weiterer Entfernung (Rückbewegung) von der Platte solange keine Interaktion mit Molekülen der Platte auftritt. Findet eine Interaktion zwischen Nadel und Platte statt, erfolgt eine abwärts gerichtete Ablenkung des Federbügels (Nadel) unter die neutrale Linie (3).

Abb. b: Die Fläche zwischen der Neutrallinie bei der nachfolgenden Abwärtsbewegung und der Kurve der Aufwärtsbewegung (unten, rot) ist ein Maß für die durchschnittliche Bindungsaktivität (Baumgartner et al., 2000).

4.4.4.2. Beschichtungsprotokoll:

Ethanolamin-Beschichtung von Platte und Nadel

Die Glimmerplatten wurden in 0,5 cm² Stücke geschnitten und mit Tesafilm abgezogen, um eine möglichst glatte Oberfläche zu erhalten. Die Platten wurden vorerst in einer Petrischale verwahrt. Die Nadeln wurden für 30 min in Chloroform gereinigt. 2,2 g Ethanolamin wurden in 4 ml DMSO (Dimethylsulfoxid) unter Hitzezufuhr gelöst und ein Molekularsieb über dem Bunsenbrenner in einem Reagenzglas getrocknet. Die Ethanolaminlösung und das Molekularsieb (4 Å) wurden in ein Glasgefäß mit Deckel gegossen und in einem Exsikkator entgast. Der Exsikkator wurde 2 x mit N₂ gefüllt und anschließend blieb das Gefäß 30 min unter einem Vakuum im Exsikkator

stehen. Die Platten und Nadeln wurden vorsichtig auf das Molekularsieb gelegt, so dass sie vollständig von der Ethanolaminlösung bedeckt waren. Wieder wurde der Exikator 2 x mit N₂ gefüllt und Platten und Nadeln darin bei leichtem N₂-Druck über Nacht gelagert. Am folgenden Tag wurden Nadeln und Platte in DMSO gespült und mit N₂ trocken geblasen. So behandelt konnten Nadeln und Platte im Exsikkator lagern.

SATP-Kopplung an Protein

SATP (N-Succinimidyl3-(acetylthio)propionat) wurde in 10-fachem Überschuss zu dem Protein gegeben und 20 min bei RT in einem Eppendorfgefäß auf einen Magnetrührer gestellt. Anschließend wurde das Protein gegen HBSS dialysiert.

Proteinkopplung an mit Ethanolamin-beschichtete Platten und Nadeln

1 mg Polyethylenglycol (PEG) wurde in 1 ml Chloroform gelöst und in ein Becherglas überführt. Mit Ethanolamin beschichtete Nadeln und Glimmerplatten wurden für 30 min in die PEG-Lösung gelegt. In der Zwischenzeit wurden 650 µl HBSS + 250 µl Hydroxylamin Reagenz (0,5 M NH₂OH·HCl; 25 mM EDTA; pH 7,5) + 100 µl Protein (SATP gekoppelt) angesetzt. Nadeln und Platten wurden mit Chloroform gespült, mit N₂ getrocknet und in die Proteinlösung gelegt. Nach einer Stunde wurden sie in HBSS umgelagert. Funktionalisiertes PEG wurde von Dr. Hermann Gruber (Universität Linz) synthetisiert.

4.4.5. Laserpinzette

4.4.5.1. Prinzip der Laserpinzette

Seit einigen Jahren findet die Laserpinzette vermehrt ihre Anwendung in den Biowissenschaften (Ashkin et al., 1970).

Mit der Laserpinzette wurde die Haftung von Dsg 1-beschichteten Mikroperlen auf kultivierten humanen Keratinozyten untersucht. Mit Hilfe der Laserpinzette war es möglich durch Fokussierung eines Laserstrahls Objekte von wenigen Mikrometern Durchmesser einzufangen und zu bewegen.

Der Strahl eines Infrarotlasers (= 1064 nm) wird mit Hilfe von Umlenkungsspiegeln in einen Mikroskopeingang gelenkt. Eine genügend starke Fokussierung des Lichtstrahls wird durch hochauflösende Objektive hoher numerischer Apertur erreicht. Mit

Hilfe einer Videokamera kann der Fokus des Laserstrahls auf die Objektebene des Mikroskops eingestellt und die Mikroperlen gezielt durch den Laserstrahl bewegt werden (Abb.8).

4.4.5.2. Messungen mit der Laser-Pinzette

Humane Keratinozyten wurden auf sterile runde Deckgläser (Durchmesser 22 mm) ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden die Deckgläser auf einen Metallobjektträger mit passgenauer Fräsung gelegt, der das Betrachten des Deckglases von unten erlaubte, und mit 200 μ l DMEM-Medium bedeckt. Zu den Zellen wurden 10 μ l Mikroperlen-Suspension gegeben und die Perlen, nach 30 min Inkubation, auf den Zellen mit der Laserpinzette bewegt. Zusätzlich wurden mit Mikroperlen inkubierte Zellen unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt, wie Inkubationen mit Patienten-IgG oder Medium unterschiedlicher Ca^{2+} -Konzentrationen.

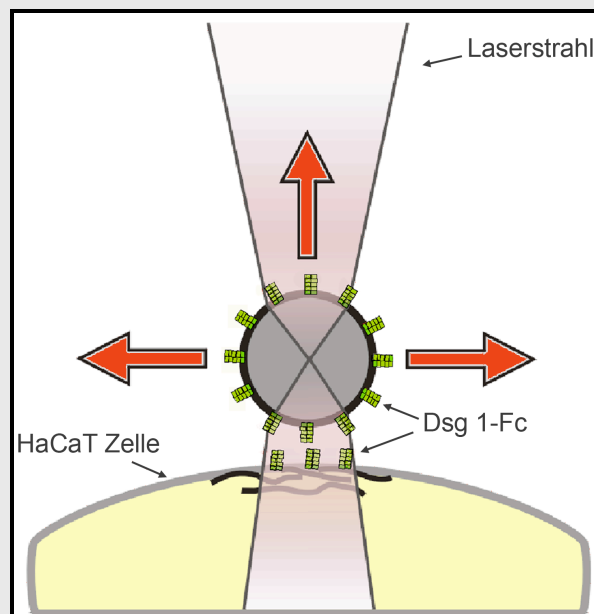


Abb. 8: Prinzip der Laserpinzette

Eine im Laserstrahl eingefangene, mit Dsg 1-beschichtete Mikroperle auf humanen Keratinozyten. Ließ sich die Mikroperle durch Verschiebung des Laserstrahls bewegen, zählte sie als nicht gebunden.

4.4.5.3. Beschichtung von Protein-A Mikroperlen

10 μ l einer Lösung, die 2×10^9 Mikroperlen/ml Protein A-beschichtete Polystyren-Mikroperlen (Durchmesser 2,8 μ m) enthielt wurden 3 x mit 100 μ l 0,1 M Natriumphosphatlösung (pH 8,1) in einem Eppendorf-Gefäß gewaschen. Das Eppendorf-Gefäß wurde dazu in einen Magnethalter gestellt, wodurch sich die magnetischen Mikroperlen an der Gefäßwand sammelten und die Flüssigkeit abgezogen werden konnte. Die Mikroperlen wurden in 100 μ l 0,5 M Natriumphosphatlösung (pH 8,1) mit 10 μ g Dsg 1-Fc-Fusionsprotein über Nacht bei 4° C auf einem Drehrad inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Mikroperlen 3 x mit 0,1 M Natriumphosphatlösung (pH 8,1) und 3 x mit 0,1 M Boratpuffer (pH 9,0) gewaschen und 45 min in 0,1 M Boratpuffer (pH 8,5) mit 0,54 mg DMP, bei RT auf einem Drehrad, inkubiert. DMP diente zur Quervernetzung von Protein A und den Fc-Teilen des IgG. Die Mikroperlen wurden 2 x mit 100 μ l 0,2 M Ethanolamin (pH 8,0) gewaschen, darin aufgenommen, und 2 h bei RT auf einem Drehrad belassen. Danach wurden die Mikroperlen 3 x 5 min mit HBSS gewaschen und in HBSS bei 4° C auf dem Drehrad bis zum Gebrauch aufbewahrt. Die Mikroperlen-Konzentration betrug etwa $1,6 \times 10^8$ Mikroperlen/ml.

4.4.6. Messungen mit der Ca^{2+} -Elektrode

Die Ca^{2+} -Konzentrationen für die Messungen an der Laserpinzette und am AFM wurden mit einer Ca^{2+} -Elektrode eingestellt. Für die Messungen mit der Laserpinzette wurden Lösungen mit ansteigenden Ca^{2+} -Konzentrationen in DMEM hergestellt. Das Medium mit einer Ca^{2+} -Konzentration von 1,8 mM wurde mit einer 100 mM EDTA-Stammlösung auf Ca^{2+} -Konzentrationen von 0,1-1,75 mM Ca^{2+} eingestellt und mit einer 100 mM Ca^{2+} -Stammlösung wurden die Werte 2,0 und 2,5 mM Ca^{2+} eingestellt. Vor Beginn der Messung wurde die Elektrode in 0,1 mM Ca^{2+} in DMEM 20 min adaptiert. Zwischen den einzelnen Proben wurde die Elektrode mit H_2O gespült. Eine Reihe mit aufsteigenden Ca^{2+} -Konzentrationen für die AFM-Versuche wurde wie beschrieben, jedoch in HBSS, statt DMEM, hergestellt. Die von der Elektrode gemessenen Werte wurden in mV angegeben, diese waren direkt proportional zum Logarithmus des entsprechenden Ca^{2+} -Wertes. Die gemessenen Werte wurden mit einer Ca^{2+} -Standardreihe verglichen. Zusätzlich wurden die erstellten Ca^{2+} -Lösungen mit dem Gerät Hitachi 747 automatisch ausgewertet. Das Testprinzip dieses Gerätes ist ein Farbtest mit einem Endpunktttest und einem Probenleerwert (DMEM bzw. HBSS).

Methoden

Die Messungen mit dem Gerät wurden im Zentrallabor der Poliklinik in Würzburg vorgenommen.

5. Ergebnisse

5.1. Proteingewinnung und Charakterisierung der kultivierten humanen Keratinozyten

5.1.1. Umklonierung des Dsg 1-Fc-Fusionsproteins in einen eukaryontischen Expressionsvektor

Um das in dieser Arbeit verwendete Protein, bestehend aus dem extrazellulären Anteil von Dsg 1 und dem Fc-Teil eines humanen Immunglobulin G (IgG) in eukaryontischen Zellen exprimieren zu können, wurde zunächst das Ausgangsplasmid pEVmod-Dsg 1-Ig-his (7,3 kb) mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Bgl*II und *Kpn*I geschnitten. Dadurch wurde die Dsg 1-Fc-Sequenz von dem Vektor pEVmod getrennt. Der präparative Restriktionsverdau wurde auf ein Agarosegel aufgetragen, die entsprechende Bande aus dem Gel geschnitten und aufgereinigt (Abb.9, Spur 2+3). Der eukaryontische Expressionsvektor pEGFPN₃ (4,7 kb) wurde mit denselben Enzymen geschnitten und ebenfalls aus einem Agarosegel aufgereinigt (Abb.9, Spur 4+5). Die Dsg 1-Fc-Sequenz wurde in den eukaryontischen Expressionsvektor pEGFPN₃ ligiert. Der Ligationsansatz wurde in DH5 α -Bakterien transformiert und auf LB-Agarplatten, denen Kanamycin zugesetzt wurde, ausgestrichen. Die gewachsenen Klone wurden mit einem Zahnstocher von der Platte aufgenommen und in Reagenzgläsern mit LB-Medium kultiviert. Die daraus gewonnen Plasmid-Minipräparationen wurden auf ein Agarosegel aufgetragen, und Klone der richtigen Größe wurden mit den Enzymen *Bgl*II und *Kpn*I geschnitten. Bei einem korrekt ligierten Klon zeigte das Gel eine Bande entsprechend der Größe des Vektors und eine, die der Größe der Dsg 1-Fc-Sequenz (2,3 kb) entsprach (Abb.9, Spur 6+7).

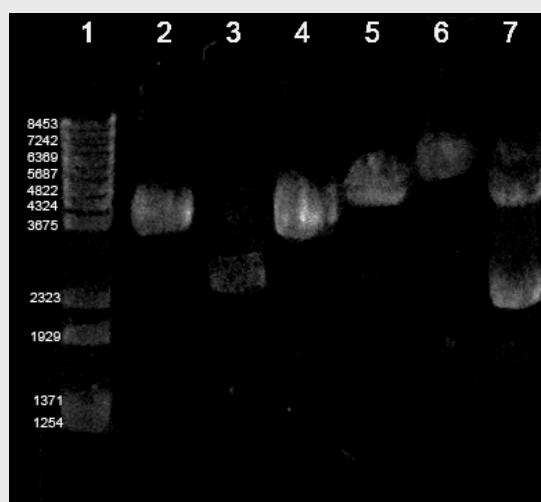


Abb. 9: Agarosegel zur Dokumentation der Umklonierung

Spur1: F-Marker (5 µl)

Spur2: Minipräparation Dsg 1-Fc in pEVmod-Vektor (5 µl)

Spur3: Gelextraktion Dsg 1-Fc (5 µl)

Spur4: Minipräparation pEGFPN₃-Vektor (5 µl)

Spur5: Gelextraktion pEGFPN₃-Vektor (5 µl)

Spur6: Ligation Dsg 1 in pEGFPN₃-Vektor (5 µl)

Spur7: Restriktionsverdau Dsg 1-Fc in pEGFPN₃-Vektor (5 µl)

Die Minipräparationen von Dsg 1-Fc in pEGFPN₃ wurden, zusammen mit dafür entworfenen Primersequenzen, an MWG Biotech AG gesandt und eine Sequenzierung der Proben in Auftrag gegeben. Mit den Primern CMV-forward, Dsg 1-ab672Gen, Dsg 1-ab1179Gen, Dsg 1-ab1681Gen und pEGFPN₁-reward (Kapitel 3.7.3.) konnte die Dsg 1-Fc-Sequenz überprüft werden. Die Sequenzierung bestätigte die Richtigkeit und Vollständigkeit der Dsg 1-Fc-Sequenz.

5.1.2. Generierung einer stabil transfizierten Zelllinie

Das Dsg 1-Fc-Fusionsprotein wurde, nach Ligation in den eukaryontischen Expressionsvektor pEGFPN₃, in CHO-Zellen transfiziert. Da aufgrund des Stop-codons am Ende der Dsg 1-Fc-Sequenz das GFP-Signal des Vektors nicht gelesen wurde, wurden die Zellen mit einem pEGFPN₃-Vektor ohne Dsg 1-Fc-Sequenz co-transfiziert, um dennoch eine Selektionierung der Zellen anhand des GFP-Signals durchführen

zu können. Der Erfolg der Generierung dieser stabil transfizierten Zelllinie wurde mit der Immunfluoreszenz überprüft (Abb. 10).

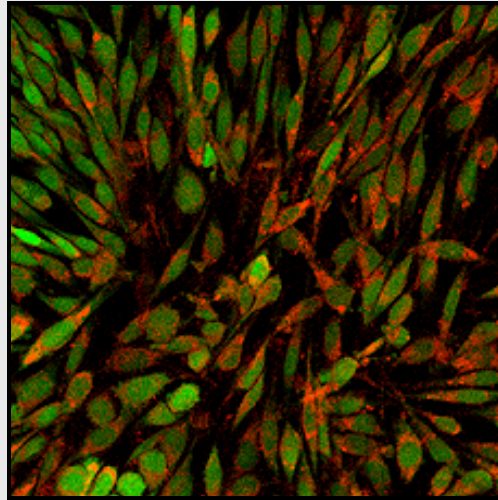


Abb. 10: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Expression von Dsg 1 durch CHO-Zellen

Dokumentation der stabilen Transfektion durch GFP und Immunfluoreszenz. Die Co-Transfektion mit pEGFPN₃ führte zu einer Grün-Fluoreszenz der Zellen. Um den Erfolg der Dsg 1-Transfektion zu überprüfen, wurden Antikörper gegen Dsg 1 (1:50) verwendet, die mit Cy₃-markierten 2. AK (Ziege-anti-Maus-cy₃, 1:600) sichtbar gemacht wurden. Die Fluoreszenzmikroskopie zeigt, dass die Zellen sowohl das GFP-Signal des Vektors (grün) als auch Dsg 1 (rot), exprimieren.

5.1.3. Proteinaufreinigung mit Protein A-Affinitätschromatographie

Das von den stabil transfizierten CHO-Zellen exprimierte und in den Überstand abgegebene Protein wurde über eine Protein A-Säule aufgereinigt. Dafür wurden durchschnittlich 500-1000 ml Zellüberstand verwendet. Die durch Elution mit Na-Phosphat erhaltenen Eluate umfassten je 500 µl und wurden gegen HBSS dialysiert. Der Proteingehalt wurde mit der Bradford-Methode bestimmt. Bei den Aufreinigungen wurden in den beiden ersten Eluaten durchschnittlich Proteinkonzentrationen von 200-300 ng/µl erreicht. Die Reinheit des Eluats wurde mit einem Coomassie-Blau gefärbtem SDS-Polyacrylamid-Gel überprüft (Abb.11, rechts). Ein Immunoblot zeigte, dass das Protein von einem gegen Dsg 1 gerichteten monoklonalen Antikörper erkannt wurde (Abb.11, links).

