Aus der Klinik für Dermatologie und Allergologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. M. Hertl

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

Charakterisierung des Autoantikörperprofils von Pemphigus vulgaris-Patienten unter Einsatz rekombinanter Autoantigene

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Humanmedizin

Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Vera Svoboda aus Herne

Marburg, 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität
Marburg am: 19.06.2008

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Rothmund
Referent: Prof. Dr. Hertl
1. Korreferent: PD Dr. Garn

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG **1**

1.1 Das Hautorgan **1**

1.1.1 Struktur und Aufbau der Haut 1

1.1.2 Desmosomen 3

1.1.3 Desmogleine 4

1.1.4 Dermoepidermale Junktionszone 5

1.2 Das Immunsystem **6**

1.2.1 Zelluläre Immunität 6

1.2.2 Humorale Immunität 7

1.2.3 Autoimmunität 8

1.3 Bullöse Autoimmundermatosen **10**

1.3.1 Pemphigus vulgaris (PV) 12

1.3.2 Pemphigus foliaceus (PF) 19

1.4 Zielsetzung der Arbeit **21**

2 MATERIAL UND METHODEN **23**

2.1 Klonierung der extrazellulären Dsg3-Domänen **23**

2.1.1 Herstellung der Inserts 24

2.1.1.1 Klonierungsprimer 24

2.1.1.2 PCR 25

2.1.1.3 Restriktionsverdau der PCR-Produkte 27

2.1.1.4 Agarosegelelektrophorese zur Kontrolle der Inserts 27

2.1.2 Klonierung der Inserts in den Baculovirus-Transfervektor 28

2.1.2.1 Baculovirus-Transfervektor pAcGP67EHN 28

2.1.2.2 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung des Vektors 29

2.1.2.3 Ligation 30

2.1.3 Transformation, Selektion, Amplifikation und Isolierung der rekombinanten Plasmide 30

2.1.3.1 Hitzeschocktransformation, Selektion und Amplifikation 30

2.1.3.2 Kontrolle und Isolierung der rekombinanten Plasmide 31

2.2 Das Baculovirus-Expressionssystem 32
2.2.1 Insektenzellen und Kulturmedien 33
2.2.2 Kotransfektion der rekombinantenVektoren mit Baculovirus-DNA in SF-21-Insektenzellen 34
2.2.3 Virusamplifikation 34
2.2.4 Expression der rekombinanten Proteine 35
2.2.5 Proteinaufreinigung 36
2.2.6 Nachweis der rekombinanten Proteine 37
2.2.6.1 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 37
2.2.6.2 Coomassie-Blaufärbung 38
2.2.6.3 Immunoblot (Westernblot) 39
2.2.7 Bestimmung der Proteinkonzentration 40

2.3 Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) 40

2.4 Verwendete Geräte 42

2.5 Patienten und gesunde Kontrollpersonen 42

2.6 Statistische Analyse der ELISA-Ergebnisse 44
2.6.1 Bestimmung des Schwellenwertes 44
2.6.2 Statistische Analyse 45

3 ERGEBNISSE 47

3.1 Herstellung der rekombinanten Dsg3-Proteine 47
3.1.1 Nachweis der amplifizierten Dsg3-Inserts 47
3.1.2 Nachweis der in den Baculovirus-Transfervektor klonierten Dsg3-Inserts 48
3.1.3 Mikroskopischer Nachweis der Transfektion und Virusamplifikation 49
3.1.4 Nachweis der Dsg3-Inserts in den infizierten Insektenzellen 50
3.1.5 Nachweis der rekombinanten Proteine im Westernblot 50

3.2 Etablierung des ELISA 51

3.3 Auswertung der ELISA-Ergebnisse **52**

3.3.1 IgG-Reaktivität von PV-Seren mit den rekombinanten Dsg3-Proteinen 52

3.3.2 IgG-Reaktivität und IgG-Titer gegen die extrazellulären Dsg3-Domänen unter Berücksichtigung der Krankheitsaktivität 53

3.3.3 IgG-Reaktivität und IgG-Titer gegen die extrazellulären Dsg3-Domänen unter Berücksichtigung des klinischen Phänotyps 55

3.3.4 IgG-Autoantikörperprofil einzelner PV-Patienten im Krankheitsverlauf 57

3.3.5 Untersuchung zur Konformationsabhängigkeit der durch IgG-Autoantikörper erkannten Dsg3-Epitope 59

4 DISKUSSION **62**

4.1 Expression der rekombinanten Dsg3-Proteine **62**

4.2 IgG-Reaktivität gegen definierte extrazelluläre Dsg3-Domänen im ELISA **62**

4.3 IgG-Reaktivität gegen native und denaturierte rekombinante Dsg3-Proteine **64**

4.4 IgG-Reaktivität und IgG-Titer unter Berücksichtigung der klinischen Aktivität **66**

4.5 Ausblick **70**

5 ZUSAMMENFASSUNG **72**

6 SUMMARY **74**

7 LITERATUR **76**

8 ANHANG **91**

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Schematische Darstellung der Keratinozyten in den Hautschichten (aus Jung und Moll, 2003)	2
Abb. 1.2	Schematische Darstellung eines Desmosoms (nach Hertl, 2001)	3
Abb. 1.3	Molekulare Struktur der desmosomalen und klassischen Cadherine (aus Amagai, 1995)	4
Abb. 1.4	Schematische Darstellung eines Hemidesmosoms (nach Borradori und Sonnenberg, 1999)	5
Abb. 1.5	Struktur eines Immunglobulins (IgG)	8
Abb. 1.6 A, B	Typischer Hautbefund (A) und Schleimhautbefund (B) beim Pemphigus Vulgaris (Dermatologische Universitätsklinik, Marburg)	13
Abb. 1.7	Schematische Darstellung der Expression von Desmoglein 1 und Desmoglein 3 in Schleimhaut und Haut	14
Abb. 1.8 A, B	Histologie (A) und Immunfluoreszenzbefund (B) beim Pemphigus vulgaris (Dermatologische Universitätsklinik, Marburg)	18
Abb. 1.9	Verwendete extrazelluläre Desmoglein 3-Domänen	22
Abb. 2.1	Schematische Darstellung der angewendeten Klonierungstechnik	24
Abb. 2.2	Modifizierter Baculovirus-Transfervektor pAcGP67EHN	29
Abb. 3.1	Agarosegelelektrophorese der mittels PCR amplifizierten Desmoglein 3-Inserts	48
Abb. 3.2	Agarosegelelektrophorese der in den Vektor klonierten Desmoglein 3-Inserts am Beispiel von Dsg3EC2	48
Abb. 3.3 A, B	Darstellung virusinfizierter SF21-Insektenzellen durch Licht (A)- und Fluoreszenzmikroskopie (B)	49
Abb. 3.4	Agarosegelelektrophorese der Desmoglein 3-Inserts nach Isolierung viraler DNA aus infizierten SF-21 Insektenzellen	50
Abb. 3.5	Darstellung der rekombinanten Desmoglein 3-Proteine im Westernblot	51
Abb. 3.6	ROC (receiver operating characteristic)-Kurve für Dsg3EC1-5	52
Abb. 3.7	IgG-Titer in den verschiedenen Krankheitsstadien von Pemphigus vulgaris-Patienten	55
Abb. 3.8	IgG-Titer bei den verschiedenen klinischen Phänotypen von Pemphigus vulgaris-Patienten	57
Abb. 3.9 A, B	IgG-Autoantikörperprofil repräsentativer Pemphigus vulgaris-Patienten gegen extrazelluläre Desmoglein 3-Domänen im klinischen Verlauf (Dermatologische Universitätsklinik, Marburg)	58

Abb.3.10 A, B, C	Anti-E-Tag Reaktivität (A) und IgG-Reaktivität einzelner Pemphigus vulgaris-Seren (B, C) gegen native und denaturierte Desmoglein 3-Proteine	60
Abb. 3.11	IgG-Titer eines Pemphigus vulgaris-Patientenkollektivs gegen native und denaturierte Desmoglein 3-Proteine	61
Abb. 4.1	Eliminierung pathogener Autoantikörper durch Immunadsorption (nach Hertl, 2001)	71

Abkürzungsverzeichnis

ABSIS	*Autoimmune bullous skin disorder intensity score*
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigen-präsentierende Zelle (*antigen presenting cell*)
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
aqua dest	destilliertes Wasser
bp	Basenpaare (*base pairs*)
BP	Bullöses Pemphigoid
BP 180/BP230	Autoantigene des Bullösen Pemphigoid
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Differenzierungsmerkmal (*cluster of differentiation*)
cDNA	komplementäre DNA (*complementary DNA*)
CI	Konfidenzintervall (*confidence interval)*
d	Tag *(day)*
DNA	Desoxyribonukleinsäure (*desoxyribonucleid acid*)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Dsc	Desmocollin
Dsg	Desmoglein
Dsg3EC1	Baculoprotein, welches AS 1-161 von Dsg3 beinhaltet
Dsg3EC1-5	Baculoprotein, welches die gesamte Ektodomäne (AS 1-566) von Desmoglein 3 beinhaltet
Dsg3EC1p	Baculovirusprotein, welches AS 25-88 von Desmoglein 3 beinhaltet
Dsg3EC2	Baculovirusprotein, welches AS 87-227 von Desmoglein 3 beinhaltet
Dsg3EC3	Baculovirusprotein, welches AS 184-349 von Desmoglein 3 beinhaltet
Dsg3EC4	Baculovirusprotein, welches AS 313-451 von Desmoglein 3 beinhaltet
Dsg3EC5	Baculovirusprotein, welches AS 424-566 von Desmoglein 3 beinhaltet
EC	Extrazelluläre Domäne
ECL	*Enhanced Chemoluminescence*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHN	E-Tag und Histidin/Asparagin Tag
ELISA	*Enzyme-linked-immunosorbent-assay*

F	Vorwärts (*forward*)-Primer
FS	Fogo Selvagem
g	Erdschwerebeschleunigung
His	Histidin
HLA	Humanes Leukozytenantigen
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kD	Kilodalton
LB	*Lysogeny broth*
M	molar
MCS	Multiple Klonierungsstelle (*multiple cloning site*)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*)
min	Minute
ml	Milliliter (=10^{-3} Liter)
µl	Mikroliter (=10^{-6} Liter)
NTA	*nitrilio-tri-acetic acid*
OD	Optische Dichte
pAcGP67EHN	Baculovirus-Transfervektor mit integriertem EHN Tag
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (*phosphate-buffered-saline*)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase-chain-reaction*)
PF	Pemphigus foliaceus
PV	Pemphigus vulgaris
R	Rückwärts (*reverse*)-Primer
ROC	*receiver operating characteristic*
rpm	Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute*)
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat (*sodiumdodecylsulfate*)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
ssDNA	Einzelstrang-DNA (*single strand DNA*)
Th	T-Helferzelle
TCR	T-Zellrezeptor (*T cell receptor*)
U	Einheit (*unit*)
V	Volt

1 Einleitung

1.1 Das Hautorgan

Die Haut (Integumentum commune, Cutis) stellt die äußere Begrenzung des Menschen zu seiner Umwelt dar und nimmt als oberflächengrößtes Organ eine von Körpergröße und Gewicht abhängige Gesamtfläche von 1,5 - 2 m^2 ein. Sie besteht aus mehreren Schichten, welche eine natürliche Barriere gegenüber mechanischen, chemischen und thermischen Einwirkungen darstellen, Schutz gegenüber Infektionen und Strahlen bieten, Wasser-, Elektrolyt- und Temperaturhaushalt regulieren, Sinnesreize aufnehmen sowie eine wichtige Rolle bei immunologischen Abwehrfunktionen spielen.