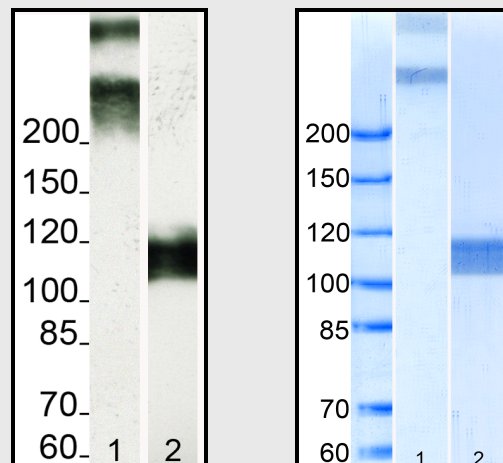


Abb. 11: Nachweis des Dsg 1 Fusionsproteins durch Immunoblot und ein mit Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamid-Gel

Der Immunoblot (links) zeigt, dass das Dsg 1-Fc-Fusionsprotein von einem gegen die extrazelluläre Domäne von Dsg 1 gerichteten monoklonalen Antikörper erkannt wurde (1. AK: α -Dsg 1 (1:50); 2. AK Peroxidase markierter Ziege-anti-Maus-Antikörper (1:3000)). Spur 1 zeigt das Protein als Dimer unter nicht reduzierenden Bedingungen (-DTT), Spur 2 das Monomer unter reduzierenden Bedingungen (+DTT). Das mit Coomassie-Blau-gefärbte Gel (rechts) zeigt, dass die Proteinaufreinigung rein war. Je Spur wurden 2 μ g Dsg 1-Fc Fusionsprotein eingesetzt.

5.1.4. Charakterisierung der humanen Keratinozyten (HaCaT)

Die Untersuchungen zur Ca^{2+} -Abhängigkeit der Dsg 1-Bindung sowie zum Einfluss von Pemphigus foliaceus IgG auf die Dsg 1-vermittelte Adhäsion wurden mit kultivierten humanen Keratinozyten (HaCaT) durchgeführt. Daher wurden die Keratinozyten zunächst bezüglich der Expression und Lokalisation der wesentlichen desmosomalen Proteine charakterisiert. Zunächst konnte gezeigt werden, dass Dsg 1 und Dsg 3 von der verwendeten HaCaT-Zelllinie exprimiert wurden (Abb.12)

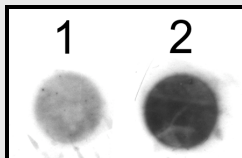


Abb. 12: Nachweis von Dsg 1 + 3 in HaCaT-Zellen durch Dot-Blot-Analyse

Der Dot-Blot zeigt, dass in humanen Keratinozyten (Zellen einer T25 in PBS aufgenommen) sowohl Dsg 1 (1) als auch Dsg 3 (2) nachweisbar war.

α -Dsg 1 + 3 wurden 1:50 eingesetzt. Als 2. AK wurde ein Peroxidase-markierter Ziege-anti-Maus-Antikörper 1: 3000 verwendet.

Die desmosomalen Proteine Dsg 1, Dsg 3, Plakoglobin und Desmoplakin waren entlang der Zellgrenzen lokalisiert, das Intermediärfilamentprotein Zytokeratin 18 bildete ein dichtes zytoplasmatisches Netzwerk (Abb.13). Um zu beweisen, dass HaCaT-

Ergebnisse

Zellen auch vollständige Desmosomen ausbilden, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Wie aus Abb.14 hervorgeht, bilden HaCaT-Zellen typische Desmosomen aus, die zum Teil auf fingerförmigen Fortsätzen zwischen den Zellen zu finden waren.

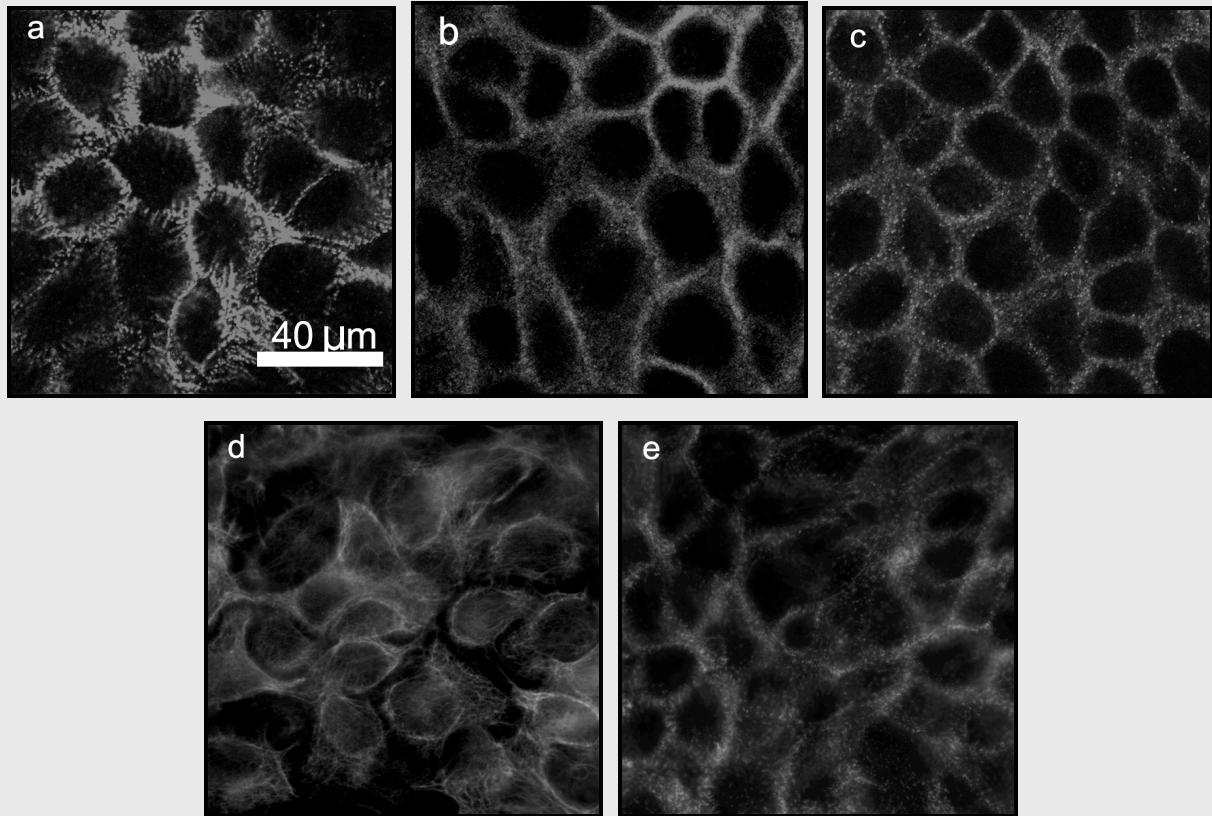


Abb. 13: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung der Lokalisation von desmosomalen Proteinen in HaCaT-Zellen

Dsg 1 (a), Dsg 3 (b), Plakoglobin (c), und Desmoplakin (e) waren entlang der Zellgrenzen lokalisiert. Zytokeratin 18 (d) bildete ein dichtes zytoplasmatisches Netzwerk.

a-Dsg 1 wurde 1: 50 eingesetzt. Dsg 3 wurde in einer Verdünnung von 1:100 verwendet, ebenso a-Plakoglobin, a-Cytokeratin 18 und a-Desmoplakin. Es wurde ein Cy₃-markierter 2. AK Ziege-anti-Maus 1:600 eingesetzt.

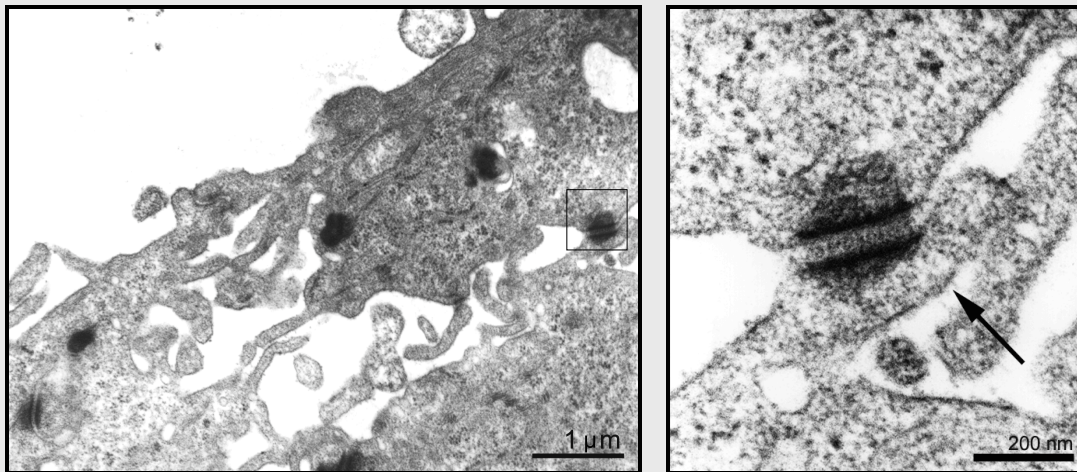


Abb. 14: Nachweis von Desmosomen in HaCaT-Zellen durch Transmissionselektronenmikroskopie

In der Übersicht (links) sind fingerförmige Kontakte mit Desmosomen zwischen drei HaCaT-Zellen zu erkennen. Das elektronenmikroskopische Bild zeigte, dass HaCaT-Zellen Desmosomen ausbilden. In dem Bildausschnitt ist ein Desmosom im Bereich eines fingerförmigen Kontaktes zu sehen (Pfeil).

5.1.5. Charakterisierung der Zell-Mikroperlen-Kontakte

Die humanen Keratinozyten bildeten zu Dsg 1-beschichteten Mikroperlen Kontakte aus. Für die Experimente wurden Mikroperlen 30 min auf HaCaT-Zellen inkubiert. Unbeschichtete Mikroperlen dienten als Negativkontrolle (Abb.15, e+f). Die Immunfluoreszenzmikroskopie bestätigte, dass die Mikroperlen mit Dsg 1 beschichtet waren (Abb.15, a) und zeigte weiterhin, dass neben Dsg 1 auch Dsg 3 und Plakoglobin in der Zellmembran unter den gebundenen Dsg 1-beschichteten Mikroperlen lokalisiert waren (Abb.15, b-d). Im Gegensatz dazu fanden sich unter unbeschichteten Mikroperlen keine desmosomalen Proteine (Abb.15, f). Die Art des Zell-Mikroperlen-Kontaktes wurde in rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen sichtbar (Abb. 16, a). Die Zellen bildeten fingerförmige Kontakte zu den Mikroperlen aus. Die transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme zeigte die Ähnlichkeit dieser fingerförmigen Fortsätze mit denen, die HaCaT-Zellen zu ihren Nachbarzellen ausbildeten (Abb. 16, b). Typische Desmosomen konnten an der Kontaktfläche zu den Mikroperlen jedoch nicht nachgewiesen werden.

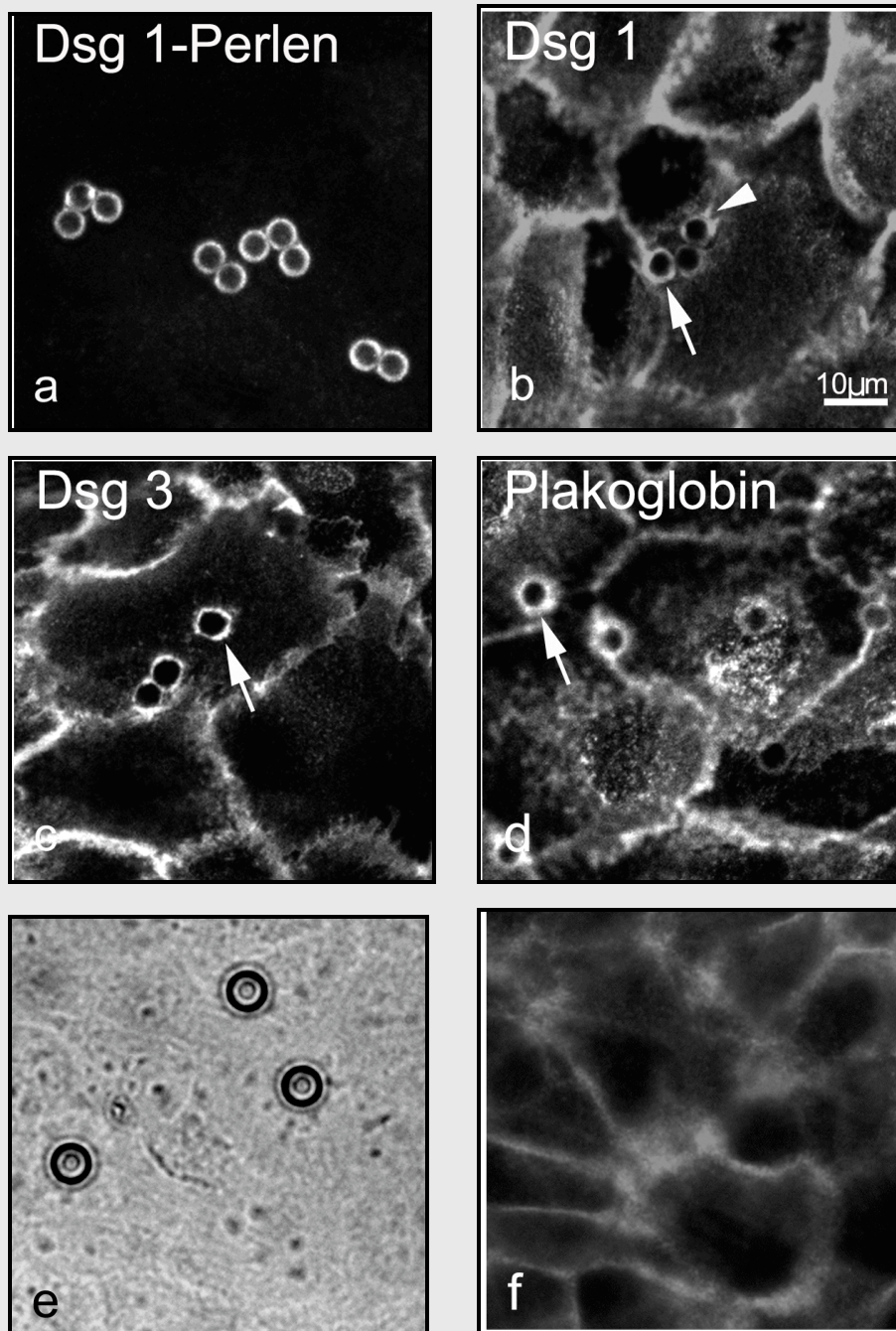


Abb. 15: Immunfluoreszenzmikroskopische Charakterisierung der Zell-Mikroperlen-Kontakte

Dsg 1-beschichtete Mikroperlen wurden von einem Dsg 1-Antikörper (1:50) erkannt (a). Dsg 1-beschichtete Mikroperlen wurden 30 min auf HaCaT-Zellen belassen. Der Dsg 1-Antikörper (1:50) erkannte nicht nur das an die Perlen gebundene rekombinante Dsg 1 (b, Pfeil) sondern auch endogenes Dsg 1 der Zellen (b, Pfeilspitze). Die desmosomalen Strukturproteine Dsg 3 (1:50) und Plakoglobin (1:100) waren in der Zellmembran unter den gebundenen Mikroperlen lokalisiert (c+d, Pfeile). Unter unbeschichteten Mikroperlen waren keine desmosomalen Proteine erkennbar (a: Dsg 1; 1:50) (f). Als Zweitantikörper wurde Ziege-anti-Maus-Cy₃ verwendet (a-d, f). Abb. e ist eine Phasenkontrastaufnahme.

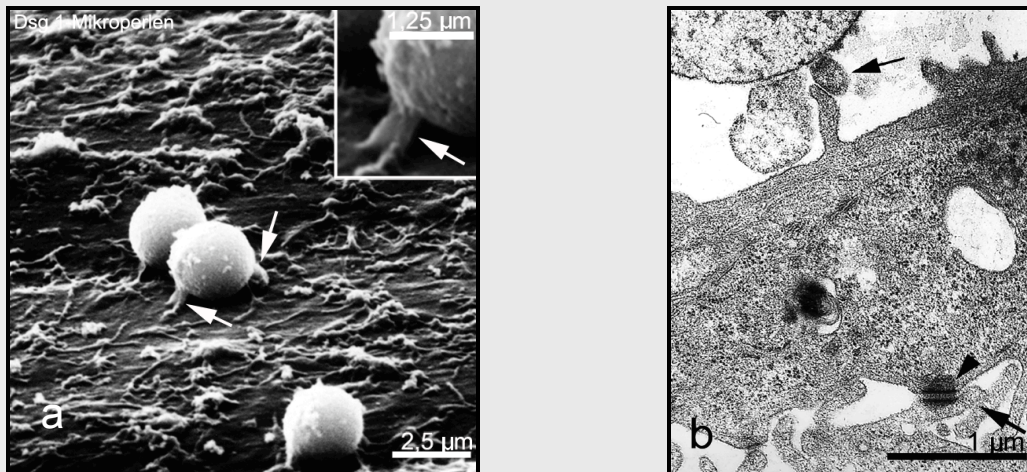


Abb. 16: Elektronenmikroskopische Charakterisierung der Zell-Mikroperlen-Kontakte

Die Rasterelektronenmikroskopie zeigt Kontakte zwischen HaCaT-Zellen und Dsg 1-beschichteten Mikroperlen. Man beachte die fingerförmigen Fortsätze zwischen Zelloberfläche und Mikroperlen (Abb.16 a, Pfeile). In der transmissionelektronenmikroskopischen Aufnahme ist die Ähnlichkeit der fingerförmigen Fortsätze zwischen Zelle und Mikroperle (Abb.16 b, Pfeil), mit Fortsätzen zwischen zwei benachbarten Zellen zu sehen. Die Pfeilspitze in Abb.16 b weist auf ein Desmosom, das teilweise auf einem Zellfortsatz liegt (untere Zelle).