1.1.1 Struktur und Aufbau der Haut

Die Haut besteht aus Epidermis (Oberhaut), einer epithelialen Schicht, die aus dem Ektoderm hervorgeht sowie Dermis (Lederhaut, Corium), einer bindegewebigen vom Mesoderm abgeleiteten Schicht. Beide Schichten sind durch in die Dermis ragende epidermale Reteleisten dreidimensional miteinander verzapft. Als Verbindung der Haut mit dem darunter liegenden Gewebe dient die Subkutis (Unterhaut), welche aus lockerem Bindegewebe besteht. Zu den Hautanhangsgebilden zählen Haare, Nägel, Talg- und Schweißdrüsen.

Die Epidermis ist ein mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel, dessen vorwiegende Zellpopulation aus Keratinozyten besteht. Mikroskopisch lassen sich von basal nach apikal, anhand der Zellmorphologie und Anordnung, vier Schichten unterscheiden (Abb. 1.1). Als klassisches Proliferationsgewebe unterliegt sie einer ständigen Erneuerung, wobei Mitosen im Stratum basale stattfinden. Im Rahmen der dreiwöchigen terminalen, epidermalen Differenzierung durchwandern die Keratinozyten die Schichten unter Veränderung ihrer Struktur zur Hautoberfläche, wo sie als Hornschuppe abgeschilfert werden. Keratinfilamente (Tonofilamente), welche gebündelt das Zytoplasma der Keratinozyten durchziehen und im Verlauf der epidermalen Differenzierung biochemisch verändert werden, verleihen Stabilität, weshalb sie auch als Zytoskelett bezeichnet werden. Zusätzlich sind in der Epidermis Melanozyten, Langerhans-Zellen, Merkel-Zellen und Lymphozyten vorhanden.

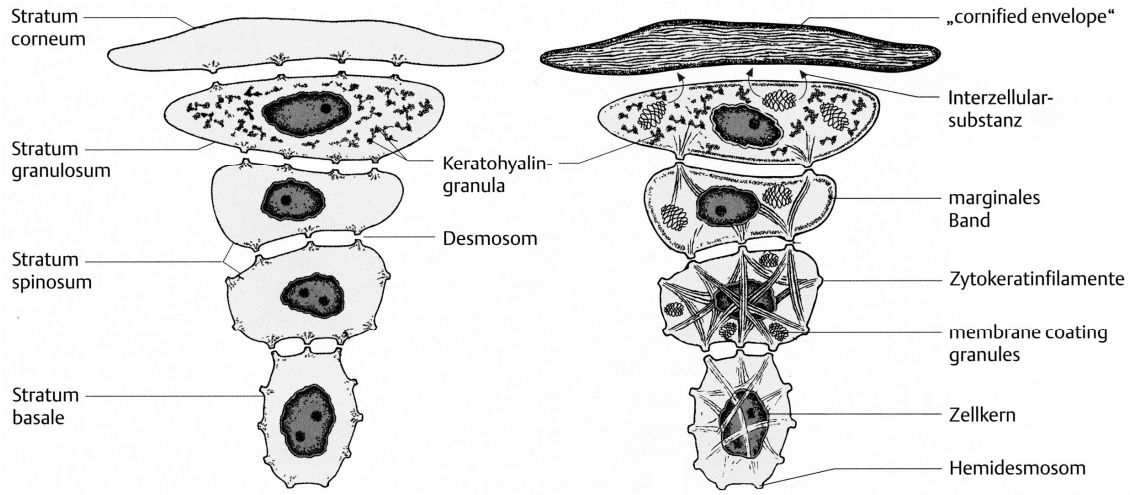


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Keratinozyten in den Hautschichten

Stratum basale: Proliferationsschicht, gekennzeichnet durch kubische Zellen mit vielen Mitosen. Verankerung mit der darunterliegenden Basalmembran durch Hemidesmosomen.

Stratum spinosum: Mehrere Schichten zunehmend abgeflachter Zellen, deren Stabilität durch Desmosomen und Tonofilamente gewährleistet wird. Das marginale Band liegt der Plasmamembran innen an und dient der Zellabdichtung.

Stratum granulosum: Körnerschicht, welche durch aus Proteinen bestehende Keratohyalingranula sowie *membrane coating granules* gekennzeichnet ist. Letztere beinhalten vornehmlich Lipide und werden zur Bildung einer Permeabilitätsbarriere in den Interzellularraum ausgeschleust.

Stratum corneum: Flache kern- und organellenlose keratinisierte Hornzellen bilden eine stabile Abgrenzung zur Umwelt (*cornified envelope*).

(aus Jung und Moll, 2003)

Die bindegewebige Dermis ist durch Reichtum an Kollagenfasern gekennzeichnet, welche ihr mechanische Stabilität und Dehnbarkeit verleihen. Sie spielt eine wichtige Rolle bei der immunologischen Abwehr und Regulation des Hautturgors. Ein ausgeprägtes Gefäßsystem wirkt bei Kreislauf- und Thermoregulation mit. Man unterscheidet zwei Schichten: Das aus lockerem Bindegewebe bestehende Stratum papillare, welches sich in die Räume zwischen den Reteleisten erstreckt, sichert durch seinen Reichtum an Gefäßen und Nerven die Ernährung der Epidermis. Dominierender Zelltyp sind Fibroblasten, aber auch Mastzellen und Makrophagen kommen vor. An die Subkutis grenzt das Stratum reticulare, welches vornehmlich aus Kollagen und elastischen Fasern besteht (Jung und Moll, 2003; Junqueira et al., 2005).

1.1.2 Desmosomen

Desmosomen (Maculae adhaerentes) stellen symmetrische diskoide Strukturen dar, welche die Plasmamembranen benachbarter Zellen miteinander verbinden, so dass direkter Zell-Zell Kontakt entsteht. Sie dienen über Anheftung von Intermediärfilamenten der Aufrechterhaltung des Zytoskeletts und damit der Gewebestruktur (Green und Jones, 1996). Diese Funktionen werden durch eine typische Organisation ermöglicht, welche die folgenden Strukturen beinhaltet (Abb. 1.2):

1. Transmembranöse Glykoproteine: Desmogleine (Dsg) und Desmocolline (Dsc)
2. Zytoplasmatische Plaqueproteine: Desmoplakin, Plakophilin, Plakoglobin, Periplakin, Envoplakin
3. Intermediärfilamente des Zytoskeletts

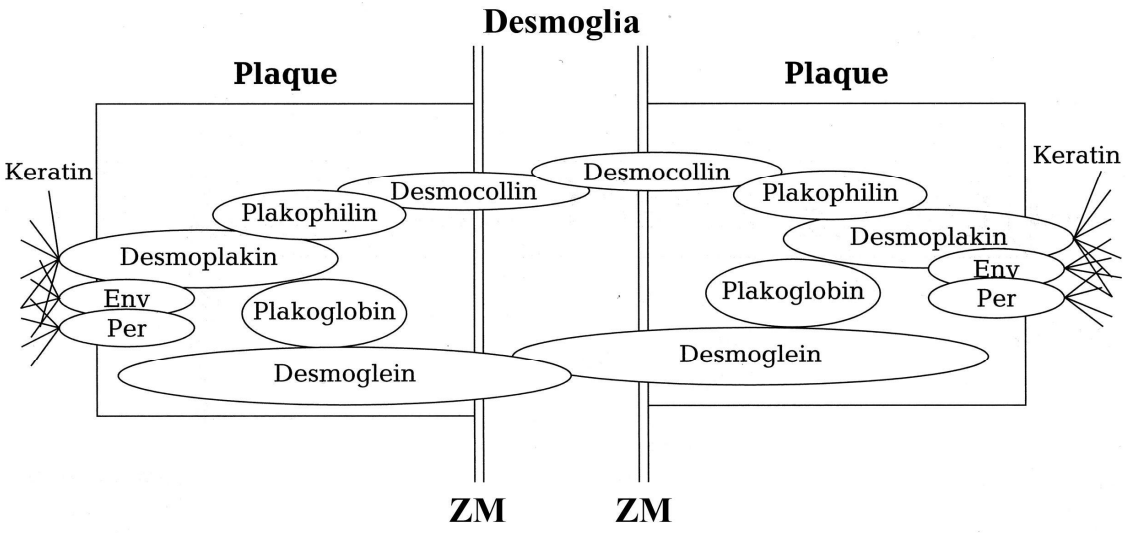
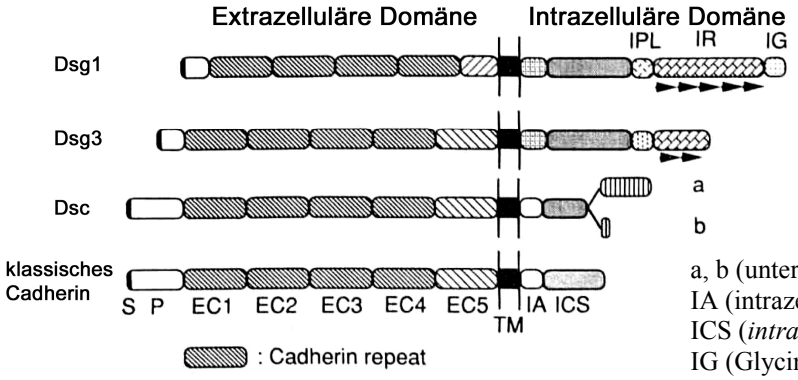


Abb. 1.2: Schematische Darstellung eines Desmosoms

Die transmembranösen Glykoproteine Desmoglein und Desmocollin gehören zur Familie der Cadherine und vermitteln spezifischen Zell-Zell-Kontakt (Takeichi, 1990, 1991). Über die intrazellulären Plaqueproteine (Plakoglobin bzw. Plakophilin aus der Armadillo Familie) sind ihre zytoplasmatischen Domänen indirekt mit dem zellulären Zytoskelett verbunden. Dieser Anteil wird, hochauflösenden Immunogold-Labeling-Studien zufolge, als äußerer dichter Plaque (*outer dense plaque*) bezeichnet. Dagegen zählt das zur Plakin-Familie gehörende Desmoplakin zum weniger dichten, inneren Plaqueanteil (*inner dense plaque*) und dient zusammen mit Envoplakin (Env) und Periplakin (Per) der Interaktion mit den Intermediärfilamenten des Zytoskeletts. Diese bestehen in epithelialen Geweben aus Zytokeratin-Filamenten (Tonofilamente). Der ca. 30 nm breite interzelluläre Spalt wird als Desmoglia bezeichnet. (ZM) Zellmembran. (nach Hertl, 2001)

1.1.3 Desmogleine

Desmogleine (Dsg) gehören, ebenso wie Desmocolline (Dsc), zu den kalziumabhängigen, transmembranösen, desmosomalen Cadherinen. Die Existenz von vier verschiedenen Dsg ist bekannt (Buxton et al., 1993; Kljuic et al., 2003), wobei die für sie codierenden Gene auf dem humanen Chromosom 18q12.1 lokalisiert sind (Hunt et al., 1999). Dsg2 kommt ubiquitär in allen Desmosomen enthaltenden Geweben vor, wogegen die Dsg1- und Dsg3-Expression auf Plattenepithelien von Epidermis, Ösophagus und Cervix beschränkt ist (Huber, 2003) und das kürzlich identifizierte Dsg4 in Haarfollikeln dominiert (Kljuic et al., 2003). Im Gegensatz zu den desmosomalen Cadherinen fungieren die klassischen Cadherine, zu welchen E (*epithelial*)-, P (*placental*)- und N (*neural*)-Cadherine zählen, als transmembranöse Glykoproteine der Zonulae adhaerentes (Amagai, 1995).