5.2. Untersuchung der Adhäsionsstärke und Ca^{2+} -Abhängigkeit der Desmoglein 1-Transinteraktion

5.2.1. Dsg 1-Bindung und Verteilung der auftretenden Kraftpopulationen in Abhängigkeit von der Zuggeschwindigkeit

Die Bindungsstärke der homophilen Dsg 1-Transinteraktion wurde durch Einzelmolekül-Atomkraftmikroskopie (AFM) untersucht. Dafür wurden Kraft-Abstands-Messungen durchgeführt. Rekombinantes Dsg 1 wurde an Nadel und Platte des AFM gekoppelt (Abb.6). Durch Annähern der Nadel an die Platte gelangten die Moleküle miteinander in Kontakt. Interaktionen zwischen Dsg 1-Molekülen konnten während der gesamten Kontaktzeit auftreten. Kam es zu einer Transinteraktion, wurde eine abwärts-gerichtete Ablenkung des Federbügels (Deflektion) registriert. Die Fläche zwischen der Neutralkurve und der Deflektionskurve, die Aufwärts- und Abwärtsbewegungen des Federbügels repräsentierten, wurde als Maß für die durchschnittliche Bindungsaktivität genommen (Abb.7). Die Kraft-Abstands-Messungen wurden bei Zuggeschwindigkeiten von 300 nm/s-6000 nm/s in HBSS

durchgeführt. Jede Messung wurde 4 x durchgeführt, mit jeweils 300 Abrissen. Die Interaktionszeit blieb bei allen Messungen konstant. Die Untersuchungen bei verschiedenen Zuggeschwindigkeiten zeigten, dass die auftretenden Kräfte in etwa ganzzahlige Vielfache der kleinsten Krafteinheit von 37 pN waren, die benötigt wurde, um die Dsg 1-Bindung zu lösen. Die Häufigkeit des Auftretens höherer Bindungskräfte korrelierte positiv mit der Zuggeschwindigkeit. Bei Zuggeschwindigkeiten von 300 nm/s lag der prozentuale Anteil der kleinsten Krafteinheit von 37 pN bei $\approx 65\%$ (Abb.17, dunkelrot). Bei 6000 nm/s stieg die Bindungskraft der kleinsten Kraftpopulation auf 68 pN an, wobei diese nur noch etwa 30 % der Abrisskräfte ausmachte (Abb.17, gelb). Dagegen traten vermehrt Vielfache von 68 pN auf.

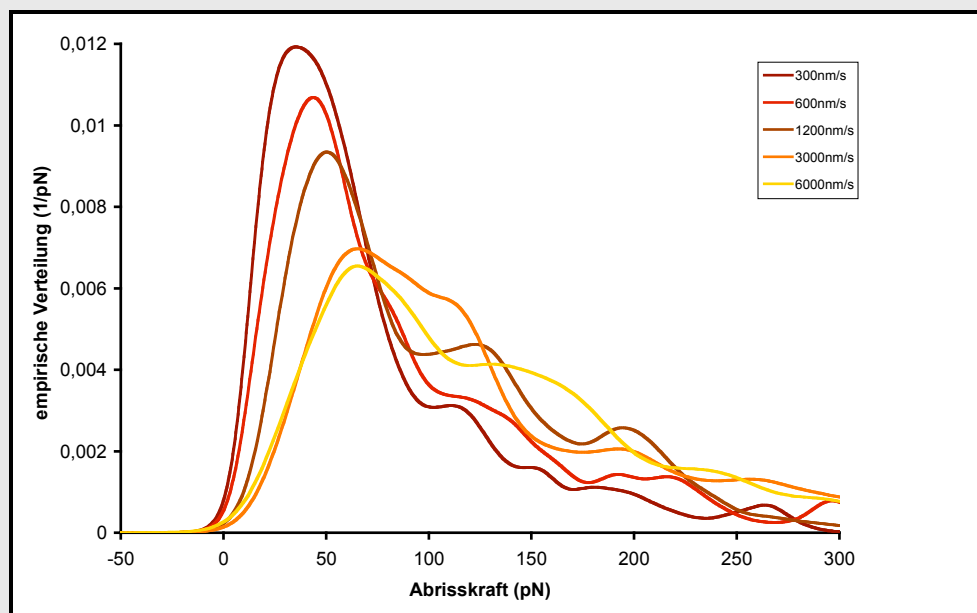


Abb. 17: Bindungsstärken der homophilen Dsg 1-Bindung bei unterschiedlichen Zuggeschwindigkeiten

Die Abb. zeigt die Kraftverteilung der homophilen Dsg 1-Bindung bei unterschiedlichen Zuggeschwindigkeiten. Bei einer Zuggeschwindigkeit von 300 nm/s traten kleinste Krafteinheiten von durchschnittlich 37 pN mit einem prozentualen Anteil von $\approx 65\%$ auf (dunkelrote Kurve). Bei 6000 nm/s Zuggeschwindigkeit betrug der Anteil der kleinsten Kraftpopulation 68 pN mit einer Häufigkeit von etwa 30 % der Abrissereignisse und es traten vermehrt Vielfache von 68 pN auf. Genaue Analysen ergaben, dass die auftretenden Kräfte in etwa ganzzahlige Vielfache der jeweiligen kleinsten Krafteinheit waren. Größe und Häufigkeit des Auftretens der kleinsten Krafteinheit waren demnach abhängig von der Zuggeschwindigkeit.

Die Abrisskraft hing von der Zuggeschwindigkeit ab. Die kleinsten Abrisskräfte waren außerdem exponentiell von der Zuggeschwindigkeit abhängig (Abb.18, a). Aus diesem Verhalten ließ sich nach der BELL-Formel die Lebensdauer der kleinsten Kraft-einheit abschätzen. Diese betrug 0,17 s, was einer Kraft von $5,88 \text{ s}^{-1}$ entspricht. Auch die Verteilung der Kraftpopulationen war strikt von der Zuggeschwindigkeit abhängig (Abb.18, b). Die Dsg 1-Bindungen lösten sich bei niedrigen Zuggeschwindigkeiten sequenziell, wohingegen sie bei hohen Zuggeschwindigkeiten synchron rissen. Gleiche Ergebnisse wurden auch mit Nadeln erzielt, bei denen nur ein Dsg 1-Molekül an die Spitze gebunden war, so dass ausgeschlossen werden konnte, dass die größeren Abrisskräfte auf gleichzeitigen Abrissen von mehreren miteinander interagierenden Dsg 1-Molekülen beruhten.

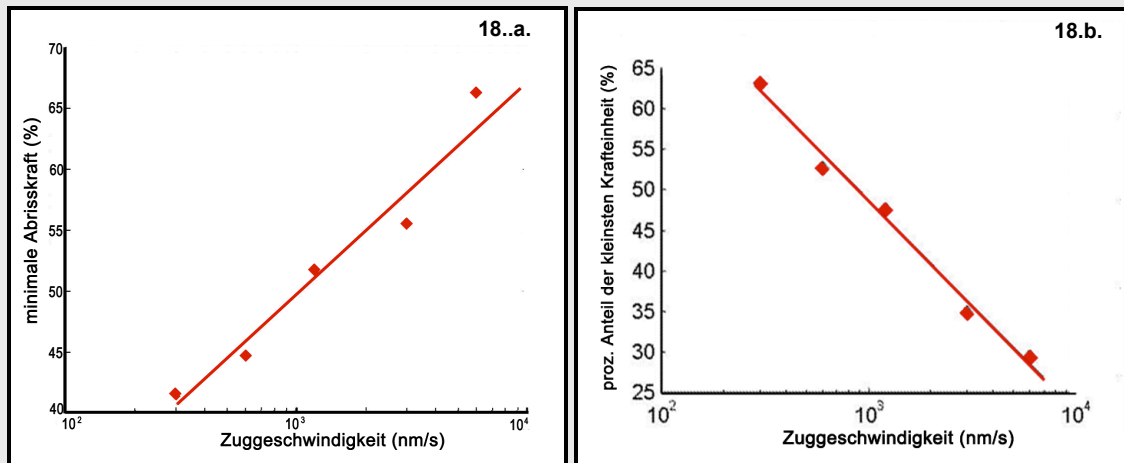


Abb. 18: Verteilung der Abrisskräfte bei unterschiedlichen Zuggeschwindigkeiten

Die minimale Abrisskraft nahm exponentiell mit der Zuggeschwindigkeit zu (18, a). Die Häufigkeit der kleinsten Kraftpopulation nahm exponentiell mit der Zuggeschwindigkeit ab (18, b).

5.2.2. Ca^{2+} -Abhängigkeit der homophilen Dsg 1-Transinteraktion

Die Ca^{2+} -Abhängigkeit der homophilen Dsg 1-Transinteraktion wurde ebenfalls mit dem AFM untersucht. Die Messungen erfolgten bei Ca^{2+} -Konzentrationen von 0,1–2,5 mM Ca^{2+} in HBSS mit Zuggeschwindigkeiten von 800 nm/s und 0,1 s Interaktionszeit. Jeder der insgesamt 6 Versuche fand unter den gleichen Konditionen statt. Eine Reihe mit verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen wurde mit einer identischen Nadel und Platte gemessen. Jeder Punkt der Abbildung 7 repräsentiert die Durchschnittsaktivität von mindestens 300 Abrissen. Aus insgesamt sechs Messrei-

hen mit je 300 Abrissen ergab sich eine K_D von 0,79 mM Ca^{2+} und eine hohe Kooperativität (Hill-Koeffizient $> 4,0$).

Die Abb.19 zeigt eine repräsentative Kurve aus den 6 Experimenten.

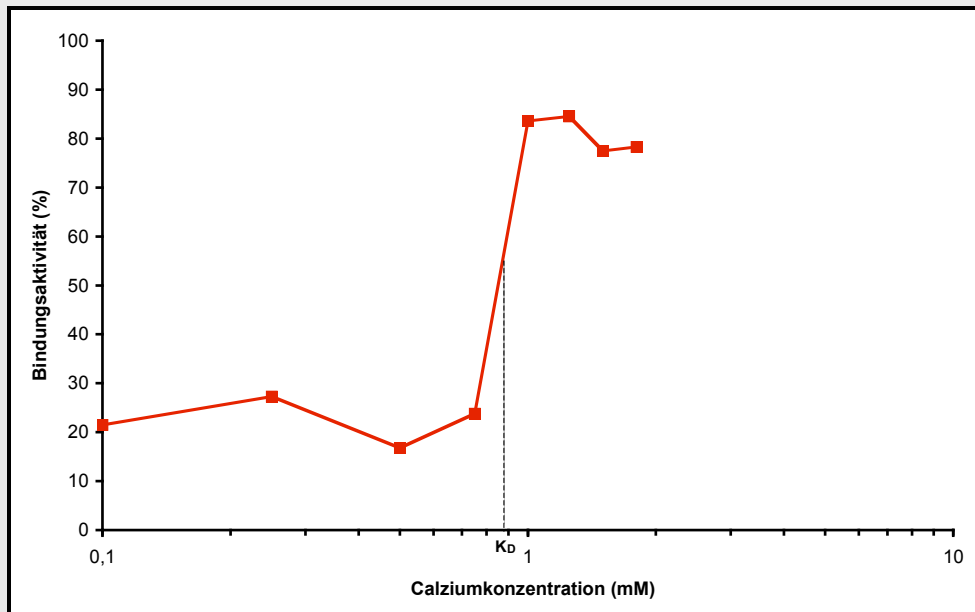


Abb. 19: Ca^{2+} -Abhängigkeit der Dsg 1-Bindung, gemessen mit dem AFM

Die Abbildung zeigt eine repräsentative Kurve aus 6 Messungen in HBSS mit Ca^{2+} -Konzentrationen von 0,1-2,5 mM. Für die abgebildete Kurve ergab sich eine K_D von 0,875 mM Ca^{2+} mit hoher Kooperativität (Hill-Koeffizient $> 4,0$).

5.2.3. Ca^{2+} -Abhängigkeit der Dsg 1-Bindung zwischen Dsg 1-beschichteten Mikroperlen und Keratinozyten

Die Messung der Ca^{2+} -Abhängigkeit der Dsg 1-Bindung zwischen Mikroperlen und HaCaT-Zellen wurde in Zellkulturmedium mit Ca^{2+} -Konzentrationen von 0,1-2,5 mM Ca^{2+} durchgeführt. Diese Untersuchungsserie ergab eine mit den AFM-Ergebnissen vergleichbare Kooperativität der Bindungsstellen (Hill-Koeffizient = 4,0), aber eine deutlich höhere K_D von 1,6 mM Ca^{2+} (n=6) (Abb.20).

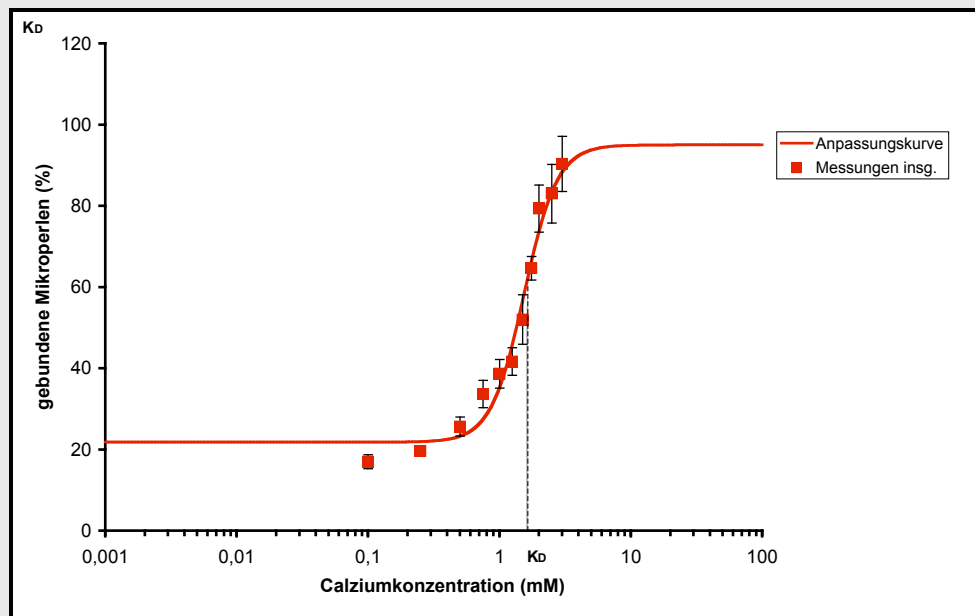


Abb. 20: Ca^{2+} -Abhängigkeit der Dsg 1-Bindung, gemessen mit der Laserpinzette

Ca^{2+} -Abhängigkeit der Dsg 1-Bindung zwischen Keratinozyten und Dsg 1-beschichteten Mikroperlen. Die Mittelwerte aus 6 Messungen ergaben eine K_D von 1,6 mM Ca^{2+} mit einer hohen Kooperativität (Hill-Koeffizient = 4,0).

5.3. Einfluss von PF-IgG auf die Dsg 1-Transinteraktion

5.3.1. Aufreinigung von PF-IgG

IgG-Fractionen aus Seren zweier PF-Patienten, deren Diagnose klinisch, histologisch und serologisch gesichert worden war, und Serum eines Probanden ohne Hauterkrankung (Kontrollserum), wurden mit Protein-A-Affinitätschromatographie aufgereinigt. PF-Serum 1 stammte von einem Patienten, dessen klinisches Bild in Abb.3 gezeigt wurde. Der Erfolg der Aufreinigung der IgG-Fractionen wurde durch Gelelektrophorese und Coomassie-Blau-Anfärbung überprüft. Die Fraktion bestand im Wesentlichen aus schweren (~ 55 kD) und leichten Ketten (~ 25 kD) der Immunglobuline. Mit Hilfe der Dot-Blot-Analyse konnte gezeigt werden, dass das rekombinante Dsg 1-Fc von gereinigten Seren von PF-Patienten (PF-IgG) erkannt wurde. (Abb.21). Gereinigtes Serum eines nicht an Pemphigus foliaceus erkrankten Probanden erkannte das Protein dagegen nicht (Abb.21). Um zu zeigen, dass gegen Dsg 1 gerichtete Antikörper aus den PF-IgG-Fractionen auch das native Dsg 1-Fusionsprotein an der Oberfläche der Mikroperlen erkennen, wurde PF2-IgG mit Dsg 1-beschichteten und VE-Cadherin-beschichteten (Kontrolle) Perlen

Ergebnisse

immunabsorbiert. Das immunabsorbierte PF-IgG wurde 1:20 in DMEM eingesetzt. Immunabsorption des PF2-IgG mit Dsg 1-beschichteten Perlen bewirkte eine deutliche Reduktion des Dsg 1-Signals (Abb.21). PF2-IgG, das mit VE-Cadherin-beschichteten Perlen immunabsorbiert wurde, ergab ein deutliches Signal für Dsg 1 im Dot-Blot, wenn auch etwas schwächer als vor der Immunabsorption (Abb.21). Dies zeigt, dass auch durch VE-Cadherin-Fc ein Teil der Dsg 1-spezifischen AK absorbiert wurde. Die Effekte der VE-Cadherin-Fc immunabsorbierten PF-IgG-Fraktionen auf Keratinozyten waren jedoch vergleichbar mit denen von nicht immunabsorbierten PF-IgG (s.u.).