a, b (unterschiedliche Splicingprodukte)
IA (intrazelluläre Ankerdomäne)
ICS (*intracellular cadherin-like segment)*
IG (Glycin und Serin reiche Domäne)
IPL (Prolin reiche Verbindungsregion)
TM (Transmembranregion)

Abb. 1.3: Molekulare Struktur der desmosomalen und klassischen Cadherine

Cadherine werden als Vorläuferproteine mit Signalpeptid (S) und Prosequenz (P) gebildet, wobei sie durch Abspaltung der Prosequenz in das aktive Adhäsionsmolekül übergehen. Beide Cadherin Typen beinhalten fünf *„Extracellular Cadherin repeats"* (EC) in ihrer extrazellulären Domäne. Desmogleine (Dsg) unterscheiden sich durch eine einzigartige, carboxyterminal lokalisierte, repetetetive Sequenz aus 29 AS (IR, Pfeile) von den klassischen Cadherinen und Desmocollinen (Dsc). (aus Amagai, 1995)

Cadherine bestehen aus einem intrazellulären Anteil, mit dem sie indirekt über desmosomale Plaqueproteine mit dem zellulären Zytoskelett verbunden sind sowie einer extrazellulären Ektodomäne, über die gleiche Cadherine benachbarter Keratinozyten über homophile Bindung in Kontakt treten. Die charakteristische Ektodomäne (*ectodomain, EC*) ist allen Cadherinen gemein und wird aus fünf spezifischen Regionen (*extracellular cadherin repeats, EC1* (NH_2-Terminus) - *EC5* (COOH-Terminus)) von

jeweils ungefähr 100 Aminosäuren Umfang gebildet, wobei die ersten vier Domänen ausgeprägte Homologien zwischen den einzelnen Cadherinen aufweisen (Amagai, 1995; Huber, 2003). Diese vermitteln über zahlreiche kalziumbindende Einheiten eine homophile, kalziumabhängige Adhäsion. Dabei wird die im Bereich des NH_2-Terminus (EC1) vorhandene, evolutiv bewahrte, Aminosäuresequenz Histidin-Alanin-Valin, welche bei Dsg3 durch die Abfolge Arginin-Alanin-Leucin repräsentiert ist (Koch et al., 1990; Amagai et al., 1991), als Zentrum der homophilen Bindung angesehen (Blaschuk et al., 1990; Takeichi, 1991).

1.1.4 Dermoepidermale Junktionszone

Die Basalmembran, welche die epidermalen Basalzellen mit dem dermalen Bindegewebe des Stratum papillare verbindet, besteht aus zwei Schichten. Die elektronenmikroskopisch weniger dichte Lamina lucida ist mit den basalen Keratinozyten über Hemidesmosomen verbunden, während die dichtere Lamina densa über Verankerungsfibrillen (Kollagen VII) mit der Dermis in Verbindung steht (Green und Jones, 1996; Moll et al., 1996; Borradori und Sonnenberg, 1999).

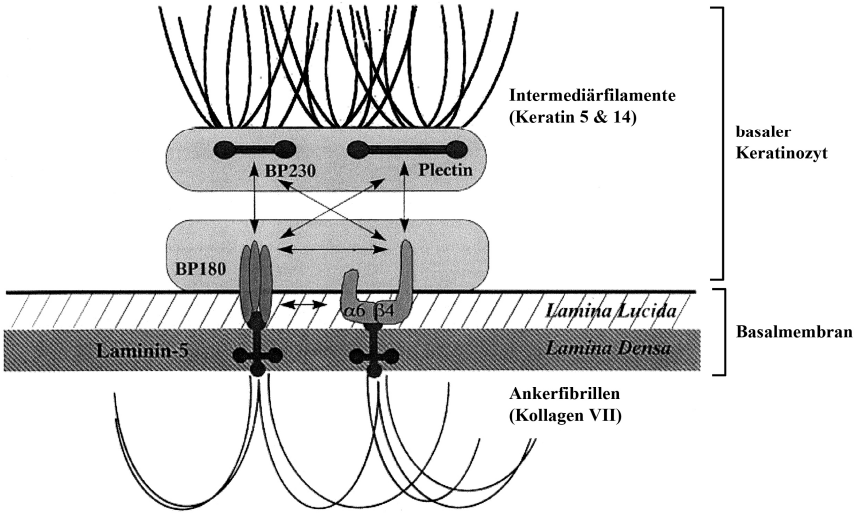


Abb. 1.4: Schematische Darstellung eines Hemidesmosoms

Hemidesmosomen vermitteln, als Multiproteinkomplexe von 0,1-0,5 µm Durchmesser, die Adhäsion epithelialer Zellen mit der darunterliegenden Basalmembran. BP230 und Plectin stellen intrazelluläre Proteine dar, welche die Intermediärfilamente des Zytoskeletts basaler Keratinozyten verankern. Die transmembranösen Komponenten BP180 und α6β4-Integrin dienen der Interaktion mit Laminin-5. Ankerfibrillen vom Kollagen Typ VII verbinden schließlich die Lamina densa mit dem Stratum papillare der Dermis. Die dynamische Stabilität der Hemidesmosomen wird durch zahlreiche Protein-Protein-Interaktionen erreicht (hier durch Pfeile angedeutet). (nach Borradori und Sonnenberg, 1999)

1.2 Das Immunsystem

Das menschliche Immunsystem dient sowohl der Elimination pathogener Umweltfaktoren, als auch transformierter, körpereigener Zellen und lässt sich in die antigenunspezifische angeborene Immunität sowie das antigen-spezifisch wirkende adaptive System einteilen.

Die phylogenetisch ältere, angeborene Immunität bewirkt eine unmittelbare Immunantwort gegenüber Pathogenen mittels unspezifischer Abwehrzellen (u.a. Makrophagen, Monozyten, Mastzellen, Granulozyten) und humoraler Faktoren (Komplement, Akute-Phase-Proteine, Zytokine). Mustererkennende Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR) der unspezifischen Immunzellen erkennen dabei potentielle Pathogene an mikrobentypischen Oberflächenmolekülen (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs).

Weitaus größere Bedeutung für die vorliegende Arbeit hat jedoch die im Folgenden beschriebene, über T-Lymphozyten vermittelte zelluläre Abwehr sowie die durch B-Lymphozyten induzierte humorale Immunität. Beide Effektorsysteme erhalten ihre Spezifität über Zelloberflächenrezeptoren, deren Stimulation durch „passende“ Antigene eine klonale Expansion antigen-spezifischer Zellen auslöst. Voraussetzung für die spezifische Immunität durch T-Zellen ist eine intrazelluläre Vorprozessierung und anschließende, mit humanem Leukozytenantigen (HLA) assoziierte, Präsentation des Pathogens (HLA-Restriktion). HLA-Moleküle gehören zwei unterschiedlichen Klassen an, die beide genetisch im Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 kodiert sind. Auf allen kernhaltigen Zellen exprimierte MHC-Klasse-I-Moleküle dienen dabei der Präsentation intrazellulärer Antigene, während die Erkennung extrazellulärer Antigene durch auf antigenpräsentierenden Zellen (APC), wie Makrophagen, dendritische Zellen (u.a. Langerhanszellen der Haut) und B-Zellen, zusätzlich vorhandene MHC-Klasse-II-Moleküle erfolgt (Gemsa et al., 1997; Janeway et al., 2002)

1.2.1 Zelluläre Immunität

Die zelluläre Immunität ist T-Zell vermittelt. T-Zellen leiten sich von den lymphoiden Stammzellen des Knochenmarks ab, entwickeln sich jedoch im Thymus, wo durch einen Prozess zufälliger Rearrangierung vorhandener Gensegmente eine Vielzahl

unterschiedlicher Rezeptorstrukturen (T-Zell-Rezeptor, TCR) gebildet wird. Aufgrund seiner geringen Affinität zu freien Peptiden erkennt der TCR nur MHC-präsentiertes Antigen (Weber et al., 1992). T-Zellen sind strukturell durch die Expression des Oberflächenmarkers CD3 (*cluster of differentiation*) definiert. Man unterscheidet verschiedene Subpopulationen. CD4-positive T-Helfer (Th)-Zellen erkennen über MHC II präsentierte Antigene und entwickeln sich nach Aktivierung in zwei weitere, funktionell verschiedene Untergruppen, welche durch jeweilig spezifische Zytokin-Sekretionsmuster charakterisiert sind. Th1-Zellen induzieren eine proinflammatorische, zelluläre Immunantwort durch vorwiegende Produktion von Interleukin-2 (IL-2) und Interferon-γ (IFNγ). Dagegen aktivieren Th2-Zellen B-Zellen zur Produktion spezifischer Antikörper und sezernieren vornehmlich IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13. Zytotoxische T-Zellen sind CD8 positiv und dienen primär der Eliminierung körpereigener, pathogen veränderter Zellbestandteile (z.B. infolge Virusinfektion, Neoplasie), welche MHC I-assoziiert präsentiert werden. Die Aufgabe regulatorischer T-Zellen besteht hauptsächlich in der Suppression der Immunantwort (Gemsa et al., 1997; Janeway et al., 2002).

1.2.2 Humorale Immunität

Die humorale Immunität wird durch B-Lymphozyten vermittelt, welche sich wie T-Zellen von den lymphoiden Stammzellen des fetalen Knochenmarks ableiten. Durch die Exprimierung transmembranöser Immunglobuline (B-Zell-Rezeptor, BCR) können sie extrazelluläre komplette Antigene erkennen und binden. Dabei wirken sie durch spezifische Antikörperproduktion einerseits als Effektorzelle bei der Elimination von Antigenen und sind andererseits als APC selbst in der Lage Antigene zu präsentieren. Die Differenzierung einer reifen, naiven B-Zelle zur Antikörper-sezernierenden Plasmazelle setzt neben Antigenbindung durch den BCR meist eine Kostimulation durch Th2-Zellen voraus (Lanzavecchia, 1985). Abhängig vom begleitend sezernierten Zytokinprofil und der Qualität des Kostimulus werden die verschiedenen Immunglobulin-Isotypen produziert, zu welchen IgM, IgG, IgA und IgD zählen. Die für die vorliegende Arbeit hauptsächlich relevanten IgG-Antikörper machen 75% der zirkulierenden Immunglobuline aus, sind plazentagängig und lassen sich in vier Subklassen (IgG_{1-4}) unterteilen. Als Folge der Antigen-Antikörper-Bindung können Antigene inaktiviert, bzw. als nicht lösliche Immunkomplexe ausgefällt und damit neutralisiert werden. Weiterhin dient sie der Erleichterung der Phagozytose durch Opsonierung von

Zielstrukturen und der Markierung antigener Zielzellen, die danach von zytotoxischen Zellen leichter erkannt und vernichtet werden können (*antibody dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) sowie der Aktivierung des Komplementsystems (Gemsa et al., 1997; Janeway et al., 2002).

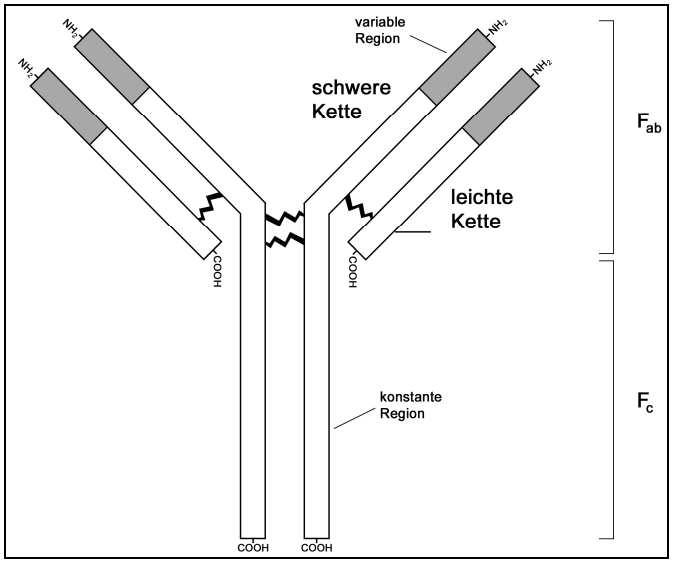


Abb. 1.5: Struktur eines Immunglobulins (IgG)

Immunglobuline bestehen aus einer Antigenbindungsstelle (*fragment antigen binding,* F_{ab}-Fragment) und einem für die biologische Funktion (Komplementaktivierung, Interaktion mit Zelloberflächenrezeptoren) verantwortlichem F_c-Fragment (*fragment crystallizable*). Die aminoterminale, variable Region ist, im Gegensatz zum konstanten Anteil, durch eine hohe Aminosäuresequenzvariabilität gekennzeichnet. Insgesamt vier Polypeptidketten bilden die Grundstruktur eines IgG. Dabei lassen sich jeweils zwei identische, über Disulfidbrücken verbundene, leichte Ketten (L-Ketten) und schwere Ketten (H-Ketten) unterscheiden.

1.2.3 Autoimmunität

Der erwünschte Schutzeffekt des Immunsystems setzt die zuverlässige Fähigkeit voraus, potentiell schädliche Fremdstrukturen von den Geweben und Molekülen des eigenen Körpers zu unterscheiden, da ein Versagen dieses Vermögens die autoagressive Zerstörung lebenswichtiger, körpereigener Strukturen bedeuten kann. Paul Ehrlich bezeichnete den Respekt des Immunsystems vor Strukturen des eigenen Körpers als *„Horror autotoxicus"*. Die Entstehung von Autoimmunität infolge Durchbrechung individueller, körpereigener Toleranzmechanismen ist nach wie vor Gegenstand intensiver Forschungsanstrengungen.

Eine Assoziation von Autoantikörpern mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen ist lange bekannt, wobei autoreaktive Antikörper auch bei gesunden Personen nachge-

wiesen werden konnten, wie z.B. das Auftreten von antinukleären Antikörpern (ANAs) ohne Krankheitswert in der Normalpopulation zeigt (Pisetsky, 2000). Ein bekanntes Beispiel für die Pathogenität von Autoantikörpern ist die Behinderung der Erregungsübertragung bei der Myasthenia gravis, ausgelöst durch eine Autoantikörperreaktion gegen den nikotinischen Acetylcholinrezeptor der neuromuskulären Endplatte (Drachman, 1994).

Die Produktion von Autoantikörpern setzt jedoch eine vorherige Aktivierung potentiell reaktiver B-Zellen durch autoreaktive T-Zellen voraus (Hertl, 2001). Somit ist die Entstehung von Autoimmunerkrankungen prinzipiell infolge eines atypisch starken Stimulus auf diese Zellen oder einer Schwächung gegenregulativer Regelkreise denkbar (Gemsa et al., 1997). Das Konzept der „*molekularen mimikry*“ beschreibt beispielsweise eine atypische Aktivierung von T-Zellen aufgrund struktureller Ähnlichkeit zwischen antigenen Peptidmotiven eines infektiösen Erregers und körpereigenen Determinanten. (Oldstone, 1987). Des Weiteren ist eine polyklonale Aktivierung autoreaktiver Lymphozyten durch mikrobielle Superantigene, welche unspezifisch an der Außenseite des TCR binden und diesen mit MHC-Proteinen einer APZ verknüpfen können, denkbar (Kotzin et al., 1993).

Klinische und tierexperimentelle Beobachtungen beschreiben ferner die Entstehung von Autoimmunität in Assoziation mit dem Auftreten eines „*Epitope Spreading“* (Chan et al., 1998). Vanderlugt und Miller definierten dieses Phänomen als spezifische, T- oder B-lymphozytäre, autoreaktive Immunantwort gegenüber endogenen Epitopen, welche sich von den primär krankheitsauslösenden antigenen Determinanten unterscheiden und mit diesen nicht kreuzreagieren. Als Ursache wird eine durch die Entzündungsreaktion verursachte Gewebedestruktion angenommen, die dem Immunsystem bestimmte Proteinbestandteile als sekundäre Zielstrukturen zugänglich macht (Vanderlugt und Miller, 1996). Die T- oder B-Zell-Antwort bleibt folglich nicht auf das ursprüngliche, krankheitsauslösende „immundominante“ Epitop beschränkt, sondern wird auf weitere Epitope desselben Proteins (intramolekulares *Epitope Spreading*) bzw. andere Proteine desselben Gewebes (intermolekulares *Epitope Spreading*) ausgeweitet (Chan et al., 1998). Beispielsweise konnten verschiedene Arbeitsgruppen, die sich mit dem Phänomen *Epitope Spreading* im Rahmen der Pathogenese von Autoimmundermatosen befassten, eine Assoziation der chronisch-entzündlichen Hauterkrankung Lichen Planus mit dem Auftreten eines bullösen Pemphigoids sowie die Entwicklung eines okulären vernarbenden Schleimhautpemphigoids in Folge einer akuten Episode des Stevens-

Johnson-Syndroms nachweisen. Dabei postulierten sie, dass die infolge des inflammatorischen Primärprozesses induzierte Verletzung der Basalmembranzone eine Autoimmunantwort durch Exposition zuvor „verborgener“ Antigene auslöst (Stingl und Holubar, 1975; Chan et al., 1991).

Daneben ist die Empfänglichkeit für Autoimmunerkrankungen einer Kontrolle durch genetische Faktoren unterworfen (Theofilopoulos, 1995), was u.a. ihre Assoziation mit spezifischen MHC-Haplotypen, wie auch beim Pemphigus vulgaris im Folgenden beschrieben, deutlich macht.

1.3 Bullöse Autoimmundermatosen

Die Gruppe der bullösen Autoimmundermatosen umfasst meist schwere, chronisch verlaufende Erkrankungen von Haut und Schleimhäuten, die mit einer durch autoimmunologische Mechanismen ausgelösten Blasenbildung einhergehen (Lever, 1953; Stanley, 1989). Sie ist durch zirkulierende Autoantikörper gegen spezifische Adhäsionsstrukturen im Bereich der Epidermis und dermoepithelialen Junktionszone charakterisiert.

Die Einteilung der Autoimmundermatosen orientiert sich an der Lokalisation der Blasenbildung, wobei zwischen intraepidermalen und subepidermalen Adhäsionsverlust unterschieden wird. Dabei ist die intraepidermale Blasenbildung durch eine Beeinträchtigung der Adhärenz benachbarter Keratinozyten infolge Autoantikörperbildung gegen desmosomale Zielstrukturen bedingt, während subepidermalen Blasen eine Autoantikörperantwort gegen Hemidesmosomen und Bestandteile der Basalmembran mit konsekutiver dermoepithelialer Adhäsionsstörung zugrunde liegt (Stanley, 1989). Eine genauere Charakterisierung der einzelnen Entitäten kann anhand der durch zirkulierende Autoantikörper erkannten spezifischen Zielantigene erfolgen (Hertl und Schuler, 2002a).

Tab. 1.1: Klassifikation bullöser Autoimmundermatosen (nach: Hertl und Schuler, 2002a)

Blasenbildung	Autoimmunerkrankung	Zielantigen	Klinik
Intraepidermal			
Suprabasal →	**Pemphigus vulgaris** - Pemphigus vegetans - Pemphigus herpetiformis	Desmosom (Dsg3, Dsg1, Dsc), Acetylcholin-Rezeptor	Schlaffe Blasen und Erosionen bevorzugt an Schleimhäuten sowie stammbetont an der Haut.
Subkorneal →	**Pemphigus foliaceus**	Desmosom (Dsg1)	Krustöse Erosionen mit Betonung seborrhoischer Areale.
	Paraneoplastischer Pemphigus	Desmosom (Periplakin, Evoplakin, Desmoplakin I, II, Dsg1, Dsg3) Hemidesmosom (Plektin, BP230)	Polymorphes Krankheitsbild mit Blasen und multiformeartigen Erythemen mit Epidermolyse.
	IgA-Pemphigus - Subkorneale Pustulose - Intraepidermale neutrophile Dermatose	 Desmosom (Dsc1) Desmosom (Dsg1, Dsg3)	Fragile Blasen/Pusteln auf erythematöser Haut.
	Arzneimittelinduzierter Pemphigus	Desmosom (Dsg1, Dsg3)	Stammbetonte fragile Blasen, evtl. Beteiligung der Mundschleimhaut.
Subepidermal	**Bullöses Pemphigoid**	Hemidesmosom (BP180, BP230)	Urtikarielle Plaques mit prallen Blasen, pruriginöse Papulovesikel, in 10-30% Schleimhautbefall.
	- Pemphigoid gestationis		Schwangerschaftsassoziierte urtikarielle, multiformeartige Läsionen.
	- Schleimhautpemphigoid	Hemidesmosom (BP180) Lamina lucida/densa (Laminin-332, α6β4-Integrin)	Zur Vernarbung neigende Blasen/Erosionen der Schleimhäute.
	Lineare IgA-Dermatose	Hemidesmosom (LAD-1 (proteolytisches Fragment von BP180), BP180, BP230, α6β4-Integrin)	Kinder: pralle Blasen mit zentrifugaler Ausbreitung, mukosale Beteiligung. Erwachsene: heterogen.
	Dermatitis herpetiformis Duhring	Epidermale Transglutaminase, (Gliadin, Endomysium)	Herpetiform gruppierte Papulovesikel, starker Pruritus, Assoziation mit glutensensitiver Enteropathie.
	Epidermolysis bullosa acquisita	Ankerfibrillen (Kollagen VII)	Mechanobullöse Blasenbildung, Akren betont, Milienbildung.