Die IgG-Konzentrationen wurden mit der Bradford-Methode bestimmt und angeglichen. Zunächst wurde für PF1-IgG die Konzentration bestimmt, die in kultivierten Keratinozyten eine Lückenbildung induzierte. PF2-IgG und Kontroll-IgG wurden an die PF1-IgG Konzentration angeglichen. Die Konzentration des monoklonalen α -Dsg 1-AK wurde in der Dot-Blot-Analyse adaptiert (Abb.21)

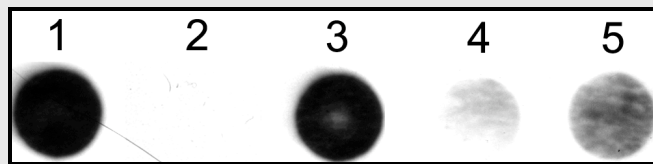


Abb. 21: Dot-Blot-Analysen demonstrieren, dass rekombinantes Dsg 1-Fc durch α -Dsg 1 und PF-IgG erkannt wurde

2 μ l Dsg 1-Fc-Fusionsprotein (0,2 μ g/ μ l) wurden auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Der monoklonale Dsg 1-Antikörper erkannte das Dsg 1-Fc-Fusionsprotein (**1**) (α -Dsg 1: 1:50; Ziege-anti-Maus-peroxidase 1:3000). Für die Versuchsansätze **2-5** wurden biotinylierte IgG-Fraktionen für die Inkubation verwendet. Peroxidase-markiertes Streptavidin (1:1500) diente zum Nachweis des Biotinrestes der IgG-Faktionen. Es konnte gezeigt werden, dass Kontroll-IgG (**2**) im Unterschied zu PF2-IgG (**3**) das Dsg 1-Fc nicht erkennt. Nach Immunabsorption des PF2-IgG mit Dsg 1-beschichteten Mikroperlen konnte das Dsg 1-Fc-Fusionsprotein nicht mehr deutlich nachgewiesen werden (**4**). Im Unterschied dazu erkannte PF2-IgG nach Immunabsorption mit VE-Cadherin-beschichteten Mikroperlen das Protein deutlich, wenn auch schwächer als vor Absorption des PF2-IgGs (**5**).

5.3.2. Effekt von PF-IgG auf HaCaT-Zellkulturen

Um die Wirkung von PF-IgG auf Kulturen humaner Keratinozyten zu testen, wurden humane Keratinozyten mit PF-IgG inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen fixiert und Doppelfärbungen mit ALEXA-Phalloidin, zur Darstellung von F-Actin, und mit AK gegen Dsg 1, Dsg 3 oder Plakoglobin angefertigt. Obwohl Desmogleine in Desmosomen an Zytokeratinfilamente und nicht an F-Actin verankert sind, wurde für die Doppelfluoreszenzen Phalloidin als F-Actin-Marker gewählt, der durch die Anfärbung des kortikalen F-Actins eine bessere Darstellung der Zellgrenzen und Sichtbarmachung von interzellulären Lücken möglich machte als eine Färbung gegen Zytokeratin 18 (vgl. Abb.13, d).

In den Kontrollen war F-Actin entlang der Zellgrenzen verstärkt angereichert (Abb.22, a+c), Dsg 1, Dsg 3 und Plakoglobin (Abb. 23, b; 23, b; 24, b; Vgl. Abb.13, a-c) waren ebenfalls in der Zellperipherie lokalisiert. Dsg 1 und Dsg 3 befanden sich außerdem in zytoplasmatischen Kompartimenten, wahrscheinlich aufgrund von Synthese-, Transport- und Abbauprozessen (Windoffer et al., 2002). Die Färbungen überlagerten sich größtenteils mit der F-Actin-Färbung.

In den Kontrollen waren Dsg 1 und F-Actin entlang der Zellgrenzen angesiedelt (Abb.22, a-c). Im Vergleich hierzu änderte sich die Dsg 1- und F-Actin-Verteilung nach 24 h Inkubation mit Kontroll-IgG (35 µg/ml) nicht (Abb.22, d-f). Inkubation für 24 h mit PF1-IgG (35 µg/ml) dagegen verursachte die Bildung großer interzellulärer Lücken (Abb.22, g+i Pfeile). In den betroffenen Arealen verschwand Dsg 1 von den Zellgrenzen und war auch nicht mehr in zytoplasmatischen Kompartimenten nachweisbar (Abb.22, h Pfeilspitzen). Ebenfalls war eine Umverteilung von F-Actin zu erkennen. PF2-IgG (35 µg/ml) erzeugte dieselben Effekte auf die Zellintegrität und die Dsg 1-Verteilung (nicht gezeigt).

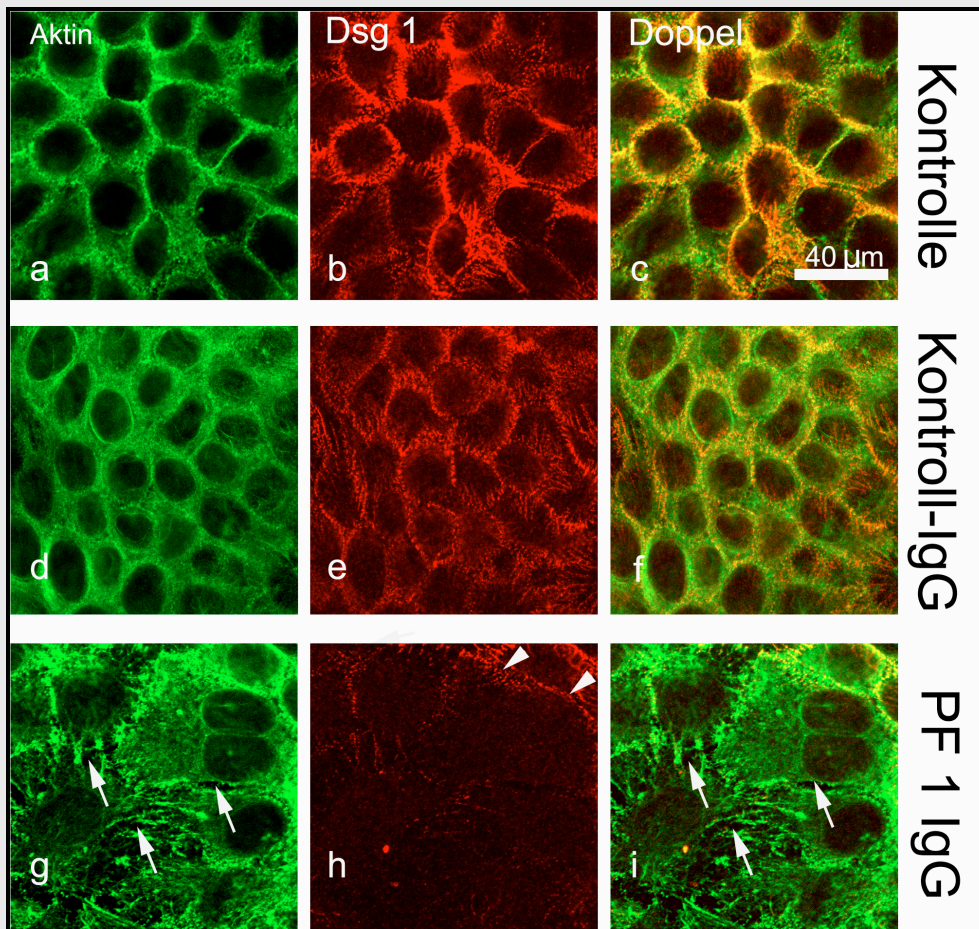


Abb.22: Einfluss von PF-IgG auf die Verteilung von Dsg 1 und F-Actin

HaCaT-Zellen wurden mit α -Dsg 1 (1:50) und mit ALEXA-Phalloidin (1:60) zum Nachweis von F-Actin inkubiert. Dsg 1- und F-Actin-Verteilung waren ohne IgG-Inkubation entlang der Zellgrenzen angereichert (a-c).

Kontroll-IgG hatte keinen Effekt auf die Dsg 1 und F-Actin-Verteilung (d-f). PF1-IgG (klinisches Bild siehe Abb.3.) führte zu Lückenbildung (g+i, Pfeile) und zum Verlust von Dsg 1 in den betroffenen Arealen (h, Pfeilspitzen markieren die Grenze eines betroffenen Areals).

Obwohl Dsg 1 nach Inkubation mit PF-IgG verschwand, blieben Zellkontakte teilweise bestehen. Dsg 3 und Plakoglobin Immunlokalisation sollten zeigen, ob nach Inkubation mit PF-IgG Desmosomen noch vorhanden sind.

Die Verteilung von Dsg 3 ohne IgG-Inkubation entsprach der Verteilung von Dsg 1 und änderte sich ebenfalls nicht nach 24 h Inkubation der HaCaT-Zellen mit Kontroll-IgG (35 μ /ml) (Abb.23, b+e). Dagegen führt eine Inkubation für 24 h mit PF1-IgG (35 μ g/ml Gesamt-IgG) zu großen interzellulären Lücken in den HaCaT-Kulturen, begleitet von gravierenden Änderungen von Zytoskelett und Zellform (Abb.23, g Pfeile). F-Actin verschwand größtenteils von den Zellgrenzen und viele Zellen bildeten deut-

liche Stressfasern aus (Abb.23, g). Dsg 3 verschwand ebenfalls von den Zellgrenzen im Bereich der Lückenbildung. Im Unterschied zu Dsg 1 blieb jedoch Dsg 3 in Bereichen, in denen die Zellen mit Nachbarzellen noch in Kontakt traten und die Lücken mit zytoplasmatischen Ausläufern überspannten, vorhanden (Abb.23, h Pfeilspitzen). PF2-IgG (35µg/ml) verursachte nach 24 h Inkubation dieselben zellulären Effekte (nicht gezeigt).

Um zu untersuchen, ob Dsg 1-spezifische Antikörper die Lückenbildung auslösten, wurde PF-IgG mit Dsg 1 immunabsorbiert. Nach Immunabsorption löste PF-IgG tatsächlich keine Zelldissoziation mehr aus. Es zeigten sich erwartungsgemäß auch keine Änderungen bezüglich der Verteilung von Dsg 3 in den Zellen (Abb.23, k+l) und keine Zytoskelettveränderungen (Abb.23, j+l). Dieses Experiment beweist, dass die Lückenbildung tatsächlich von Dsg 1-spezifischen Antikörpern der PF-IgG Fraktionen ausgelöst wurde und nach Immunabsorption völlig aufgehoben war.

Kontrollabsorptionen von PF-IgG mit VE-Cadherin-beschichteten Mikroperlen verhinderten die Lückenbildung nicht, was weiterhin bestätigt, dass die Lückenbildung durch spezifische Antikörper gegen Dsg 1 aus den PF-IgG-Fractionen hervorgerufen wurde (Abb.23, m-o Pfeile). Eine Inkubation der HaCaT-Zellen für 24 h mit dem monoklonalen Dsg 1-Antikörper der gegen die extrazelluläre Domäne gerichtet war, hatte keine Lückenbildung zur Folge, obwohl dieser Antikörper die Transinteraktion von Dsg 1 im AFM inhibierte (Abb.23, p-r).

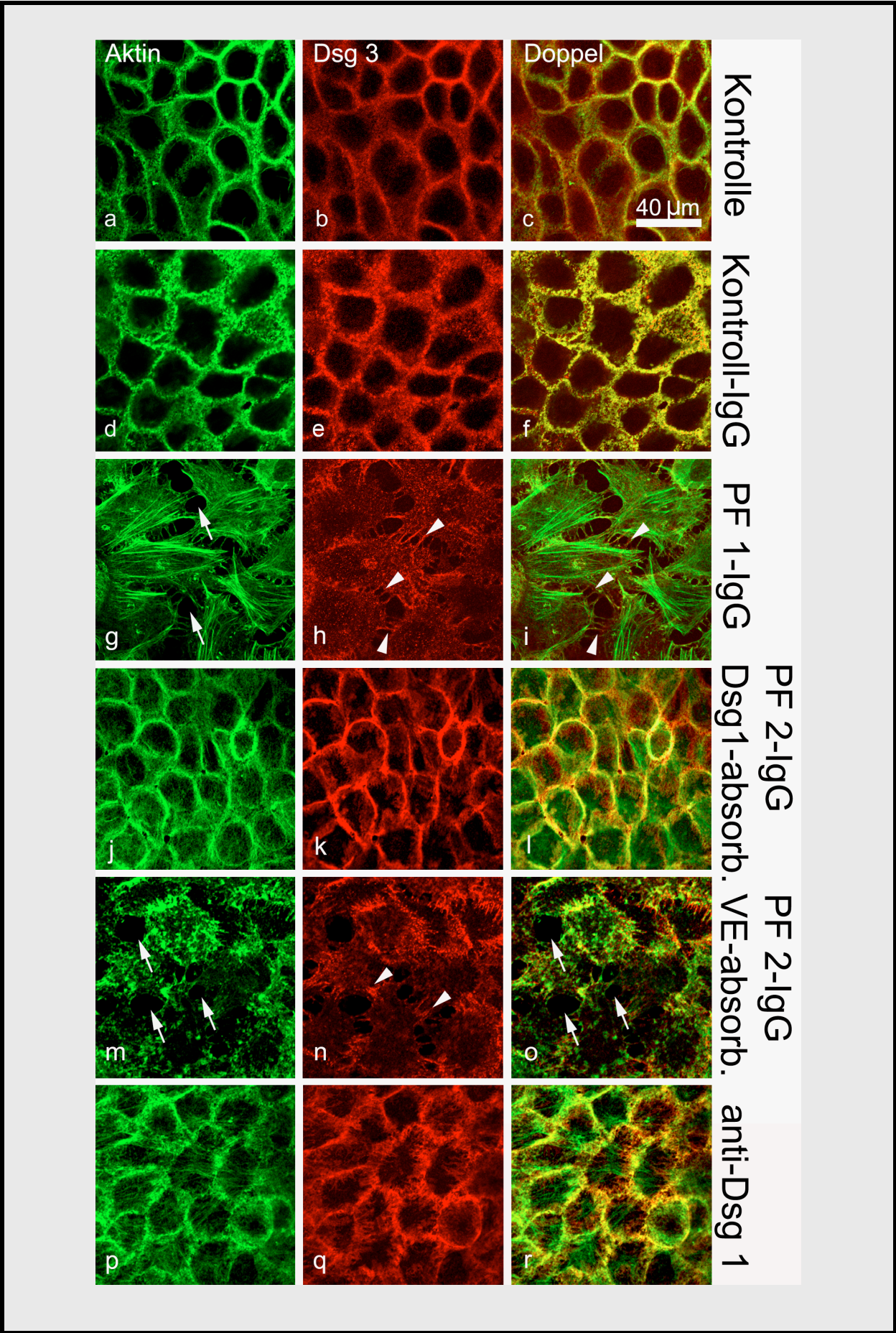


Abb. 23: Einfluss von IgG-Fraktionen und a-Dsg 1 auf die Verteilung von Dsg 3 und F-Actin

HaCaT-Zellen wurden mit a-Dsg 3 (1:100) und mit ALEXA-Phalloidin (1:60) zum Nachweis von F-Actin inkubiert. In den Kontrollen waren Dsg 3 und F-Actin entlang der Zellgrenzen angereichert (a-c) und die Verteilung änderte sich nach Kontroll-IgG-Inkubation nicht (d-f). Unter Einfluss von PF1-IgG (24 h) entstanden große Lücken und vermehrt Stressfasern (m+o, Pfeile). Dsg 3 verschwand an den Zellgrenzen, blieb jedoch im Gegensatz zu Dsg 1 in Bereichen, in denen die Zellen noch miteinander in Kontakt standen, erhalten (n, Pfeilspitzen). Immunabsorption von PF-IgG mit Dsg 1 verhinderte die in g-i gezeigten Effekte durch PF-IgG (j-l). Kontrollabsorption von PF-IgG mit VE-Cadherin dagegen führte zu Lückenbildung, Dsg 3-Umverteilung und Zytoskelettveränderungen (m-o, Pfeile). Ein monoklonaler Antikörper gegen Dsg 1 löste ebenfalls keine zellulären Effekte aus (p-r).

Da in der Literatur beschrieben ist, dass das desmosomale Protein Plakoglobin bezüglich der Pathogenese des Pemphigus notwendig ist (Caldelari et al. 2001), wurde der Effekt von PF-IgG auf die Lokalisation von Plakoglobin untersucht. Wie oben gezeigt wurde, verschwand Dsg 1 nach PF-IgG-Inkubation, Dsg 3 dagegen blieb in zytoplasmatischen Ausläufern, mit denen die Zellen Kontakt zueinander hatten erhalten. Das PF-IgG löste auch hier Lückenbildung aus (Abb.24, g-i Pfeile). In der Kontrolle und nach Inkubation mit Kontroll-IgG (35 µg/ml) für 24 h verhielt sich Plakoglobin wie Dsg 1 und Dsg 3 und war zusammen mit F-Actin im Bereich der Zellgrenzen angereichert (Abb.24, d-f). Unter Einfluss von PF-IgG (35 µg/ml) verhielt sich Plakoglobin ähnlich wie Dsg 3. Plakoglobin verschwand an den Zellgrenzen und fand sich nur noch in den erhaltenen Zell-Zell-Kontakten (Abb.24, h Pfeilspitzen).

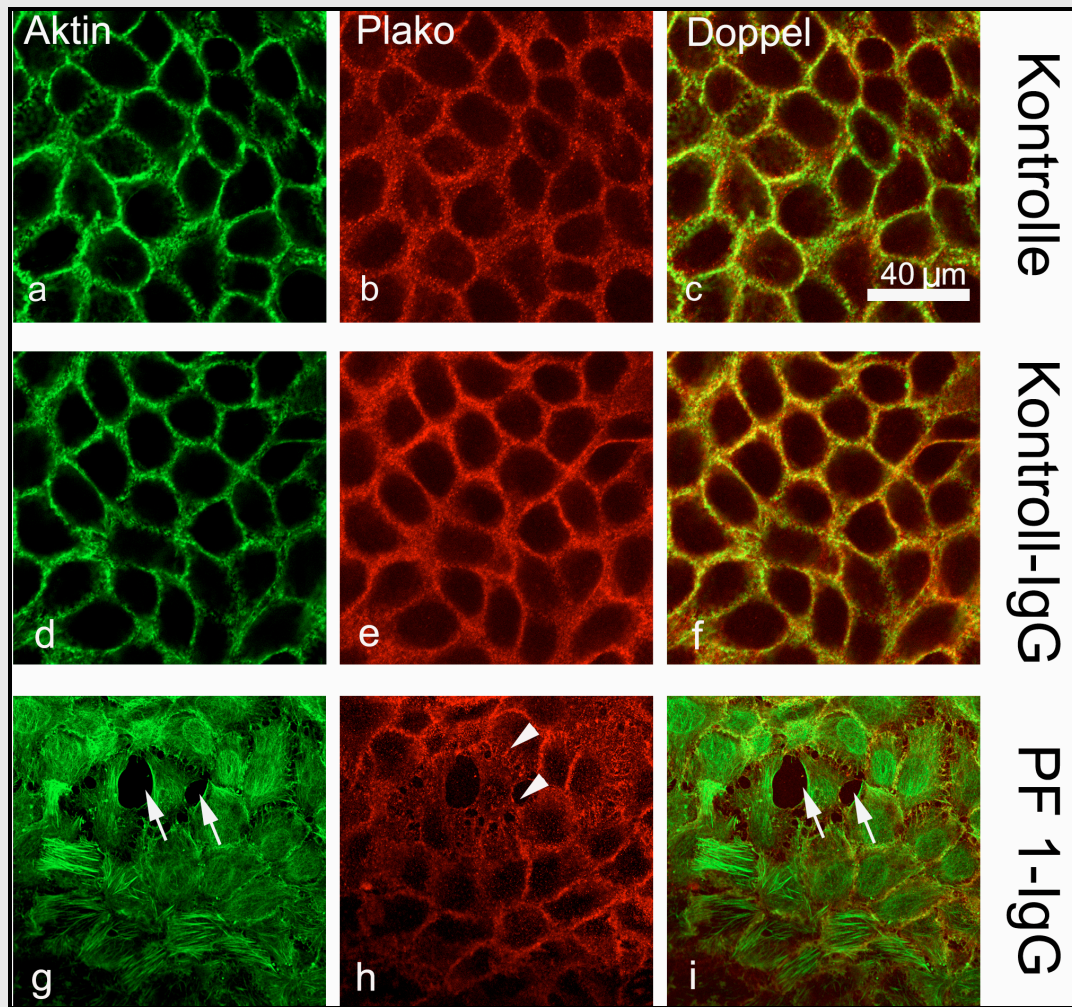


Abb. 24: Verteilung von Plakoglobin und F-Actin

HaCaT-Zellen wurden mit α -Plakoglobin (1:100) und mit ALEXA-Phalloidin (1:60) zum Nachweis von F-Actin inkubiert. In den Kontrollen waren Plakoglobin und F-Actin entlang der Zellgrenzen angesiedelt (a-c), wie auch nach Inkubation für 24 h mit Kontroll-IgG (d-e). PF-IgG-Inkubation für 24 h löste Lückenbildung aus (g+i, Pfeile). Plakoglobin verschwand entlang der Zellgrenzen und blieb nur im Bereich der zytoplasmatischen Ausläufer erhalten, mit denen die Zellen in Kontakt standen (h, Pfeilspitzen).

5.3.3. Effekt von PF-IgG auf die Adhäsion Dsg 1-beschichteter Mikroperlen

Rekombinantes Dsg 1 auf den Mikroperlen wurde sowohl von einem monoklonalen AK gegen Dsg 1 als auch von den PF-IgG-Fraktionen erkannt (Abb.15.a+21.). Für die Untersuchungen mit der Laserpinzette wurden die beschichteten Mikroperlen 30 min auf humanen Keratinozyten in Kulturmedium belassen, um die Ausbildung von Bindungen zu ermöglichen. Nach Ablauf der 30 min wurde die Bindungsfestigkeit der Mikroperlen überprüft. Ließen sich die Perlen durch den auf sie gerichteten Laserstrahl nicht verschieben, galten sie als fest gebunden. Anschließend wurden die Wirkungen von EGTA, α -Dsg 1, Kontroll-IgG, PF-IgG und immunabsorbiertes PF-IgG auf die Dsg 1-Bindung zwischen Mikroperlen und Zellen untersucht. Der zu untersuchende Wirkstoff wurde 30 min dem Kulturmedium zugefügt, in dem die Mikroperlen auf den HaCaT-Zellen inkubierten. In Präinkubationsstudien wurden entweder die Mikroperlen oder die HaCaT-Zellen mit α -Dsg 1 bzw PF-IgG 30 min vorinkubiert, dann erst wurden die Mikroperlen 30 min auf den Zellen belassen und anschließend die Bindungsfestigkeit überprüft.

Unter Kontrollbedingungen hafteten durchschnittlich 80 ± 6 % der Perlen (Abb.25. Balken 1, dunkelgrau). Dieser Wert wurde als maximale Bindung unter Kontrollbedingungen mit 100 % gleichgesetzt. Durch die Zugabe von 5 mM EGTA zu dem Kulturmedium, nachdem die Mikroperlen 30 min auf den Zellen belassen wurden, fiel die Anzahl der haftenden Mikroperlen nach 30 min auf 27 ± 1 % der Kontrollwerte (Abb.25. Balken 2, dunkelgrau). Dies zeigte die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Dsg 1-Adhäsion (n=6). Der gegen Dsg 1-gerichtete monoklonale Antikörper (α -Dsg 1) wurde in einer Konzentration (1:50) eingesetzt, in der rekombinantes Dsg 1 in etwa der gleichen Intensität erkannt wurde wie mit PF-IgG (Abb.21). Wurden die Mikroperlen 30 min auf den HaCaT-Zellen inkubiert und anschließend α -Dsg 1 (1:50) zugesetzt, reduzierte sich die Zahl der fest gebundenen Mikroperlen nach 30 min auf 27 ± 7 % der Kontrollwerte und somit auf das gleiche Maß wie bei EGTA-Zugabe, wodurch bewiesen wurde, dass EGTA die Perlen-Haftung durch Wirkung auf Dsg 1 reduzierte (Abb.25, Balken 3, dunkelgrau).

Während Kontroll-IgG (35 $\mu\text{g/ml}$, 30 min) die Dsg 1-Bindung nicht beeinflusste (n=6) (Abb.25, Balken 4, hellgrau), senkte die Zugabe von PF1-IgG und PF2-IgG (je

35 µg/ml, 30 min) die Zahl der gebundenen Perlen auf $51 \pm 2 \%$ und $28 \pm 4 \%$ der Kontrollwerte ($n=6$) (Abb.25, Balken 5+6, hellgrau).

Durch Immunabsorption von PF2-IgG mit Dsg 1- bzw. mit VE-Cadherin-beschichteten Mikroperlen konnte bewiesen werden, dass die Perlen-Haftung durch Dsg 1-spezifische Antikörper der PF-IgG-Fractionen reduziert wurde. Mit Dsg 1 immunabsorbiertes PF2-IgG hatte nach 30 min Inkubation keinen Einfluss auf die Perlen-Haftung ($96 \pm 2 \%$ der Perlen hafteten ($n=5$) (Abb.25, Balken 7, hellgrau). Im Unterschied dazu reduzierte das zuvor mit VE-Cadherin immunabsorbierte PF2-IgG die Perlen-Haftung nach 30 min auf $42 \pm 4 \%$ und hatte somit eine vergleichbare Wirkung zu nicht immunabsorbierten PF2-IgG ($n=5$) (Abb.25, Balken 8, hellgrau).

Die Untersuchungen beweisen, dass Dsg 1-Immunabsorption die inhibitorische Wirkung von PF-IgG auf die Dsg 1-Haftung aufhob und somit spezifische Dsg 1-Antikörper für die Reduktion der Perlen-Haftung verantwortlich waren.

Präinkubationsstudien, in denen entweder die Zellen oder die Mikroperlen mit PF-IgG 30 min vorinkubiert wurden, und erst anschließend die Mikroperlen 30 min zu den HaCaT-Zellen gegeben wurden (mittelgraue Balken) dienten dazu herauszufinden, ob der Effekt von PF-IgG auf die Dsg 1-Haftung auf einer direkten Hemmung der desmosomalen Haftung beruht oder andere durch die Bindung der Antikörper ausgelösten zellulären Mechanismen beinhaltet, die inhibierend auf die Zelladhäsion wirken. Wurden HaCaT-Zellen mit PF1-IgG in Medium (35 µg/ml, 30 min) inkubiert, das Medium abgezogen und anschließend die Mikroperlen in Kulturmedium ohne PF-IgG zugegeben, reduzierte sich die Zahl der gebundenen Perlen auf $33 \pm 8 \%$ verglichen mit den Kontrollwerten. Dies entsprach in etwa der Reduktion durch PF1-IgG, die durch Zugabe des PF-IgG zu den Kulturen mit gebundenen Perlen (Abb.25, Balken 5 + 6, hellgrau) ermittelt wurde ($n=5$) (Abb.25, Balken 9, mittelgrau). Wurden jedoch die Dsg 1-beschichteten Mikroperlen vor der Aussaat auf die HaCaT-Zellen mit PF1-IgG vorinkubiert (35 µg/ml, 30 min), adhärten $93 \pm 3 \%$ der Perlen, verglichen mit den Kontrollwerten, was bedeutet, dass PF-IgG die Dsg 1-Bindung nicht direkt inhibierte ($n=5$) (Abb.25, Balken 10, mittelgrau). Anschließende Zugabe von EGTA (5mM, 30 min) reduzierte die Perlen-Adhäsion auf $54 \pm 3 \%$ der Kontrollwerte ($n=5$) (Abb.25, Balken 11, mittelgrau), womit die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Perlen-Haftung bewiesen und somit gezeigt wurde, dass die Dsg 1-Adhäsion nicht durch eine mögliche Quervernetzung der Dsg 1-Moleküle von Zellen und Perlen durch die Antikörper, vermittelt wurde. Weitere Kontrollen waren die Präinkubationen von

Ergebnisse

HaCaT-Zellen bzw. Mikroperlen mit dem inhibitorischen monoklonalen Dsg 1-Antikörper (a-Dsg 1). Präinkubation der HaCaT-Zellen reduzierte die Perlen-Haftung auf $29 \pm 2 \%$ (Abb.25, Balken 12, mittelgrau). Im Gegensatz zu den mit PF-IgG präinkubierten Mikroperlen war die Haftung der Perlen, die mit dem monoklonalen Antikörper vorinkubiert wurden, deutlich reduziert ($26 \pm 1 \%$) (Abb.25, Balken 13, mittelgrau).

Diese Experimente weisen darauf hin, dass PF-IgG nicht die Dsg 1-vermittelte Zellhaftung verhindern, sondern Zellreaktionen auslösen, die sekundär zur Lösung der Perlen und Dissoziation der Zellkontakte führen.

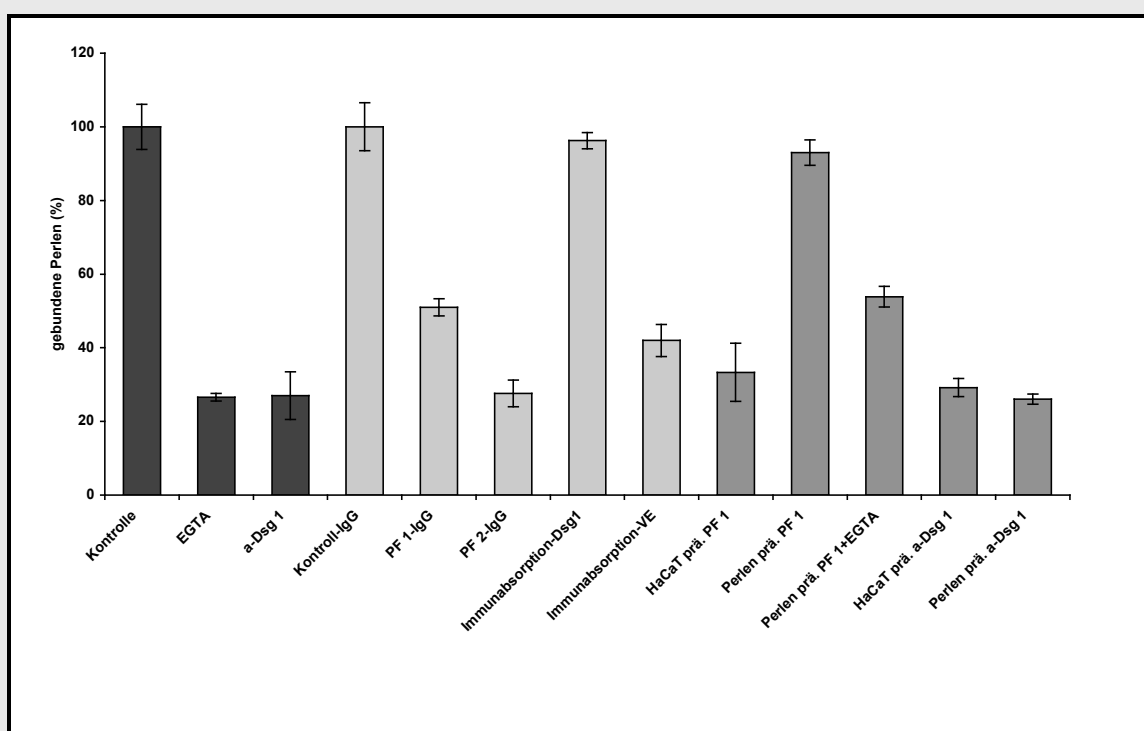


Abb. 25: Einfluss von PF-IgG und a-Dsg 1 auf die Dsg 1-Adhäsion gemessen mit der mit Laserpinzette (n=6)

Kontrolle: Inkubation von HaCaT-Zellen mit Dsg 1-beschichteten Mikroperlen (30 min)

EGTA: Perlen-Haftung reduziert auf 27 ± 1 (Ca^{2+} -Abhängigkeit)

a-Dsg 1: Perlen-Haftung reduziert auf 27 ± 7 %

Kontroll-IgG: Kein Einfluss auf die Dsg 1-Adhäsion

PF1-IgG: Perlen-Haftung reduziert auf 51 ± 2 %

PF2-IgG: Perlen-Haftung reduziert auf 28 ± 4 %

PF2-IgG-Immunabsorption mit Dsg 1: Keine Reduktion der Perlen-Haftung (96 ± 2)

PF2IgG-Immunabsorption mit VE-Cadherin: Perlen-Haftung reduziert auf 42 ± 4 %

Präinkubation der HaCaT mit PF1-IgG: Perlen-Haftung reduziert auf 33 ± 8 %

Präinkubation der Perlen mit PF1-IgG: Keine Reduktion der Perlen-Haftung (93 ± 3 %)

Präink. der Perlen mit PF1-IgG+EGTA: Perlen-Haftung reduziert auf 54 ± 3 %

Präinkubation der HaCaT mit a-Dsg 1: Perlen-Haftung reduziert auf 29 ± 2 %

Präinkubation der Perlen mit a-Dsg 1: Perlen-Haftung reduziert auf 26 ± 1 %

5.3.4. Effekt von PF-IgG auf die Dsg 1-Transinteraktion, gemessen mit AFM

Um die Effekte von PF-IgG auf die Dsg 1-Transinteraktion in einem zellfreien System, dass heißt ohne zelluläre Signalkaskaden, zu untersuchen, wurden Einzelmolekül-Experimente mit dem AFM durchgeführt (Abb.26). Kraft-Abstands-Zyklen dienten zur Quantifizierung der Bindungsaktivität zwischen Dsg 1-Fc-Molekülen, die an Nadel und Platte des AFM-Aufbaus befestigt wurden, wie unter 3.4.4. beschrieben. Die Kraft-Abstandszyklen wurden in HBSS bei 800 nm/s und 0,1 s Kontaktzeit mit und ohne AK-Inkubationen vorgenommen.

Die ermittelte Bindungsaktivität aus Kraft-Abstandszyklen gemessen in HBSS wurde als maximale Bindungsaktivität unter Kontrollbedingungen mit 100 % gleichgesetzt (Abb.26, Balken 1). Ca^{2+} -Entzug durch Zugabe von EGTA (5 mM, 30 min) reduzierte die Bindungsaktivität auf 43 ± 8 % des Kontrollwertes (Abb.26, Balken 2).

Zugabe von PF-IgG 1 und 2 (je 35 µg/ml, 30 min) verminderten die Bindungsaktivität auf Einzelmolekülebene verglichen mit dem Kontrollwert nicht signifikant. Die Bindungsaktivität lag bei 104 ± 12 % nach Inkubation mit PF1-IgG (Abb.26, Balken 3), und erstaunlicherweise deutlich höher nach Inkubation mit PF2-IgG (145 ± 4 %) (Abb.26, Balken 4). Die anschließende Inkubation mit EGTA reduzierte die Bindungsaktivität jedoch auf 91 ± 4 % des Kontrollwertes (Abb.26, Balken 5) und somit im gleichen Ausmaß (54 %) wie EGTA ohne vorherige PF2-IgG-Inkubation (57 %).

Im Gegensatz zu PF-IgG reduzierte der monoklonale Antikörper, gerichtet gegen die extrazelluläre Domäne von Dsg 1 (1:50) die Bindungsaktivität deutlich (61 ± 9 %) (Abb.26, Balken 6).

Zusammengefasst hemmte PF-IgG die Dsg 1-Transinteraktion in diesem System nicht.