1.3.1 Pemphigus vulgaris (PV)

Der Pemphigus vulgaris (PV) ist mit einer Inzidenz von 0,1-0,5/100.000 Einwohner/Jahr der häufigste Vertreter der Gruppe von Pemphiguserkrankungen, welche potentiell lebensbedrohliche, blasenbildende Autoimmunerkrankungen von Schleimhäuten und Haut umfassen. Sie beruhen auf einer akantholytischen Kontinuitätstrennung innerhalb des Epidermisgefüges, welche durch den Verlust der interzellulären Haftung epidermaler Keratinozyten, infolge Autoantikörperreaktion gegen desmosomale Adhäsionsmoleküle, verursacht wird (Beutner und Jordon, 1964, Karpati et al., 1993, 1994). Beim PV ist die Blasenbildung direkt oberhalb der Basalmembran lokalisiert, während beim Pemphigus foliaceus (PF) der Adhärenzverlust innerhalb der oberen Epidermisschichten (subkorneal) auftritt (Bedane et al., 1996). Klinisch imponieren schlaffe, äußerst fragile Blasen mit serösem Inhalt bzw. Erosionen im Bereich der Mukosa, unter Betonung der Mundschleimhaut (Abb. 1.6). Im weiteren Verlauf manifestieren sich häufig zusätzlich Blasen an der Haut, wobei der Körperstamm bevorzugt betroffen ist (Hertl, 2001). Auf klinisch unauffälliger periläsionaler Haut lässt sich, als Zeichen der Akantholyse, die Epidermis durch tangentialen Druck von der Dermis ablösen (Nikolski-Zeichen I positiv). Außerdem können intakte Blasen seitlich verschoben werden (Nikolski-Zeichen II positiv).

Bei der PV-Variante Pemphigus vegetans, welche sich durch Blasenbildung mit sekundärer Entstehung von Pusteln auszeichnet, sind bevorzugt intertriginöse Areale (Leisten, Axilla) befallen (Schmidt et al., 2000). Der Pemphigus herpetiformis ist klinisch durch herpetiform gruppierte Bläschen gekennzeichnet, die dem Bild einer Dermatitis herpetiformis ähneln (Jablonska et al., 1975).

Bevorzugt betroffen sind Menschen im mittleren Lebensalter (30. - 60. Lebensjahr), wobei keine Geschlechtsgebundenheit besteht (Huilgol und Black, 1995; Nousari und Anhalt, 1999). In immungenetischen Untersuchungen konnte eine starke Assoziation von PV-Erkrankungen mit bestimmten HLA-Klasse-II-Allelen nachgewiesen werden. Zu diesen zählen DRβ1*0402, DRβ1*1401 (Ahmed et al., 1990, 1991, 1993; Wucherpfennig et al., 1995) und DQβ1*0503 (Sinha et al., 1988). Eine Prävalenz von PV-spezifischen MHC-II-Allelen wurde bei PV-Patienten in einigen ethnischen Gruppen, wie DRβ1*0402 bei den Ashkenazi-Juden (Ahmed et al., 1990) und verschiedene DRβ1*14 Allele bei Japanern (Yamashina et al., 1998), beobachtet.

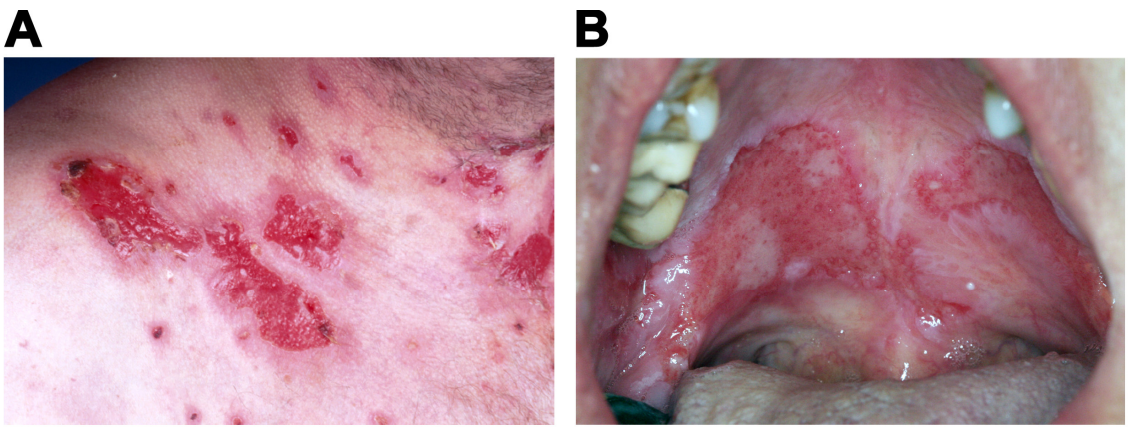


Abb. 1.6 A, B: Typischer Hautbefund (A) und Schleimhautbefund (B) beim Pemphigus vulgaris

Aufgrund der dünnen, äußerst fragilen Blasendecke sind die Blasen im Brustbereich des Pemphigus vulgaris-Patienten größtenteils bereits eröffnet und z.T. nässende Erosionen mit randständigen Epidermisresten zurückgeblieben (A). Klinisch imponieren häufig Mundschleimhauterosionen, wie hier im Bereich des oberen harten Gaumens (B). (Dermatologische Universitätsklinik, Marburg)

Die Klonierung von cDNA ergab, dass das 130 kD umfassende, desmosomale Adhäsionsmolekül Dsg3 das Antigen des PV darstellt, während sich Antikörper beim PF gegen das strukturell verwandte 160 kD Protein Dsg1 richten (Stanley, 1989, 1993; Koch et al., 1990; Amagai et al., 1991, 1992, 1996; Nilles et al., 1991). Dabei erkennen Autoantikörper beim PV hauptsächlich Epitope im Bereich der extrazellulären Domäne des Dsg3 (Amagai et al., 1991, 1994), wobei experimentelle *in vivo* und *in vitro* Daten zeigten, dass vor allem gegen den NH_2-terminalen Anteil des Dsg3 gerichtetes IgG pathogen ist (Amagai et al., 1992; Sekiguchi et al., 2001; Tsunoda et al., 2003). Weitere Untersuchungen ergaben, dass häufig auch bei PV-Patienten pathogenetisch bedeutsame Antikörper gegen Dsg1 nachzuweisen sind (Emery et al., 1995; Ding et al., 1999; Miyagawa et al., 1999).

Die molekulare Konformation des Dsg3 ist kalziumabhängig und dürfte ein wichtiges Kriterium für die epitopspezifische Bindung von Autoantikörpern darstellen. Dies konnte durch die Beobachtung unterstützt werden, dass im eukaryotischen Expressionssystem hergestelltes rekombinantes Dsg3 IgG-Autoantikörper aus PV-Seren bindet, diese Bindungskapazität jedoch durch Denaturierung mit EDTA, Säuren oder Basen verliert (Amagai et al., 1995b; Müller et al., 2008).

Detaillierte Analysen der Dsg-Expression in Haut und Schleimhaut zeigten, dass Dsg3 im Bereich verhornender Epidermis verstärkt in den unteren Schichten, Dsg1 hingegen subkorneal und in geringem Maße suprabasal exprimiert wird. Dagegen kommt

in nicht verhornendem Plattenepithel (Mukosa) Dsg3 relativ homogen in allen Schichten vor, während Dsg1 nur in geringem Ausmaß vorwiegend im Stratum granulosum exprimiert wird (Shimizu et al., 1995; Amagai et al., 1996; Mahoney et al., 1999). Folglich führt die Autoantikörperbindung ausschließlich dort zur Blasenbildung, wo das entsprechend andere Dsg als zusätzliches Adhäsionsmolekül nur schwach exprimiert wird oder fehlt (Abb. 1.7). Diese sogenannte Kompensationstheorie erklärt, warum Antikörper gegen Dsg3 beim PV vor allem zu einem suprabasalen Adhäsionsverlust im Bereich des Mukosa führen, während Antikörper gegen Dsg1 beim PF eine oberflächliche, subkorneale Blasenbildung der Haut induzieren. Zudem wird die Abhängigkeit des klinischen Phänotyps vom Dsg3/Dsg1-Autoantikörperprofil bei PV-Patienten durch diese Theorie bestätigt. Initial richten sich die Autoantikörper vorwiegend gegen Dsg3, was zu Blasen und Erosionen der Mundschleimhaut führt. Eine zusätzliche Beteiligung der Haut (mukokutaner Phänotyp) tritt erst dann auf, wenn außerdem Antikörper gegen Dsg1 vorliegen (Ding et al., 1997; Amagai et al., 1999b; Yoshida et al., 2005).

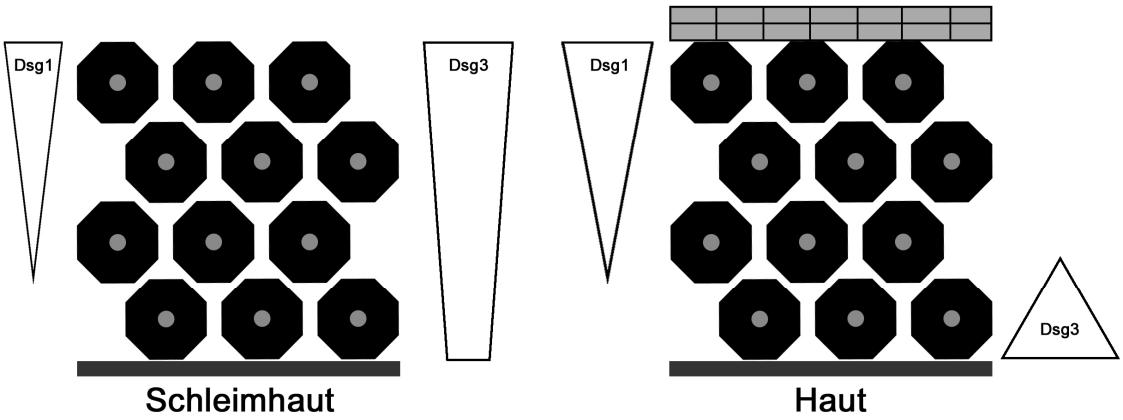


Abb. 1.7: Schematische Darstellung der Expression von Desmoglein 1 und Desmoglein 3 in Schleimhaut und Haut

Der unterschiedliche Anteil der Expression der beiden Desmoglein-Subtypen Dsg3 und Dsg1 in verhornender bzw. unverhornter Epidermis ist die Grundlage der Kompensationstheorie. Im Bereich des verhornenden Plattenepithels (Haut) ist Dsg1 subkorneal und in geringem Maße suprabasal vorhanden, während Dsg3 ausschließlich in unteren Schichten exprimiert wird. Schleimhäute weisen dagegen ein ubiquitäres Vorkommen von Dsg3 im Gegensatz zu einer auf obere Epithelschichten beschränkten Dsg1-Expression auf.

Zahlreiche Untersuchungen untermauern die spezifische Bedeutung der Autoantikörper bei PV-Patienten. Dsg3- und Dsg1-IgG-Autoantikörper konnten in Seren von an PV bzw. PF erkrankten Patienten nachgewiesen werden, nicht jedoch bei gesunden Kon-

trollpersonen (Eyre and Stanley, 1988; Ishii et al., 1997; Harman et al., 2001). Dabei korrelieren die durch indirekte Immunfluoreszenz bzw. im ELISA gemessenen Autoantikörpertiter einzelner PV-Patienten zum großen Teil mit der jeweiligen Krankheitsaktivität (Ishii et al., 1997; Cheng et al., 2002). Ferner sind Immunglobuline aus den Seren von PV-Patienten unter *in vitro*-Bedingungen in der Lage, eine akantholytische Spaltbildung in Epidermiskulturen zu induzieren (Amagai, 1995, Ishii et al., 2005).