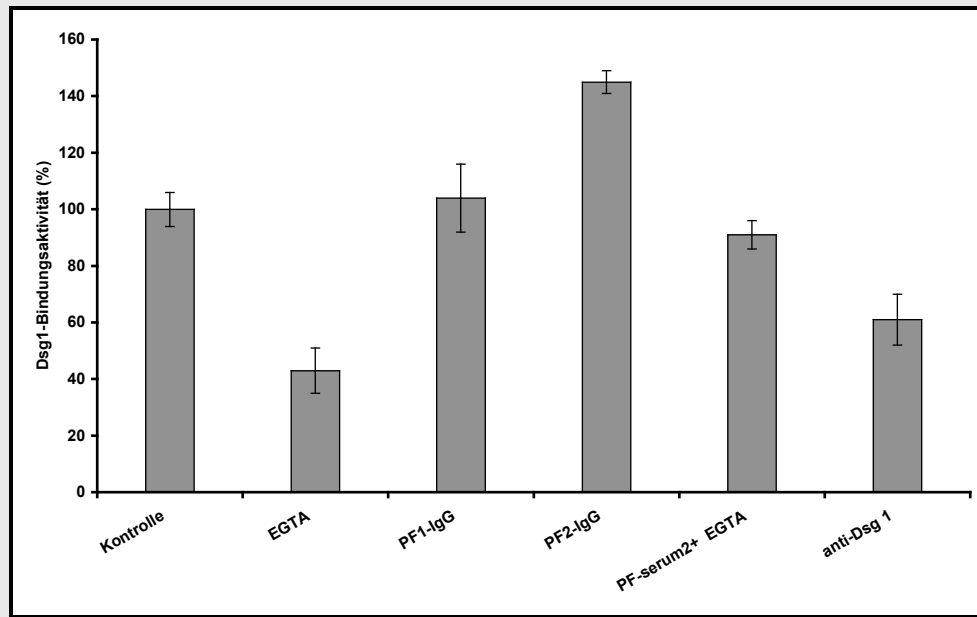


Abb. 26: Einfluss von PF-IgG auf die Dsg 1-Adhäsion, gemessen mit dem AFM (n=6)

Kontrolle:	Bindungsaktivität der Dsg 1-Transinteraktion (auf 100 % normiert)
EGTA:	EGTA (5 mM, 30 min) reduzierte die Bindungsaktivität auf 43 ± 8 %
PF1-IgG:	PF1-IgG (35 µg/ml, 30 min) reduzierte die Bindungsaktivität nicht
PF2-IgG:	PF2-IgG (35 µg/ml, 30 min) steigerte die Bindungsaktivität auf 145 ± 4 %
PF-Serum+EGTA:	EGTA-Zugabe nach Inkubation mit PF-Serum reduzierte die Bindungsaktivität im gleichen Maß, wie EGTA ohne vorherige Inkubation mit PF-Serum
anti-Dsg 1:	monoklonaler Dsg 1-Antikörper reduzierte die Bindungsaktivität auf 61 ± 9 %

6. Diskussion

Blasenbildende Hauterkrankungen der Pemphigus-Gruppe wie Pemphigus foliaceus (PF) und Pemphigus vulgaris (PV) werden durch Autoantikörper gegen die desmosomalen Cadherine Dsg 1 (PF) und Dsg 3 (PV) hervorgerufen. Die biophysikalische Charakterisierung von Dsg 1 und der Einfluss von Autoantikörpern auf die durch Dsg 1 vermittelte Zellhaftung waren Gegenstand der vorliegenden Untersuchung. Dazu wurde das Fusionsprotein Dsg 1-Fc hergestellt und überprüft, ob es von PF-Ig-Fraktionen von Patienten mit ausgeprägten Krankheitssymptomen und einem monoklonalen Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von Dsg 1 erkannt wird. Rekombinantes Dsg 1 wurde mit dem AFM in einem zellfreien System und mit der Laserpinzette an kultivierten humanen Keratinozyten untersucht.

Die Stärke (Abrisskraft) der homophilen Dsg 1-Bindung betrug abhängig von der Separationsgeschwindigkeit zwischen Federbügel und Platte 37-68 pN und Vielfache dieser Einheitsabrisskräfte. Sie entsprechen den Bindungsstärken homophiler Interaktionen anderer Cadherine. Die Kraft-Abstandsmessungen mit dem AFM deuten an, dass es sich bei den Vielfachen der Einheitsabrisskräfte um multivalente Bindungen handelt, möglicherweise im Sinne einer stärkeren Überlappung der extrazellulären Domänenabschnitte der Dsg 1-Moleküle.

Die Inkubation von humanen Keratinozyten mit gereinigten IgG von Patienten mit PF (PF-IgG) führte zur Bildung großer interzellulärer Lücken und Verlust von Dsg 1. Zusätzlich wurde die Haftung Dsg 1-beschichteter Mikroperlen auf humanen Keratinozyten durch vorherige Inkubation der Zellen mit gereinigten PF-IgG deutlich reduziert. Diese Reduktion der Haftung beruhte aber nicht auf einer direkten Inhibition der Dsg 1-Bindung (Transinteraktion). Dies zeigten Experimente mit Dsg 1-beschichteten Mikroperlen, deren Zellhaftung trotz der vorherigen Inkubation mit PF-IgG nicht gehemmt wurde und AFM-Messungen, die keinen hemmenden Einfluss von PF-IgG auf die Dsg 1-Transinteraktion ergaben. Immunabsorption der PF-IgG-Fraktionen liess den Effekt von PF-IgG auf die Haftung Dsg 1-beschichteter Mikroperlen an Keratinozyten verschwinden, womit bewiesen werden konnte, dass spezifische gegen Dsg 1 gerichtete Antikörper der PF-IgG-Fraktionen für die beobachteten Effekte verantwortlich waren. Gleiches galt für die Effekte, die an kultivierten Keratinozyten erhoben wurden.

Schlussfolgernd zeigt diese Arbeit, dass PF-IgG die Dsg 1-Bindung nicht durch direkte Inhibition der Dsg 1-Bindung hemmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung beweisen, dass die durch PF-IgG ausgelösten Effekte wahrscheinlich durch Antikörper-induzierte Signalkaskaden in den Keratinozyten ausgelöst wurden. Die PF-IgG-Fraktionen verursachten in vitro Lückenbildung zwischen Keratinozyten unter Bedingungen, unter denen sterische Hemmung nicht erkennbar war. Dies zeigt, dass eine Hemmung der Dsg 1-Bindung nicht notwendig ist, um Pemphigus foliaceus auszulösen. Jedoch mögen bei manchen Patienten zusätzliche Autoantikörper vorhanden sein, die durch eine Hemmung der Dsg 1-Bindung den klinischen Verlauf erschweren.

6.1. Nachweis von Dsg 1 ist in HaCaT-Zellen nur unter nicht-denaturierenden Bedingungen möglich

Für die Untersuchungen der Dsg 1-vermittelten Adhäsion an kultivierten humanen Keratinozyten war es von Bedeutung, diese Zelllinie bezüglich der Expression desmosomaler Proteine, vor allem von Dsg 1 zu charakterisieren (Abschnitt 5.3.). Dsg 1 war in humanen Keratinozyten in der Immunfluoreszenz nachweisbar, jedoch nicht mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Das Protein wurde jedoch mit der Dot-Blot-Analyse unter nicht denaturierenden Bedingungen erkannt. Dieses Phänomen wurde bereits von Martel und Joly (2001) beschrieben, der dies damit begründete, dass es zu einer Konformationsänderung der Epitope von Dsg 1 aufgrund der mit der Gelelektrophorese verbundenen Denaturierung des Proteins kommt. Somit erweist sich die Dot-Blot-Analyse als eine gute Möglichkeit, Dsg 1 in kultivierten Zellen nachzuweisen.

6.2. Dsg 1 geht homophile Bindungen ein

In der Literatur sind sowohl homophile als auch heterophile Bindungen zwischen desmosomalen Cadherinen beschrieben worden, jedoch war eine homophile Interaktion zwischen Dsg 1-Molekülen bislang nicht direkt bewiesen worden (Chिताев & Troyanovsky, 1997; Leckband & Sivasankar, 2000; Chappuis-Flament et al., 2001; Runswick et al., 2001; Zhu et al., 2003).

Mit AFM konnte nachgewiesen werden, dass Dsg 1 in der Lage ist, homophile Bindungen einzugehen. Für die AFM-Untersuchungen wurde Dsg 1 an Nadel und Platte des Versuchsaufbaus mit Hilfe von funktionalisierten PEG gekoppelt. Anschließend

wurde die Nadel von der Platte zyklisch entfernt und die dabei auftretenden Interaktionen gemessen (siehe Kapitel 4.4.4.). Die Bindungen zwischen rekombinanten Dsg 1-Molekülen wurden durch EGTA-Zugabe und durch Inkubation mit einem monoklonalen Antikörper gegen Dsg 1 reduziert (Abschnitt 5.3.4.). Dies zeigt, dass spezifische Dsg 1-Bindungen gemessen wurden und Dsg 1 eindeutig in der Lage ist, homophile Bindungen einzugehen. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass Dsg 1 auch heterophile Bindungen zu anderen Desmocadherinen (sowohl andere Desmoglein-Subtypen als auch Desmocolline) eingeht. Eine Studie von Syed et al. (2002) beschrieb sowohl homophile (Dsg 2) als auch heterophile Bindung (Dsg 2 und Dsc 2) und deutete an, dass die homophile Bindung wenig Ca^{2+} -abhängig sei.

6.3. Die homophile Dsg 1-Transinteraktion ist Ca^{2+} -abhängig

Desmosomen gehören zu den Adhäsionskontakten der Keratinozyten und gewährleisten den strukturellen Zusammenhalt der Epidermis. Die Zelladhäsionsmoleküle der Desmosomen (Desmogleine und Desmocolline) sind an Zytokeratinfilamente in den Keratinozyten verankert. Desmosomen können v.a. durch Endozytose eliminiert werden und ermöglichen dann die Motilität der Zellen innerhalb der Epidermis im Rahmen der epidermalen Differenzierung oder bei entzündlichen Prozessen. Ist der durch Desmosomen vermittelte Zellzusammenhalt beeinträchtigt, können Blasen bildende Erkrankungen entstehen (Kitajima, 2002). Ca^{2+} spielt für die Funktion der Desmosomen eine wichtige Rolle. Denning et al. (1998) wiesen in verschiedenen kultivierten Zelllinien die deutliche Expression der Desmogleine 1, 2 und 3 nach. Wurde die Ca^{2+} -Konzentrationen des Nährmediums auf $< 1\text{mM}$ Ca^{2+} reduziert, konnten keine Desmogleine in den Zellen mehr nachgewiesen werden. Auch in anderen Experimenten wurde gezeigt, dass Keratinozyten in Medium mit Ca^{2+} -Konzentrationen $< 0,1\text{ mM}$ keine Desmosomen ausbilden. Bei höheren Ca^{2+} -Konzentrationen ($> 0,1\text{ mM}$) entstehen zunächst Adhärenskontakte, bevor sich Desmosomen ausbilden (Hennings und Holbrook, 1983; Kitajima et al., 1999). Ca^{2+} spielt also eine wichtige Rolle bei der Organisation von Desmosomen, indem, abhängig von dem extrazellulären Ca^{2+} -Spiegel, Signalwege in den Zellen ausgelöst werden, die den Aufbau eines Desmosoms beeinflussen (Kitajima 2002). Weiterhin scheint Ca^{2+} auch für die Pathogenese verschiedener blasenbildender Hauterkrankungen von Bedeutung zu sein. Hanakawa et al. (2003) zeigten, dass die Spaltung von Dsg 1 durch Exfoliatives Toxin, das bei verschiedenen, infektiösen blasenbildenden

Hauterkrankungen von Staphylokokkus aureus produziert wird, von der Anwesenheit von Ca^{2+} -abhängig ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Autoantikörper die Blasenbildung bei Pemphiguserkrankungen hervorrufen zu einem intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg führen, der als Auslöser von zellulären Signalmechanismen angesehen wird (Memar et al., 1996). Ca^{2+} scheint demnach eine wichtige Rolle zu spielen, sowohl für die Expression der Desmogleine und dem Aufbau von Desmosomen, als auch bei der Patho-genese blasenbildender Hauterkrankungen. Die Ca^{2+} -Abhängigkeit der homophilen Bindung von Desmocadherinen war jedoch bislang nicht direkt bewiesen worden.

Die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Dsg 1-Bindung wurde mit dem AFM und der Laserpinzette untersucht. Mit dem AFM konnte die Bindungsaktivität einzelner Moleküle in einem zellfreien System gemessen werden. Mit der Laserpinzette wurde die Transinteraktion zwischen rekombinanten Dsg 1 und endogenem Dsg 1, das an der Oberfläche von kultivierten Keratinozyten exprimiert wurde, untersucht.

Die AFM-Messungen bei verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen ergaben eine K_D von 0,79 mM Ca^{2+} und eine hohe Kooperativität (Hill-Koeffizient $> 4,0$) (Abschnitt 5.2.2.). Die K_D der Dsg 1-Bindung ist mit der von N-Cadherin, ($K_D = 0,72$ mM Ca^{2+}) vergleichbar, jedoch war für N-Cadherin die Kooperativität (Hill-Koeffizienten = 1,9) deutlich geringer bestimmt worden als für Dsg 1 (Baumgartner et al., 2003).

Für VE-Cadherin und E-Cadherin zeigte sich dagegen, dass für eine maximale Bindung beinahe physiologische Ca^{2+} -Werte notwendig sind. Die von Baumgartner et al. (2000) ermittelte Ca^{2+} -Abhängigkeit der VE-Cadherin-Transinteraktion lag mit einer K_D von 1,15 mM Ca^{2+} deutlich höher als die K_D , die in dieser Arbeit für Dsg 1 ermittelt wurde. Die Kooperativität der Transinteraktion von VE-Cadherin (Hill-Koeffizient = 5) und Dsg 1 (Hill-Koeffizient >4) war jedoch vergleichbar.

Die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Bindung zwischen rekombinantem Dsg 1 und endogenen Dsg 1 in der Zellmembran von kultivierten Keratinozyten wurde mit der Laserpinzette ermittelt. Im Vergleich zu den AFM-Ergebnissen ergab sich eine deutlich höhere K_D von 1,6 mM Ca^{2+} mit einer vergleichbaren Kooperativität (Hill-Koeffizient = 4,0) (Abschnitt 5.2.3.). Die K_D für die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Dsg 1-Bindung liegt somit über dem für Serum bekannten physiologischen Wert von etwa 1,2 mM Ca^{2+} . Das hieße, dass eine maximale Bindung unter physiologischen Bedingungen nicht erreicht werden könnte. Die physiologischen Ca^{2+} -Werte im interzellularen Spalt der Haut sind

nicht bekannt und es ist daher nicht klar, in wieweit der physiologische Ca^{2+} -Wert des Serums auf dieses Milieu übertragbar ist.

Der Unterschied zwischen den Untersuchungsmethoden AFM und Laserpinzette ist, dass bei den AFM-Untersuchungen die homophile Dsg 1-Transinteraktion einzelner Moleküle untersucht wurde, während mit der Laserpinzette die Bindung zwischen Dsg 1-beschichteten Mikroperlen auf humanen Keratinozyten untersucht wurde. Die Diskrepanz bezüglich der Ca^{2+} -Abhängigkeit, die sich aus den Messungen mit AFM und Laserpinzette ergibt, könnte möglicherweise auf heterophilen Dsg 1 Bindungen mit anderen desmosomalen Cadherinen der kultivierten Zellen beruhen. Die Ca^{2+} -Abhängigkeit der heterophilen Dsg 1-Interaktion wäre demnach mit einer K_D von 1,6 mM Ca^{2+} deutlich höher als die Ca^{2+} -Abhängigkeit der homophilen Dsg 1-Bindung.

6.4. Bindungsstärke der homophilen Dsg 1-Interaktion

Die Bindungsstärke der homophilen Dsg 1-Transinteraktion wurde mit dem AFM untersucht. Es wurden Kraft-Abstandsmessungen mit an Nadel und Platte des AFM gebundenen rekombinanten Dsg 1-Molekülen durchgeführt. Die Messungen wurden bei ansteigenden Zuggeschwindigkeiten und konstanter Interaktionszeit durchgeführt. Die Bindungsstärke der homophilen Dsg 1-Bindung betrug, abhängig von der Zuggeschwindigkeit (300-6000nm/s), 37-68 pN. Die ermittelte Bindungsstärke liegt damit in einem Bereich, der auch für andere Cadherine ermittelt wurde. Die Bindungsstärke von VE-Cadherin beträgt 35-55 pN, für N-Cadherin wurde eine Bindungsstärke von 40 pN ermittelt (Baumgartner et al., 2000, 2003). Verglichen mit anderen AFM-Daten zur Bindungsstärke, beispielsweise von Antikörpern an Albumin (245 pN) oder P-Selectin an dessen Liganden (159 pN) (Hinterdorfer et al., 1996; Fritz et al., 1998), erwies sich die Bindung der Cadherine als relativ schwach.

Es zeigte sich, dass die Abrisskraft der homophilen Dsg 1-Bindung von der Zuggeschwindigkeit abhängig war. Bei Zuggeschwindigkeiten von 300-6000 nm/s waren die auftretenden Kräfte in etwa ganzzahlige Vielfache der kleinsten Krafteinheit von durchschnittlich 37 pN. Der Anteil der kleinsten Krafteinheit betrug bei 300 nm/s 65 % aller auftretenden Kräfte. Bei höheren Zuggeschwindigkeiten jedoch stieg die Bindungskraft der kleinsten Kraftpopulation auf ~ 68 pN an, wobei diese nur noch etwa 30 % der Abrisskräfte ausmachte. Dabei waren die kleinsten Abrisskräfte exponentiell von der Zuggeschwindigkeit abhängig. Dieses Verhalten deutet darauf hin, dass es sich um multiple, unabhängige Bindungsereignisse handelt. Die Verteilung der

Kraftpopulation war ebenfalls strikt von der Zuggeschwindigkeit abhängig. Die Dsg 1-Bindungen lösten sich bei niedrigen Zuggeschwindigkeiten sequenziell, bei hohen synchron. Aufgrund von AFM-Messungen, bei denen nur ein Dsg 1-Molekül an der Nadel mit den Dsg 1-Molekülen der Platte interagierte (Abschnitt 5.2.1) ist auszuschließen, dass die größeren Abrisskräfte darauf beruhen, dass die Bindungen mehrerer miteinander interagierender Dsg 1-Moleküle gleichzeitig reißen.