Die Autoantikörperproduktion bei PV-Patienten ist polyklonal und anti-Dsg3-Antikörper gehören v.a. der IgG_4- und IgG_1-Klasse an, wobei in aktiven Krankheitsstadien der IgG_4-Subtyp vorherrscht (Bhol et al., 1995; Spaeth et al., 2001). Dagegen weisen PV-Patienten in prolongierter Remission, gesunde Verwandte von PV-Patienten sowie Träger der PV-assoziierten HLA-Klasse-II-Allele lediglich niedrigtitrige IgG_1-Autoantikörper auf (Bhol et al., 1995). Darüber hinaus zeigen Neugeborene von Müttern mit aktivem PV vorübergehend Hautveränderungen, welche dem klinischen Bild des PV entsprechen. Da Immunglobuline der Klasse IgG_4 plazentagängig sind, geht man davon aus, dass während der Gravidität die diaplazentare Übertragung maternaler Pemphigusantikörper für dieses transiente Erscheinungsbild des Neugeborenen verantwortlich ist (Merlob et al., 1986; Chowdhury und Natarajan, 1998; Campo-Voegeli et al., 2002).

Zur detaillierten Charakterisierung der Pathogenese des PV wurden diverse Mausmodelle entwickelt. Anhalt et al. konnten 1982 nachweisen, dass der passive Transfer von IgG, isoliert aus Seren von Patienten mit aktivem PV, in neonatale Mäuse zur intraepidermalen Ablagerung von IgG und pemphigustypischer Blasenbildung führt (Anhalt et al., 1982). Eine Eliminierung pemphigusspezifischer IgG-Autoantikörper durch Immunadsorption mit rekombinantem Dsg3-Protein konnte die pathogenetische Aktivität von PV-Seren beseitigen (Amagai et al., 1994). Des Weiteren zeigten Untersuchungen an Dsg3-defizienten Mäusen einen Gewichtsverlust der genetisch veränderten Versuchstiere infolge verminderter Nahrungsaufnahme bedingt durch Mundschleimhauterosionen, welche histologisch das typische Bild der suprabasalen Akantholyse aufwiesen (Koch et al., 1997). Diese Resultate bestätigen, dass der Funktionsverlust von Dsg3 für die typische, mundschleimhautbetonte Blasenbildung des PV verantwortlich gemacht werden kann. Amagai et al. entwickelten ferner mit Hilfe von Autoantigen-Knockout-Mäusen ein aktives Krankheitsmodell des Pemphigus. Dabei wurden Dsg3-defiziente Mäuse mit rekombinantem Dsg3 immunisiert, was zur Bildung

Dsg3-reaktiver Autoantikörper führte. Der Transfer isolierter Splenozyten dieser Versuchstiere in immundefiziente Mäuse (Rag2 -/-) mit normaler Dsg3-Expression führte zu einer konstanten Anti-Dsg3-Autoantikörperproduktion in Empfängermäusen, welche folglich einen mit PV vergleichbaren klinischen, histologischen und immunpathologischen Phänotyp entwickelten (Amagai et al., 2000).

Verschiedene Versuchsgruppen konnten zeigen, dass PV-assoziierte Antikörper teilweise auch andere desmosomale Autoantigene erkennen. Zu diesen zählen beispielsweise Desmocolline (Hashimoto et al., 1995). Nguyen et al. beschreiben ferner Autoantikörper gegen cholinerge Rezeptoren epidermaler Keratinozyten, wie Pemphaxin und den α9-Acetylcholinrezeptor (Nguyen et al., 2000a, 2000b). Immunoelektronische Studien zeigten, dass PV-Autoantikörper nicht ausschließlich im Bereich der extrazellulären Domäne von Dsg3 binden, sondern auch Anteile der Keratinozytenmembran außerhalb desmosomaler Strukturen erkennen (Bedane et al., 1996). Auch eine Autoantikörperreaktivität mit intrazellulären Epitopen konnte beschrieben werden (Ohata et al., 2001). Die Diversität in der Autoantikörperspezifität ist möglicherweise Folge eines im Krankheitsverlauf auftretenden *„Epitope Spreading“* (s. 1.2.3).

Über den exakten Mechanismus der autoantikörperinduzierten Akantholyse ist noch wenig bekannt. Eine Hypothese beinhaltet, dass anti-Dsg3-Antikörper durch räumliche Verdrängung (*steric hindrance*) die interzelluläre Adhäsion beeinflussen und direkt eine desmosomale Dissoziation auslösen (Koch et al., 1997; Mahoney et al., 1999; Tsunoda et al., 2003). Seishima et al. beschrieben einen durch Pemphigusautoantikörper ausgelösten vorübergehenden Influx von Ca^{2+}-Ionen mit resultierender gestörter Signaltransduktion der Adhäsionsmoleküle (Seishima et al., 1995). Darüber hinaus wurde eine lokale Aktivierung von Proteasen wie Plasminogen-Aktivator und Phospholipase C mit anschließender proteolytischer Abspaltung des extrazellulären Dsg3-Anteils postuliert (Esaki et al., 1995; Kitajima et al., 1999). Andere Arbeitsgruppen beleuchteten ferner die Rolle von Plakoglobin (Caldelari et al., 2001), die Phosphorylierung von Dsg3 (Aoyama et al., 1999) sowie die Bedeutung von Apoptose Signalen (Wang et al., 2004) für die Initiation der Akantholyse. In vitro-Daten von Feliciani et al. zeigten, dass PV-IgG die Synthese von Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-α und IL-1-α-RNA in epidermalen Keratinozyten induziert. Die pathogene Bedeutung dieser proinflammatorischen Zytokine wurde im Mausmodell unter Verwendung von IL-1 sowie TNF-α-defizienten Mäusen belegt, welche nach passivem Transfer von PV-IgG-

Autoantikörpern einen weniger ausgeprägten, PV-spezifischen Phänotyp entwickeln als gesunde Kontrolltiere (Feliciani et al., 2000). Ein Fallbeispiel zeigt ferner eine schnelle klinische Verbesserung therapierefraktärer PV-Patienten infolge Behandlung mit dem TNF-α-inhibierenden, monoklonalen Antikörper Infliximab trotz persistierender, gewebegebundener und zirkulierender IgG-Autoantikörper (Jacobi et al., 2005).

Auch wenn das klinische Erscheinungsbild des PV in erster Linie durch Autoantikörper ausgelöst wird, ist die Rolle von T-Lymphozyten bei PV-Patienten von besonderem Interesse, da diese B-Zell-Antworten induzieren und triggern können. Hertl et al. und andere Arbeitsgruppen konnten das Vorkommen und die Bedeutung Dsg3-reaktiver T-Lymphozyten bei Patienten mit aktivem PV sowie bei gesunden Trägern der PV-prävalenten MHC-Klasse-II-Allele nachweisen (Hertl et al., 1998a; Rizzo et al., 2005). Dabei wurden sowohl Dsg3-spezifische T-Zellen vom Th1- als auch vom Th2-Typ identifiziert (Wucherpfennig et al., 1995; Lin et al., 1997; Hertl et al., 1998a, 1998b; Veldman et al., 2003). Diese scheinen in die Regulation der B-Zell abhängigen Autoantikörperproduktion involviert zu sein, da, wie zuvor beschrieben, Seren von PV-Patienten Th1-regulierte IgG_1 sowie Th2-assoziierte IgG_4- und IgA-Autoantikörper aufweisen (Bhol et al., 1995; Spaeth et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass als APC fungierende B-Zellen, Dsg3-spezifische $CD4^+$ Th-Zellen zur Sekretion von IL-4, IL-6 und IL-10 stimulieren können. Diese Zytokine werden zur Proliferation von B-Gedächtniszellen und Differenzierung in Antikörper-produzierende Plasmazellen benötigt (Lin et al., 1997; Hertl, 2000). Darüber hinaus identifizierten Veldman et al. IL-10 sezernierende, Dsg3-reaktive regulatorische T-Zellen (Treg) bei gesunden Trägern der PV-assoziierten Allele, welche die Autoimmunantwort Dsg3-reaktiver T-Zellen in antigenspezifischer Weise supprimieren können und somit bedeutend für die Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber dem Dsg3-Antigen sein könnten (Veldman et al., 2004a, 2004b).

Die Diagnostik bei Pemphiguserkrankungen basiert neben dem klinischen Erscheinungsbild auf histologischen- und Immunfluoreszenzkriterien sowie neuerdings zusätzlich auf spezifischen Informationen über das Autoantikörperprofil anhand immunserologischer Tests (*Enzyme-linked-immunosorbent-assay*, ELISA) (Hertl und Schuler, 2002b).

Histologisch findet sich eine suprabasale Akantholyse mit gelegentlich eosinophilem Entzündungsinfiltrat (eosinophile Spongiose). Der Verlust der Zell-Zell

Verbindung führt zur Abrundung einzelner epidermaler Zellen (positives Tzanck-Phänomen).

In der direkten Immunfluoreszenz (DIF) lassen sich interzelluläre, gebundene, netzförmig angeordnete IgG-Antikörper in der Epidermis nachweisen, ferner finden sich Ablagerungen von Komplementfaktoren (C3).

In der indirekten Immunfluoreszenz (IIF) mit Patientenseren findet sich ein interzelluläres Bindungsmuster zirkulierender Serumantikörper auf desmosomenreichen Substraten (z.B. Affenösophagus) (Beutner und Jordon, 1964; Stanley, 1993).

Neuerdings ermöglicht ein ELISA-Assay den Nachweis von Autoantikörpern gegen Dsg1 und Dsg3 unter Verwendung rekombinanter Dsg-Proteine eine genauere Diagnostik (Amagai et al., 1999a; Harman et al., 2000, 2001). Eine Differenzierung zwischen PV und PF anhand des Autoantikörperprofils ist möglich. Dabei korreliert die Titerhöhe der spezifischen Autoantikörper mit der Krankheitsaktivität und eignet sich somit zur Verlaufskontrolle von PV-Patienten (Ishii et al., 1997; Cheng et al., 2002).

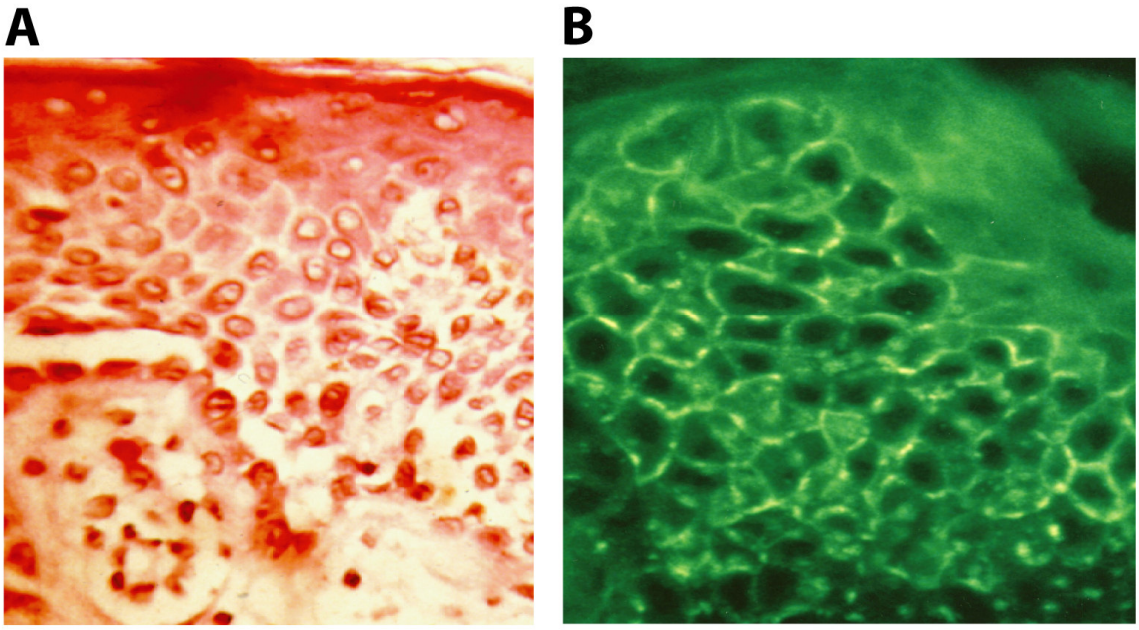


Abb. 1.8 A, B: Histologie (A) und Immunfluoreszenzbefund (B) beim Pemphigus vulgaris

Im histologischen Bild ist beim akuten Pemphigus vulgaris eine suprabasale Akantholyse der Epidermis erkennbar (A). Die direkte Immunfluoreszenz zeigt ein typisches interzelluläres, netzartiges Verteilungsmuster durch Darstellung von *in vivo* an Desmosomen gebundene IgG-Autoantikörper, anhand monoklonaler fluoreszenzmarkierter anti-IgG-Antikörper (B). (Dermatologische Universitätsklinik, Marburg)

Therapeutisch konnte durch den Einsatz hochdosierter systemischer Glukokortikoide ein Rückgang der zuvor hohen Mortalitätsrate beim PV verzeichnet werden. Um Dosis und Dauer der Steroidbehandlung niedrig zu halten, erfolgt in der Regel eine Kombination mit Immunsuppressiva wie Azathioprin, Cyclophosphamid oder Mycophenolat Mofetil (Toth and Jonkman, 2001). Ergänzend werden lokale entzündungshemmende Externa eingesetzt (Mutasim, 1999). Weitere adjuvante therapeutische Strategien bei therapierefraktärem PV wie Plasmapherese (Cotterill et al., 1978; Bystryn, 1988; Turner et al., 2000), bzw. neuerdings Immunadsorption (Eming und Hertl, 2006a), haben direkte Auswirkungen auf die pathogenetischen Antikörper. Vorteil der extrakorporalen Immunadsorption ist eine selektive Reduktion zirkulierender IgG-Autoantikörper, ohne die bei der Plasmapherese anschließend notwendige Substitution von Plasmaproteinen. Eine Kombination aus Immunadsorption und anschließender immunsuppressiver Therapie stellt möglicherweise einen effizienten Ansatz dar um die Erkrankung schneller zum Stillstand zu bringen (Eming und Hertl, 2006a). Ferner werden hochdosierte intravenöse Immunglobuline (IVIG), welche eine Blockade bzw. verstärkten Metabolismus von Autoantikörpern bedingen, in Kombination mit immunsuppressiver Standardtherapie als effizient erachtet (Jolles, 2001). Kürzlich erschienene Studien geben Hinweise auf die therapeutische Wirksamkeit des gegen das CD20-Antigen auf B-Zellen gerichteten, chimären, monoklonalen Antikörpers Rituximab, welcher primär in der chemotherapeutischen Behandlung von CD20+-Non-Hodgkin Lymphomen eingesetzt wird und zu einer B-Zell Depletion führt (Arin et al., 2005; Arin und Hunzelmann, 2005; Hertl et al., 2007). Rituximab wird, in Kombination mit Immunadsorption, auch bei anderen bullösen Autoimmundermatosen, wie der Epidermolysis bullosa aquisita, erfolgreich eingesetzt (Niedermeier et al., 2007).

1.3.2 Pemphigus foliaceus (PF)

Der PF ist im Gegensatz zum PV durch einen subkornealen Adhäsionsverlust im Bereich des Stratum granulosum und oberen Stratum spinosum der Epidermis gekennzeichnet (Emery et al., 1995; Shimizu et al., 1995). Klinisch imponieren schlaffe, leicht zu eröffnende Blasen, die in nässende, z.T. krustöse, flächenhafte Erosionen und blätterteigartige Schuppung übergehen. Prädilektionsstellen sind die seborrhoischen Körperareale, wie Gesicht, Kapillitium und vordere sowie hintere Schweißrinne (Schmidt et al., 2000). Im Gegensatz zum PV wird kein Befall der Schleimhäute beobachtet (Stanley, 1993). Die Lokalisation und spezifische Verteilung der Blasenbildung

kann durch die unter 1.3.1 aufgeführte Dsg-Kompensationstheorie erklärt werden. Eine Konversion von PV zu PF, welche mit der krankheitsspezifischen Veränderung von Phänotyp, Histopathologie, Immunpathologie und Autoantikörperprofil einhergeht, konnte beschrieben werden und gilt als Beispiel eines intermolekularen *Epitope spreading* (Kawana et al., 1994).

Die vor allem in bestimmten Amazonasgebieten Südamerikas endemische PF-Variante, Fogo selvagem (FS, *brasilianisch: wildes Feuer*) lässt auf die Bedeutung eines genetischen Hintergrundes schließen (Diaz et al., 1989). FS betrifft vor allem junge Frauen und ist klinisch, histologisch sowie immunpathologisch nicht vom PF differenzierbar (Stanley et al., 1986a; Kunte et al., 1997). Warren et al. konnten anhand von ELISA-Studien eine erhöhte Prävalenz Dsg1-spezifischer Autoantikörper in der dort ansässigen Gesamtbevölkerung nachweisen (Warren et al., 2000). Aber auch Umweltfaktoren, wie die Assoziation von FS mit dem Verbreitungsgebiet von Stechfliegen der Gattung *Simulium pruinosum* verdeutlicht, scheinen in die Pathogenese dieser Variante involviert zu sein (Diaz et al., 1989).

Autoantikörper richten sich beim PF hauptsächlich gegen die extrazelluläre Domäne des 160 kD Protein Dsg1 (Stanley et al., 1986b; Amagai et al., 1995a; Emery et al., 1995). Analog zum PV konnte die Pathogenität der Autoantikörper durch Präadsorptionsstudien sowie im Mausmodell demonstriert werden (Amagai et al., 1995a, 1995b). Amagai et al. konnten ferner zeigen, dass beim *Staphyloccocal Scaled Skin Syndrom* durch ein von *Staphylokokkus aureus* produziertes exfoliatives Toxin eine gezielte Spaltung von Dsg1 induziert wird, was zu einem PF-analogen klinischen und histologischen Bild führt (Amagai, 2002). In neueren Studien gelang es zudem, in Seren von PF-Patienten Antikörper gegen die desmosomalen Plaqueproteine Envoplakin und Periplakin nachzuweisen, deren Pathogenität und Funktion jedoch bislang ungeklärt sind (Kazerounian et al., 2000; Abreu-Velez et al., 2003).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die bisherigen Ausführungen verdeutlichen, dass bei der Pathogenese der bullösen Autoimmundermatose PV Autoantikörper gegen das desmosomale Adhäsionsprotein Dsg3 eine entscheidende Rolle spielen. Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten, dass sich die Autoantikörperreaktivität hauptsächlich gegen die extrazelluläre Domäne des Dsg3 richtet, wobei zahlreiche *in vitro*- und *in vivo*-Modelle die Pathogenität dieser Antikörper belegen (Anhalt and Diaz, 1989; Ishii et al., 1997; Amagai et al., 1998). Dabei scheinen vor allem B-Zell-Epitope im Bereich der für die homophile Adhäsion von Dsg3 bedeutenden NH_2-terminalen immundominanten Domänen relevant zu sein, wie Versuche mit bakteriellen Fusionsproteinen demonstrieren (Amagai et al., 1992). Ein spezifischer Anteil des Aminoterminus (AS 25-88), wurde u.a. als ein immundominantes Epitop identifiziert (Sekiguchi et al., 2001). Die Produktion der gesamten Ektodomäne von Dsg3 mit Hilfe des Baculovirusexpressionssystems (Amagai et al., 1994; Memar et al., 1996) eröffnete neue Möglichkeiten bezüglich Diagnostik und Verlaufskontrolle bei Pemphiguspatienten mittels ELISA (Amagai et al., 1999a). Es konnte gezeigt werden, dass in diesem serologischen Verfahren die IgG-Reaktivität von PV-Patienten gegen die extrazelluläre Domäne von Dsg3 parallel mit der Krankheitsaktivität verläuft (Ishii et al., 1997). Eine Folgestudie unserer Arbeitsgruppe demonstrierte eine Korrelation von IgG-Reaktivität gegen NH_2-terminale Epitope mit der klinischen Aktivität des PV (Müller et al., 2006), während die Bedeutung der übrigen extrazellulären Domänen in dieser Hinsicht noch unklar ist. Die Aufmerksamkeit der Pemphigusforschung richtet sich ferner auf die Gewinnung präziser Kenntnisse über die Beschaffenheit pemphigusspezifischer Epitope. Amagai et al., konnten zeigen, dass diese abhängig von kalziumsensitiver Konformation sind (Amagai et al., 1995b), darüber hinaus gibt es aber auch Hinweise auf die Existenz nicht-konformationeller Epitope (Müller et al., 2006). Die in der vorliegenden Arbeit angestrebte detaillierte Charakterisierung Dsg3-spezifischer B-Zell-Epitope mittels ELISA unter Berücksichtigung der klinischen Aktivität untersuchter PV-Patienten könnte somit einen Beitrag zum besseren Verständnis der Immunpathogenese leisten und der Definierung verfeinerter serologischer Krankheitsmarker dienen.

Daraus ergeben sich die folgenden Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit:

1) Produktion der gesamten Dsg3-Ektodomäne Dsg3EC1-5 sowie der Subdomänen Dsg3EC1, Dsg3EC2, Dsg3EC3, Dsg3EC4 und Dsg3EC5, inklusive des NH_2-terminalen als immundominant beschriebenen Konstrukts Dsg3EC1p (AS 25-88), als rekombinante Proteine im Baculovirusexpressionssystem (Abb. 1.9).

2) Charakterisierung der IgG-Autoantikörperantwort einer hinsichtlich Krankheitsaktivität und klinischen Phänotyp definierten Kohorte von PV-Patienten gegen die spezifischen Regionen der extrazellulären Domäne des Dsg3 im ELISA.

3) Bestimmung der domänenspezifischen IgG-Autoantikörperprofile einzelner PV-Patienten im Krankheitsverlauf.

4) Untersuchungen zur Konformationsabhängigkeit der Interaktion von PV-spezifischem IgG mit Dsg3-Epitopen im Bereich der extrazellulären Domänen.