6.5. PF-IgG hemmt die Dsg 1-Transinteraktion nicht direkt

Es gilt als erwiesen, dass Autoantikörper gegen Desmogleine für die Pathogenese der blasenbildenden Hauterkrankungen Pemphigus foliaceus (PF) und Pemphigus vulgaris (PV) verantwortlich sind (Stanley et al., 1982; Amagai et al., 1991, 1992, 1994, 1995; Zillikens 2000). Man geht davon aus, dass das klinische Bild der Pemphiguserkrankungen durch das Expressionsmuster von Dsg 1 und Dsg 3 in den Epidermisschichten und dem Spektrum der gebildeten Autoantikörper abhängig ist. Da Dsg 1 vor allem in den oberen Epidermisschichten vorkommt, in denen Dsg 3 nur wenig exprimiert wird, nimmt man an, dass Dsg 3 eine Beeinträchtigung der Funktion von Dsg 1 durch gegen Dsg 1 gerichtete Autoantikörper nicht kompensieren kann (Desmoglein-Kompensations-Theorie) (Amagai et al., 1996). In der Mundschleimhaut dagegen ist Dsg 1 in allen Schichten nur sehr schwach exprimiert, im Gegensatz zu Dsg 3, das dort hauptsächlich für die Zell-Zell-Adhäsion verantwortlich ist (Shirakata et al., 1998). Basierend auf dieser Theorie wird das Vorkommen von oberflächlichen Blasen bei PF (Spaltbildung im Bereich Stratum granulosum/spinosum) erklärt, die durch Dsg 1-Antikörper ausgelöst werden. Bei PV-Patienten, die nur Dsg 3-Autoantikörper bilden, finden sich ausschließlich Läsionen in der Mundschleimhaut. Bilden sich im Krankheitsverlauf zusätzlich Dsg 1-Autoantikörper, kommt es zusätzlich zu einer epidermalen Blasenbildung, die aus unerklärten Gründen im Unterschied zum PF suprabasal auftritt (Mahoney et al., 1999). Bezüglich der molekularen Mechanismen, die der Blasenbildung durch Autoantikörper gegen Desmogleine zugrunde liegen, werden im Wesentlichen zwei Theorien diskutiert (Kitajima et al., 1999; Kitajima, 2002; Martel & Joly, 2001; Hashimoto, 2003; Whittock & Bower, 2003): Die eine postuliert eine direkte sterische Blockierung der Desmoglein-Bindung durch Autoantikörper. Koch et al. (1997) zeigten, dass Dsg 3 knock-out Mäuse Läsionen in der Mundschleimhaut entwickelten, ähnlich den Läsionen bei PV. Dabei wird vermutet, dass die Antikörper hauptsächlich an die N-

terminale extrazelluläre Domäne der Desmogleine binden (Sekiguchi et al., 2001). Neuere Studien unterscheiden zwischen pathogenen und nicht-pathogenen anti-Desmoglein Antikörpern in PV-Seren. Die pathogenen Antikörper binden an ein Epitop, dessen Konformation Ca^{2+} -abhängig ist, am N-terminalen Ende der extrazellulären Domäne im Bereich der Zell-Adhäsions-Sequenz. Nicht-pathogene Antikörper dagegen binden laut Tsunoda et al. (2003) an einer eher C-terminal gelegenen Stelle der EC-Domänen des Desmogleins.

Die zweite Theorie geht davon aus, dass Autoantikörper, die an Desmogleine binden, intrazelluläre Signalkaskaden auslösen, die sekundär zu einer Schwächung der Desmoglein-Bindung führen. Für die Pathogenese des PV wurden mehrere Signalwege vorgeschlagen, die zu einem Fehlen von Dsg 3 in Desmosomen führen könnten. Zum einen soll die Bindung von PV-IgG an Dsg 3 eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) bewirken. Dies soll zu einem gesteigerten Desmosomenumsatz führen. PKC fördert zusätzlich die Sekretion des Plasminogen-Aktivators vom Urokinase-Typ und die Expression des zugehörigen Rezeptors, wodurch extrazelluläre Desmosomenabschnitte verdaut werden könnten (Garrod et al., 2002). In einem zweiten diskutierten Signalweg führt eine Serinkinase zur Dsg 3-Phosphorylierung und dadurch zur Dissoziation von Plakoglobin, gefolgt von einem Abbau von Dsg 3. Dadurch entsteht ein von Dsg 3 depletiertes Desmosom. (Aoyama & Kitajima, 1999; Kitajima et al., 1999; Caldelari et al., 2001). Neuere in vivo-Studien von Shimizu et al. (2004) berichten, dass Dsg 3 erst nach eingetretener Akantholyse aus den Desmosomen verschwindet und somit nicht der Verlust von Dsg 3 Ursache für die Blasenbildung sei. Studien von Lo Muzio et al. (2001), in denen eine veränderte Expression und Lokalisation von Catenin bei PV gezeigt wurde, weisen ebenfalls darauf hin, dass intrazelluläre Prozesse bei der Pemphigus-Pathogenese von Bedeutung sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Theorie, dass PF-IgG die Dsg 1-Bindung nicht direkt hemmt. AFM-Messungen mit rekombinanten Dsg 1-Fc zeigten, dass PF-IgG die Dsg 1-Transinteraktion nicht hemmt. Ein monoklonaler Antikörper dagegen, der gegen die extrazelluläre Domäne von Dsg 1 gerichtet ist, inhibierte die Dsg 1-Bindung deutlich (Abschnitt 5.3.4.).

In den Untersuchungen mit der Laserpinzette führten sowohl die PF-IgG-Fraktionen, als auch der monoklonale Antikörper gegen Dsg 1 zu einer deutlichen Reduktion der Dsg 1-Bindung. Zusätzlich stützen weitere Untersuchungen mit der Laserpinzette die Theorie, dass PF-IgG die Dsg 1-Bindung nicht über sterische Blockierung hemmt.

Wurden die HaCaT-Kulturen mit PF-IgG vorinkubiert und anschliessend die Mikroperlen 30 min auf den Zellen belassen, wurde die Perlen-Haftung deutlich reduziert. Im Gegensatz dazu wurde die Perlen-Haftung jedoch nicht gehemmt, wenn Dsg 1-beschichtete Mikroperlen mit PF-IgG vorinkubiert wurden (Präinkubation der Mikroperlen) (Abschnitt 5.3.3.). Demzufolge waren also zelluläre Prozesse notwendig, um die Haftung zu reduzieren. Bei Experimenten mit dem monoklonalen Dsg 1-Antikörper führte sowohl die Vorinkubation der Perlen als auch die der Zellen zu einer reduzierten Perlen-Haftung (s.u.).

Zusammengefasst lassen die Ergebnisse dieser Arbeit die Schlussfolgerung zu, dass der monoklonale Dsg 1-Antikörper die Dsg 1-Bindung direkt inhibiert. PF-IgG dagegen scheint die Dsg 1-Bindung nur durch Autoantikörper-induzierte Signalkaskaden in den Zellen zu hemmen. Diese Ergebnisse zeigen weiterhin, dass sterische Blockierung für die Bildung von Hautblasen bei Pemphigus foliaceus-Patienten und der interzellulären Lückenbildung in Keratinozytenkulturen in vitro nicht von Bedeutung ist.

Nach den Ergebnissen von Tsunoda et al. (2003) dürfte der monoklonale Antikörper aufgrund der Bindung an die extrazelluläre 2-4 nicht pathogen sein, da nur Antikörper, die an die N-terminale Domäne des Desmogleins binden, eine Pathogenität aufweisen. Unser Befund, dass der monoklonale Dsg 1-Antikörper keine Dissoziation der Keratinozyten bewirkt (s.u.), unterstützt diese Theorie. Dies stellt wiederum die Hypothese der Blockierung der Desmoglein-Transinteraktion durch Autoantikörper (sterische Blockierung) für die Pathogenese des Pemphigus weiter in Frage. Diese Arbeit bestätigt, dass Dsg 1-Autoantikörper von Pemphigus foliaceus-Patienten die Dsg 1-Bindung nicht direkt hemmen und unterstützt Studien, die zeigten, dass die Bildung von Hautblasen durch Immunadsorption von PF-Serum mit der extrazellulären Domäne von Dsg 1 verhindert wird (Amagai, 2003).

Es ist jedoch nicht völlig auszuschließen, dass andere PF- oder PV-Patienten zusätzlich Antikörper besitzen, die über sterische Blockierung die Desmoglein Transinteraktion hemmen. Jedoch ist zu bezweifeln, dass sterische Blockierung der eigentliche Mechanismus der Entstehung von Hautblasen ist.

6.6. PF-Serum verursacht Lückenbildung und den Verlust von Dsg 1 in HaCaT-Zellkulturen

Inkubationen der humanen Keratinozyten für 24 h mit PF-IgG-Fraktionen verursachten die Bildung großer interzellulärer Lücken in HaCaT-Kulturen. Die in den Kontrollen gleichmäßig an den Zellgrenzen lokalisierte Dsg 1-Immunfärbung war nach der Inkubation mit PF-IgG in den betroffenen Arealen deutlich reduziert (Abschnitt 5.3.2.). Dsg 3 und Plakoglobin waren nach PF-IgG-Inkubation nur noch in fingerförmigen Fortsätzen, die Lücken überspannten, vorhanden. Veröffentlichungen berichten über die Entstehung Dsg 3-depletierter Desmosomen, ähnlich den Ergebnissen dieser Arbeit bezüglich Dsg 1. In diesen Studien führten PV-Autoantikörper zur Phosphorylierung von Dsg 3, mit der Folge, dass Plakoglobin sich aus dem desmosomalen Verband löste und Dsg 3 abgebaut wurde (Aoyama et al., 1999; Aoyama und Kitajima, 1999). Neuere Studien berichten, dass PV-IgG zudem die Genexpression von Dsg 3 reduziert, und dass neben Dsg 3 auch andere desmosomale Plaqueproteine phosphoryliert werden. Zusätzlich führte PV-IgG zur Reduktion der Expression der Proteine des Zytoskeletts, insbesondere der Zytokeratine (Zytokeratin-1,-13,-16,-18) (Nguyen et al., 2004).

In dieser Arbeit wurde nach Inkubation mit PF-IgG eine drastische Reorganisation des Actin-Zytoskeletts in Form einer lokalisierten Bildung von Stressfasern (Abb.22,g) und einer generalisierten Reduktion der Actinfilamente (Abb.22,m; Abb.23,c) beobachtet. In diesem Zusammenhang zeigten Nguyen et al. (2004), dass unter anderem die Transkription von Rho E, eine GTPase der Rho Familie, die Bildung von Stressfasern inhibiert, ebenfalls durch PV-IgG-Inkubation reduziert war (Guasch et al., 1998; Wennerberg et al., 2004).

Auch diese Studien stützte die Theorie, dass die Effekte von PF-IgG durch sterische Blockierung alleine nicht erklärt werden können.

6.7. Spezifische Antikörper gegen Dsg 1 in den PF-IgG-Fraktionen verursachten die Hemmung der Dsg 1-vermittelten Bindung, Zelldissoziation und Zytoskelettveränderungen

In der Literatur ist beschrieben, dass Autoantikörper gegen die extrazelluläre Domäne von Dsg 1 und Dsg 3 verantwortlich sind für die Blasenbildung bei PF und PV (Beutner und Jordon, 1964; Stanley et al., 1982; Stanley et al. 1984; Koch et al., 1990; Amagai et al., 1991; Emery et al., 1995). Die Hemmung der Dsg 1-vermittelten Adhäsion, die Lückenbildung und Zytoskelettveränderungen in HaCaT-Kulturen wurden durch spezifische Dsg 1-Antikörper in den PF-IgG-Fraktionen ausgelöst. Dies konnte durch Immunabsorption der PF-IgG-Fraktionen mit Dsg 1-beschichteten Mikroperlen gezeigt werden. Nachdem die spezifischen Antikörper aus den IgG-Fraktionen entfernt wurden, konnten keine der zuvor durch PF-IgG ausgelösten Effekte an den HaCaT-Zellen festgestellt werden. Zur Kontrolle wurde eine Absorption mit VE-Cadherin-beschichteten Mikroperlen durchgeführt. Die Absorption reduzierte die Effekte von PF-IgG auf die kultivierten Keratinozyten erwartungsgemäß nicht (Abschnitt 5.3.2 + 5.3.3).

6.8. PF2-IgG hemmt die Dsg 1-Bindung stärker als PF1-IgG

Die Experimente mit der Laserpinzette ergaben, dass PF-IgG die Bindung von Dsg 1-beschichteten Mikroperlen an humane Keratinozyten hemmt. Dabei zeigte sich dass PF2-IgG die Bindung stärker hemmte als PF1-IgG (Abschnitt 5.3.3.). Laut Angaben der Klinik, von der die verwendeten Seren zur Verfügung gestellt wurden, hatte der Patient, von dem das PF2-Serum stammte, einen dreifach höheren Titer als das Serum des Patienten des PF1-Serums. Die IgG-Fraktionen der Seren wurden mit der Protein A-Affinitätschromatographie aufgereinigt und anschließend die Konzentrationen mit der Bradford-Methode angeglichen. Zusätzlich wurde dies durch Dot-Blot-Analyse bestätigt, in dem die PF-IgG Fraktionen ähnlich starke Signale zeigten (Abschnitt 5.3.1.). Wäre die Adaption der Konzentrationen der PF-IgG-Fraktionen mit der Dot-Blot-Analyse nicht sensitiv genug, könnte die unterschiedliche starke Hemmung der PF-IgG-Fraktionen durch unterschiedliche Dsg 1-Antikörper-Titer begründet sein. Weiterhin wäre es möglich, dass nicht alle Dsg 1-Autoantikörper der PF-IgG-Fraktionen in der Lage sind über die entscheidenden Signalwege biologische Effekte auszulösen.

6.9. Die direkte Hemmung der Dsg 1-Bindung löst keine Lückenbildung, kein Verlust von Dsg 1 und keine Zytoskelettveränderungen aus

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass keine sterische Blockierung der Dsg 1-Adhäsion durch Autoantikörper erfolgt. Die Lückenbildung zwischen kultivierten Keratinozyten scheint daher durch zelluläre Signalmechanismen, die durch die Antikörper-Bindung ausgelöst wurden, hervorgerufen worden zu sein.

α -Dsg 1 hemmte die homophile Dsg 1-Transinteraktion im AFM, und reduzierte auch die Perlen-Haftung Dsg 1-beschichteter Mikroperlen auf HaCaT-Kulturen. In Präinkubationsstudien wurden Mikroperlen oder Zellen mit α -Dsg 1 vorinkubiert. Im Gegensatz zu den Experimenten, in denen Mikroperlen mit PF-IgG vorinkubiert wurden, reduzierte α -Dsg 1 sowohl nach Präinkubation der Zellen als auch der Mikroperlen die Perlen-Haftung (Abschnitt 5.3.3.). Dennoch löste α -Dsg 1, trotz der deutlichen Hemmung der Dsg 1-vermittelten Adhäsion, keine Lückenbildung in HaCaT-Kulturen aus.

Unter der Annahme, dass die Dissoziation der kultivierten Zellen auf den gleichen Mechanismen beruht wie die Spaltbildung in intakter Epidermis, ist anzunehmen, dass die direkte Hemmung der Dsg 1-Bindung durch PF-IgG nicht notwendig ist, um das Krankheitsbild des Pemphigus foliaceus hervorzurufen.

6.10. Ausblick

Dsg 1 geht Ca^{2+} -abhängige homophile Bindungen ein mit einer Bindungsstärke von 37-68 pN. Die Abrissmuster der Dsg 1-Bindung deuteten das Auftreten multipler, unabhängiger Bindungen an. Die Abrissmuster der Messungen mit dem AFM weist auf das Auftreten von multivalenten Bindungen hin, möglicherweise im Sinne einer stärkeren Überlappung der extrazellulären Domänenabschnitte der Dsg 1-Moleküle. Eindeutige Ergebnisse könnten mit Nadeln mit nur einem gebundenen Dsg 1-Molekül in einer definierten Ausrichtung erzielt werden, so dass die Dsg 1-Moleküle von Nadel und Platte in bekannter Anordnung miteinander interagieren könnten.

Die Dsg 1-Bindung wird durch PF-IgG-Frakturen nicht direkt gehemmt. Durch Autoantikörper gegen Dsg 1 ausgelöste zelluläre Signalkaskaden sind für die Effekte durch PF-IgG notwendig. Aufbauend auf dieser Erkenntnis müssen zukünftige Studien die beteiligten Signalwege und die Mechanismen, die zur Bildung von Hautblasen führen, aufklären. So könnten Mittel und Wege erforscht werden, die eine Hemmung der Dsg 1-Interaktion und somit die Ursache der Entstehung von Hautblasen verhindern können.

7. Literatur

- Amagai M, Klaus-Kovtun V, Stanley JR (1991)** Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell*; 67:869-877
- Amagai M, Karpati S, Prussick R, Klaus-Kovtun V, Stanley JR (1992)** Autoantibodies against the amino-terminal cadherin-like binding domain of pemphigus vulgaris antigen are pathogenic. *J Clin Invest*; 90: 919-926
- Amagai M, Hashimoto T, Shimizu N, Nishikawa T (1994)** Absorption of pathogenic autoantibodies by the extracellular domain of pemphigus vulgaris antigen (Dsg 3) produced by baculovirus. *J Clin Invest*; 94:59-67
- Amagai M, Hashimoto T, Green KJ, Shimizu N, Nishikawa T (1995)** Antigen-specific immunoabsorption of pathogenic autoantibodies in pemphigus foliaceus. *J Invest Dermatol*; 104:895-901
- Amagai M, Koch PJ, Nishikawa T (1996)** Pemphigus vulgaris antigen (Desmoglein 3) is localized in the lower epidermis, the site of blister formation in patients. *J Invest Dermatol*; 106:351-5
- Amagai M, Tsunoda K, Zillikens D, Nagai T, Nishikawa T (1999)** The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile. *J Acad Dermatol*; 40:167-170
- Amagai M, (2003)** Desmoglein as a target in autoimmunity and infection. *J Am Acad Dermatol*; 48:244-52
- Anhalt GJ, Kim S, Stanley JR (1997)** Paraneoplastic pemphigus: an autoimmune mucocutaneous disease associated with neoplasia. *N Engl J Med*; 323:1729-1735
- Aoyama Y, Owada MK, Kitajima Y (1999)** A pathogenic autoantibody, pemphigus vulgaris-IgG, induces phosphorylation of Dsg 3, and its dissociation from plakoglobin in cultured keratinocytes. *Eur J Immunol*; 29:2233-2240

- Aoyama Y, Kitajima Y (1999)** Pemphigus vulgaris-IgG causes a rapid depletion of desmoglein 3 from Triton X-100 soluble pools, leading to the formation of Dsg 3-depleted desmosomes in a human squamous carcinoma cell line, DJM-1 cells. *J Invest Dermatol*; 112:67-71
- Arnemann J, Sullivan KH, Magee AL, King IA, Buxton RS (1993)** Stratification-related expression of isoforms of the desmosomal cadherins in human epidermis. *J Cell Sci*; 104:741-750
- Baumgartner W, Hinterdorfer P, Ness W, Raab A, Vestweber D, Schindler H, Drenckhahn D (2000)** Cadherin interaction probed by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci*; 97(8):4005-10
- Baumgartner W, Golenhofen N, Grundhöfer N, Wiegand J, Drenckhahn D (2003)** Ca²⁺ dependency of N-Cadherin function probed by laser tweezer and atomic force microscopy. *J Neurosci*; 23(35):11008-14
- Beutner EH, Jordon RE (1964)** Demonstration of skin antibodies in sera of pemphigus vulgaris patients by direct immunofluorescence staining. *Proc Soc Exp Biol Med*; 117:505-510
- Binnig G, Quate CF, Gerber C (1986)** Atomic force microscope. *Physical Review Letters*; 56: 930-933.
- Boggon TJ, Murray J, Chappuis-Flament S, Wong E, Gumbiner BM, Shapiro L (2002)** C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science*; 296(5571):1308-13
- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE (1988)** Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol*; 106(3):761-71.
- Bradford MM (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*; 72:248-54
- Brandsen R, Frusic-Zlotkin M, Lyubimov H, Yunes F, Michel B, Tamir A, Milner Y, Brenner S (1997)** Circulating pemphigus IgG in families of patients with pemphigus: comparison of indirect immunofluorescence, direct immunofluorescence, and immunoblotting. *J Am Acad Dermatol*; 36(1):44-52

- Buxton RS & Magee AI (1992)** Structure and interactions of desmosomal and other cadherins. *Semin Cell Biol*; 3(3):157-67
- Caldelari R et al de Bruin A, Baumann D, Suter MM, Bierkamp C, Balmer V, Muller E (2001)** A central role for the armadillo protein plakoglobin in the autoimmune disease pemphigus vulgaris. *J Cell Biol*; 153:823-834
- Chan LS, Vanderlugt CJ, Hashimoto T, Nishikawa T, Zone JJ, Black MM, Wojnarowska F, Stevens SR, Chen M, Fairley JA, Woodley DT, Miller SD, Gordon KB (1998)** Epitope spreading: lessons from autoimmune skin diseases. *J Invest Dermatol*; 110(2):103-9
- Chappuis-Flament S, Wong E, Hicks LD, Kay CM, Gumbiner BM (2001)** Multiple cadherin extracellular repeats mediate homophilic binding and adhesion. *J Cell Biol*; 154(1):231-43
- Chitaev NA, Troyanovsky SM (1997)** Direct Ca²⁺-dependent heterophilic interaction between desmosomal cadherins, desmoglein and desmocollin, contributes to cell-cell adhesion. *J Cell Biol*. 14;138(1):193-201.
- Cowin P, Matthey D, Garrod DR (1984)** Identification of desmosomal surface components (desmocollins) and inhibition of desmosome formation by specific Fab'. *J Cell Sci*; 70:41-60
- Denning MF, Guy SG, Ellerbroek SM, Norvell SM, Kowalczyk A, Green KJ (1998)** The expression of desmoglein isoforms in cultured human keratinocytes is regulated by calcium, serum and protein kinase C. *Exp Cell Res*; 239:50-59
- Diaz LA et al (1989)** Endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem): II. Current and historic epidemiologic studies. *J Invest Dermatol*; 92:4-12
- Ding X, Aoki V, Mascaro JM Jr, Lopez-Swiderski A, Diaz LA, Fairley JA (1997)** Mucosal and mucocutaneous (generalized) pemphigus vulgaris show distinct autoantibody profiles. *J Invest Dermatol*; 109(4):592-6
- Drenckhahn D (2003)** Zellenlehre. In Benninghoff-Drenckhahn Anatomie Band I, 16. Auflage, 26-27
- Emery DJ, Diaz LA, Fairly JA, Lopez A, Taylor AF, Giudice GJ (1995)** Pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris autoantibodies react with the extracellular domain of desmoglein 1 *J Invest Dermatol*; 109:592-596
- Fritz J, Katopodis AG, Kolbinger F, Anselmetti D (1998)** Force-mediated kinetics

- of single P-selectin/ligand complexes observed by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 95(21):12283-8
- Garrod, D.R. (1993)** Desmosomes and Hemidesmosomes. *Curr. Opin. CellBiol.* 5:30-40
- Garrod DR, Merritt AJ, Nie Z (2002)** Desmosomal adhesion: structural basis, molecular mechanism and regulation. *Mol Membr Biol*; 19(2):81-94
- Guasch RM, Scambler P, Jones GE, Ridley AJ (1998)** RhoE regulates actin cytoskeleton organization and cell migration. *Mol Cell Biol*; 18(8):4761-71
- Hanahan D (1983)** Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*; 166(4):557-80
- Hanakawa Y, Selwood T, Woo D, Lin C, Schechter NM, Stanley JR (2003)** Calcium-dependent conformation of desmoglein 1 is required for its cleavage by exfoliative toxin. *J Invest Dermatol*; 121:383-389
- Hashimoto T, Amagai M, Watanabe K, Dmochowski M, Chidgey MAJ, Yue KKM, Garrod DR, Nishikawa T (1995)** A case of Pemphigus vulgaris showing reactivity with pemphigus antigens (Dsg 1 and Dsg 3) and Desmocollins. *J Invest Dermatol*; 109:127-131
- Hashimoto T (2003)** Recent advances in the study of the pathophysiology of pemphigus. *Arch Dermatol Res*; 295 Suppl 1:2-11
- He W, Cowin P, Stokes DL (2003)** Untangling desmosomal knots with electron tomography. *Science*; 302(5642):109-13
- Hennies HC, Kuster W, Mischke D, Reis A (1995)** Localization of a locus for the striated form of palmoplantar keratoderma to chromosome 18q near the desmosomal cadherin gene cluster. *Hum Mol Genet*; 4(6):1015-20
- Hennings H, Holbrook KA (1983)** Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture: an ultrastructural study. *Exp Cell Res*; 143:127-42
- Hinterdorfer P, Baumgartner W, Gruber HJ, Schilcher K, Schindler H (1996)** Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 93(8):3477-81
- Johnson PH, Grossman LI (1977)** Electrophoresis of DNA in agarose gels. Optimizing separations of conformational isomers of double- and single-stranded DNAs. *Biochemistry*; 16(19):4217-25

- Joly P, Gilbert D, Thomine E, Zitouni M, Ghohestani R, Delpech A, Lauret P, Tron F (1997)** Identification of a new antibody population directed against a desmosomal plaque antigen in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *J Invest Dermatol*; 108(4):469-75
- Kitajima Y, Aoyama Y, Seishima M (1999)** Transmembrane signalling 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*; 4:137-44
- Kitajima Y (2002)** Mechanisms of desmosome assembly and disassembly. *Clin Exp Dermatol*; 27(8):684-90.
- Koch PJ, Walsh MJ, Schmelz M, Goldschmidt MD, Zimbelmann R, Franke WW (1990)** Identification of desmoglein, a constitutive desmosomal glycoprotein, as a member of the cadherin family of cell adhesion molecules. *Eur J Cell Biol*; 53:1-12
- Koch PJ, Mahoney MG, Ishikawa H, Pulkkinen L, Uitto J, Shultz L, Murphy GF, Whitaker-Menezes D, Stanley JR (1997)** Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris. *J Cell Biol*; 137:1091-1102
- Koch AW, Bozic D, Pertz O, Engel J. (1999)** Homophilic adhesion by cadherins. *Curr Opin Struct Biol*; 9(2):275-81
- Korman NJ, Eyre RW, Klaus-Kovtun V, Stanley JR (1989)** Demonstration of an adhering-junction molecule (plakoglobin) in the autoantigens of pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris. *N Engl J Med*; 7;321(10):631-5
- Kowalczyk AP, Bornslaeger EA, Norvell SM, Palka HL, Green KJ (1999)** Desmosomes: intercellular adhesive junctions specialized for attachment of intermediate filaments. *Int Rev Cytol* ; 185:237-302
- Kyhse-Andersen J (1984)** Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*; 10(3-4):203-9
- Laemmli UK (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227:680-5

- Leckband D, Sivasankar S (2000)** Mechanism of homophilic cadherin adhesion. *Curr Opin Cell Biol*; 12(5):587-92
- Lever WF (1953)** Pemphigus. *Medicine (Baltimore)*; 32(1):1-123
- Lo Muzio L, Pannone G, Staibano S, Mignogna MD, Rubini C, Ruocco E, De Rosa G, Sciubba JJ. (2001)** A possible role of catenin dyslocalization in pemphigus vulgaris pathogenesis. *J Cutan Pathol*; 28:460-469
- Mahoney MG, Wang Z, Rothenberger K, Koch PJ, Amagai M, Stanley JR (1999)** Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. *J Clin Invest*; 103(4):461-8
- Martel P, Joly P (2001)** Pemphigus: autoimmune diseases of keratinocyte's adhesion molecules. *Clin Dermatol*; ;19(6):662-74
- Memar O, Christensen B, Rajaraman S, Goldblum R, Tyring SK, Brysk MM, McCormick DJ, el-Zaim H, Fan JL, Prabhakar BS (1996)** Induction of blister-causing antibodies by a recombinant full-length, but not the extra-cellular, domain of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3). *J Immunol*; 157(7):3171-7
- Nguyen VT, Arredondo J, Chernyavsky AI, Kitajima Y, Pittelkow M, Grando SA (2004)** Pemphigus vulgaris IgG and methylprednisolone exhibit reciprocal effects on keratinocytes. *J Biol Chem* 279:2135-2146
- Nollet F, Kools P, van Roy F (2000)** Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol*. 9;299(3):551-72
- Olivry T (2001)** Companion Animals, Too, Can Get Pemphigus. *International Pemphigus foundation; online-article*
- Pertz O, Bozic D, Koch AW, Fauser C, Brancaccio A, Engel J (1999)** A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *EMBO J*; 18(7):1738-47.
- Puck TT, Cieciura SJ, Robinson A (1958)** Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med*; 108(6):945-56
- Rickman L, Simrak D, Stevens HP, Hunt DM, King IA, Bryant SP, Eady RA, Leigh IM, Arnemann J, Magee AI, Kelsell DP, Buxton RS (1999)** N-terminal deletion in a desmosomal cadherin causes the autosomal domi-

- nant skin disease striate palmoplantar keratoderma. *Hum Mol Genet*; 8(6):971-6
- Runswick SK, O'Hare MJ, Jones L, Streuli CH, Garrod DR. (2001)** Desmosomal adhesion regulates epithelial morphogenesis and cell positioning. *Nat Cell Biol*; 3(9):823-30
- Schafer S, Koch PJ, Franke WW (1994)** Identification of the ubiquitous human desmoglein, dsg 2, and the expression catalogue of the desmoglein subfamily of desmosomal cadherins. *Exp Cell Res*; 211:391-399
- Sekiguchi M Futei Y, Fujii Y, Iwasaki T, Nishikawa T, Amagai M (2001)** Dominant autoimmune epitopes recognized by pemphigus antibodies map to the N-terminal adhesive region of desmogleins. *J Immunol*; 167:5439-5448
- Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD, Thompson A, Lehmann MS, Grubel G, Legrand JF, Als-Nielsen J, Colman DR, Hendrickson WA (1995)** Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature*; 374(6520):327-37
- Shimizu A, Ishiko A, Ota T, Tsunoda K, Amagai M, Nishikawa T (2004)** IgG binds to desmoglein 3 in desmosomes and causes a desmosomal split without keratin retraction in a pemphigus mouse model. *J Invest Dermatol*; 122(5):1145-53
- Shirakata Y, Amagai M, Hanakawa Y, Nishikawa T, Hashimoto K. (1998)** Lack of mucosal involvement in pemphigus foliaceus may be due to low expression of desmoglein 1. *J Invest Dermatol*; 110(1):76-8
- Sivasankar B, Gumbiner D, Leckband D** Direct measurements of multiple adhesive alignments and unbinding trajectories between cadherin extracellular domains. *Biophys J*; 80:1758-1768
- Skerrow CJ, Matoltsy AG** Isolation of epidermal desmosomes *J Cell Biol*; 63:515-523
- Stanley JR, Yaar M, Hawley-Nelson P, Katz SI (1982)** Pemphigus antibodies identify a cell surface glycoprotein synthesized by human and mouse keratinocytes. *J Clin Invest*; 70:281-288
- Stanley JR, Koulu L, Thivolet C (1984)** Distinction between epidermal antigens binding pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus autoantibodies. *J Clin Invest* 74:313-320

- Syed SH, Trinnaman B, Martin S, Major S, Hutchinson J, Magee AI (2002)** Molecular interactions between desmosomal cadherins. *Biochem J*; 362: 317-327
- Tsunoda K, Ota T, Aoki M, Yamada T, Nagai T, Nakagawa T, Koyasu S, Nishikawa T, Amagai M (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
- Wennerberg K, Der CJ. (2004)** Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci*; 15;117(Pt 8):1301-12
- Wheeler GN, Parker AE, Thomas CL, Ataliotis P, Poynter D, Arnemann J Rutman AJ, Pidsley SC, Watt FM, Rees DA, Buxton RS, Magee AI (1991)** Desmosomal glycoprotein Dsg 1, a component of intercellular desmosome junctions, is related to the cadherin family of cell adhesion molecules. *Proc Natl Acad Sci USA*; 88:4796-4800
- Whittock NV, Bower C (2003)** Targetting of desmoglein 1 in inherited and acquired skin diseases. *Clin Exp Dermatol*; 28:410-415
- Windoffer R, Borchert-Stuhltrager M, Leube RE (2002)** Desmosomes: interconnected calcium-dependent structures of remarkable stability with significant integral membrane protein turnover. *J Cell Sci*; 115:1717-32
- Zillikens D (2000)** Pemphigus, Verlust des desmosomalen Zell-Zell-Kontaktes. *Hautarzt*; 51:309-318
- Zhu B, Chappuis-Flament S, Wong E, Jensen E, Gumbiner BM, Leckband D** Funktional analysis of the structural basis of homophilic cadherin adhesion. *Biophys J*; 84:4033-4042

6. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: modifiziert nach Waschke/Christof
- Abb. 2: modifiziert nach Waschke/Christof
- Abb. 3: zur Verfügung gestellt von der Universitätshautklinik, Würzburg
- Abb. 4: Karen Kuhl, DVM, Dipl. ACVD
- Abb. 5: modifiziert nach Waschke/Christof
- Abb. 6: modifiziert nach Drenckhahn/Christof
- Abb. 7: modifiziert nach Baumgartner
- Abb. 8: modifiziert nach Drenckhahn/Christof

7. Abkürzungen

~	ungefähr
Ø	Durchmesser
AB	Antibiotikum
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Calcium
Da	Dalton
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMP	Dimethyl-Pimelimidat-Dihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dsc	Desmocollin
Dsg	Desmoglein
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
F-Actin	filamentöses Actin
FCS	fetal calf serum
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HBSS	Hanks Buffered Salt Solution
k	Kilo
Kan	Kanamycin
l	Liter
m	milli
M	molar
MES	2-Morpholinoethan-Sulfonsäure
min	Minute

Abkürzungsverzeichnis

NGS	normal goat serum
NPG	N-propyl-galat
o/n	über Nacht
PBS	Phosphat-gepufferte-Kochsalzlösung (Phosphate-buffered-Saline)
PEG	Polyethylenglycol
PF	Pemphigus foliaceus
pH	pH-Wert
PV	Pemphigus vulgaris
RT	Raumtemperatur
SATP	N-Succinimidyl3-(acetylthio)propionate
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
sek	Sekunde
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
μ	mikro

Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Bergmann, meinem Doktorvater. Diese Arbeit wurde am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Würzburg unter der Leitung von Prof. Dr. Detlev Drenckhahn durchgeführt, dem ich für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit, für seine Anregungen und seine freundliche Unterstützung danken möchte.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Jens Waschke, der nicht nur meine Arbeit einmalig betreut hat, sondern auch sonst einfach einmalig ist. Vielen Dank!

Ich danke Prof. Dr. Werner Baumgartner für die Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Experimente mit dem Atomkraftmikroskop. Gabriele Königer möchte ich für ihre geduldige Einarbeitung in die Labortechniken danken. Für die Anleitung im Labor danke ich allen Mitarbeitern, insbesondere Sieglinde Schenk und Karin Reinfurt-Gehm, Nadja Niedermeier, Agnes Weth und Doris Dettelbacher-Weber.

Ich möchte mich außerdem bei Judith Gutberlet ganz herzlich für das Korrekturlesen bedanken und weil sie auch sonst immer für mich da war und das Arbeiten nicht zuletzt gerade durch sie, Jens, Nadja und Stefanie Spaß gemacht hat. So auch vielen Dank an alle meine Kollegen und Kolleginnen, an Ufuk, Angela und die vielen netten Medizindoktoranden und -doktorandinnen.

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Paola Bruggeman