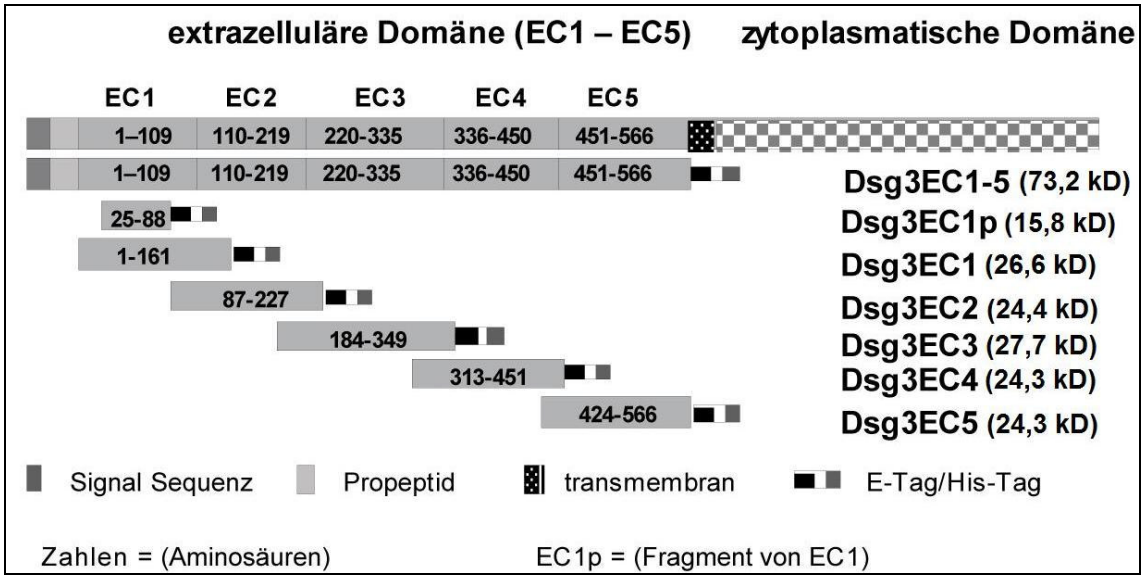


Abb. 1.9: Verwendete extrazelluläre Desmoglein 3-Domänen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten spezifischen Desmoglein 3 (Dsg3)-Domänen sind in Relation zum gesamten Dsg3-Molekül dargestellt. Die extrazellulären rekombinanten Dsg3-Proteine zeichnen sich durch einen His- und E-Tag am COOH-Terminus aus.

2 Material und Methoden

2.1 Klonierung der extrazellulären Dsg3-Domänen

Der Begriff Klonierung bezeichnet eine molekularbiologische Methode, bei der eine beliebige DNA-Sequenz (Insert) in einen Vektor (z.B.: Plasmid) integriert wird. Wirtszellen, z.B. Bakterien des Stammes *Escherichia coli (E.coli)*, werden anschließend mit dem entstandenen Konstrukt transformiert und dieses infolge Vermehrung der Wirtszellen amplifiziert.

Eine Voraussetzung für die Produktion rekombinanter Dsg3-Proteine mittels Baculovirusexpressionssystem war die Integration der DNA der extrazellulären Dsg3-Subdomänen in einen geeigneten Baculovirus-Transfervektor. Dazu wurden die cDNA (*complementary DNA*)-Sequenzen der gewünschten Dsg3-Fragmente unter Verwendung spezifischer Klonierungsprimer mit Hilfe von DNA-Polymerase amplifiziert. Virale cDNA der gesamten Ektodomäne von Dsg3 diente dabei als Vorlage (*template*). Die amplifizierten Inserts wurde mit Restriktionsenzymen geschnitten und in den modifizierten Baculovirus-Transfervektor pAcGP67EHN ligiert. Anschließend erfolgte eine Transformation und Amplifikation der rekombinanten Vektoren in *E. coli*. Isolierte Plasmide wurden durch PCR auf die erwartete Größe des Inserts überprüft und die richtige Nukleotidabfolge durch Sequenzierung bestimmt (Abb. 2.1).

Für die vorliegenden Untersuchungen verwendete rekombinante Baculoviren mit der cDNA-Sequenz der humanen Dsg3- Ektodomäne wurden uns freundlicherweise von Dr. M. Amagai, Keio University, Tokio überlassen. Baculoviren mit integrierten Sequenzen von Dsg3EC1 und Dsg3EC1p wurden freundlicherweise von Dr. R. Müller, Universitätsklinik für Dermatologie und Allergologie, Marburg zur Verfügung gestellt. Folglich wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Klonierung der noch fehlenden Domänen Dsg3EC2, Dsg3EC3, Dsg3EC4 und Dsg3EC5 durchgeführt (Abb. 1.9).

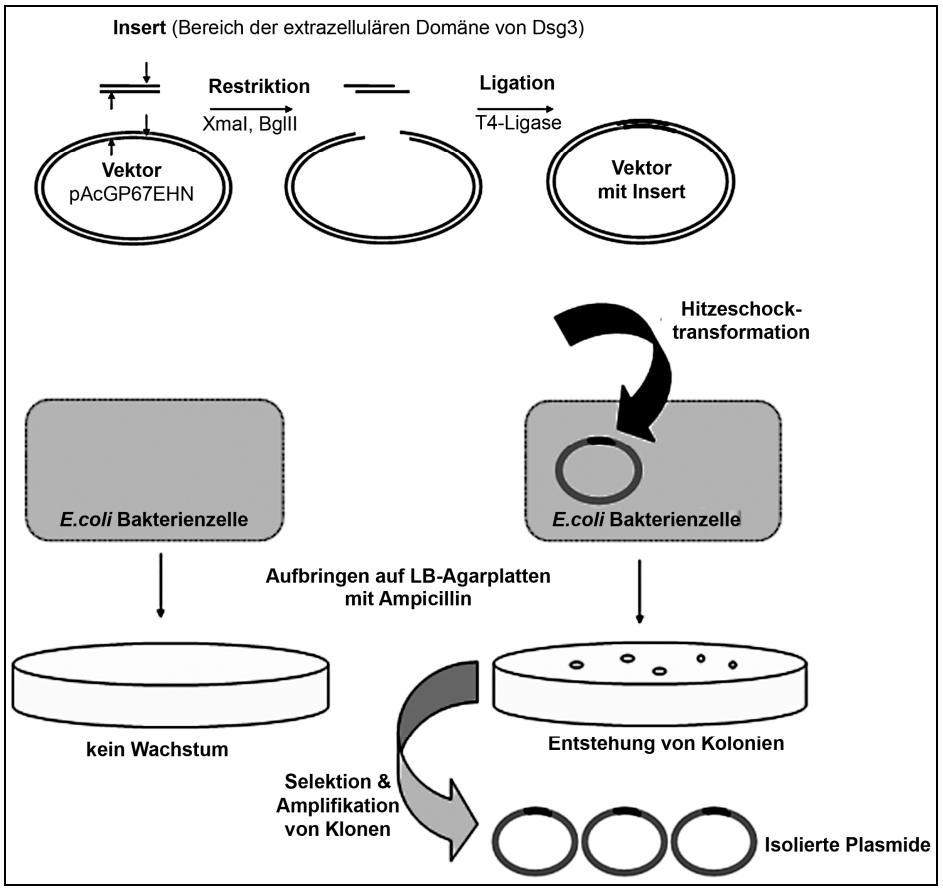


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der angewendeten Klonierungstechnik

Der modifizierte Plasmidvektor (pAcGP67EHN) wurde ebenso wie die Inserts (gewünschte Desmoglein 3 (Dsg3)-Domänen), welche zuvor mittels PCR (Template: cDNA der gesamten Dsg3-Ektodomäne) hergestellt worden waren, mit Hilfe spezifischer Restriktionsenzyme (XmaI, BglII) verdaut. Aufgrund versetzter Schnittstellen entstehen komplementäre, einzelsträngige Enden an Vektor und Ziel-DNA, die eine spezifische Affinität durch zueinander passende Basensequenzen besitzen und als kohäsive Enden (*sticky ends*) bezeichnet werden. Die Ligation von Vektor und Insert wurde durch T4-Ligase katalysiert und das Vektor-Insert-Konstrukt anschließend in einen kompetenten *Escherichia coli* (*E.coli*) Stamm eingeführt (Transformation), welcher durch Hitzeschock zur DNA-Aufnahme optimiert worden war. Erfolgreich transformierte Bakterien konnten aufgrund eines im Plasmid integrierten Antibiotikaresistenzgens (Ampicillinresistenzgen) auf LB-Agarplatten mit Ampicillin wachsen. Bakterienkolonien wurden selektioniert und mit Flüssigkeitsmedium (LB-Medium) angeimpft, was zu einer Amplifikation der Bakterien führte. Aus einem solchen Ansatz konnte eine große Menge an Plasmid-DNA zur anschließenden Kotransfektion mit Baculovirus-DNA in SF21-Insektenzellen isoliert werden.

2.1.1 Herstellung der Inserts

2.1.1.1 Klonierungsprimer

Zur Herstellung der jeweiligen Inserts für die gewünschten Dsg3-Domänen wurden spezifische PCR-Primer als Startpunkt für die DNA-Polymerase konstruiert. Diese sind

komplementär zum Matritzenstrang und schließen den zu amplifizierenden DNA-Bereich beiderseits ein, wobei der Vorwärtsprimer (*forward,* F) zum 3' Ende des Sinnstrangs komplementär ist, während sich der Rückwärtsprimer (*reverse*, R) dem 3' Ende des Gegenstrangs anlagert. Zusätzlich weisen sie Schnittstellen für die ausgewählten Restriktionsenzyme BglII (NEB, Frankfurt) bzw. XmaI (NEB) auf und beinhalten darüber hinausgehende zusätzliche Nukleotide, welche einen guten Angriff der Restiktionsendonukleasen gewährleisten sollen.

Tab. 2.1: Klonierungsprimer

Dsg3	**Vorwärtsstrang(F) Rückwärtsstrang(R)**	**Klonierungsprimer** (Thermo Electron Corporation, Ulm)
EC1	**F**	5'-TTT GCG GCG GAT CCC GGG GAA TGG GTG AAA TTT GCC AAA CC-3'
	R	5'-CAG GAA AGG ATC AGA TCT GAG GAA CAT GGG TGT GCC-3'
EC1p	**F**	5'-TTT GCG GCG GAT CCC GGG ACT TCA GAT TAC CAA GCA ACC CAG AAA-3'
	R	5'-CAG GAA AGG ATG AGA TCT TAC ATC TAG TCC TTG GGC-3'
EC2	**F**	5'-TTT GCG GCG GAT CCC GGG GAT GTA GAG AAA CCA CTT-3'
	R	5'-CAG GAA AGG ATC AGA TCT AAT ACG TGC TGA ATA CTG-3'
EC3	**F**	5'-TTT GCG GCG GAT CCC GGG TAT CGT CTG GTT GTG AGT-3'
	R	5'-CAG GAA AGG ATC AGA TCT GCT ACT TAT GCC TTT TTG-3'
EC4	**F**	5'-TTT GCG GCG GAT CCC GGG CGA TAC CGA GTT CAG TCA-3'
	R	5'-CAG GAA AGG ATC AGA TCT ATC TTT TTC GAG GAC AGC-3'
EC5	**F**	5'-TTT GCG GCG GAT CCC GGG ACG GGT AAA ACT TCT ACA-3'
	R	5'-CAG GAA AGG ATC AGA TCT CCT CCC TGA GTG CGG CCT GCC-3'

2.1.1.2 PCR

Das Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase-chain-reaction*, *PCR*) beruht auf einer selektiven, enzymatischen Vervielfältigung (Amplifikation) eines DNA-Abschnitts mittels zweier Oligonukleotid-Primer, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden. Hier wurde als Template virale cDNA der gesamten extrazellulären Domäne von Dsg3 verwendet. Zur jeweiligen Amplifikation der gewünschten Subdomäne wurden die spezifischen Klonierungsprimer eingesetzt (Tab. 2.1).

Die Amplifikation einer Sequenz erfolgt in mehreren Schritten nach folgendem Prinzip: Im ersten Schritt wird die als Doppelstrang vorliegende Template-DNA durch Erhitzen (hier 94°C) in Einzelstränge (*single strand DNA*, ssDNA) denaturiert. Für den

nächsten Schritt, dem *„Primer-Annealing“*, wird der PCR-Ansatz auf die Hybridisierungstemperatur der Primer herunterreguliert (hier: 56°C), so dass sich die komplementären Oligonukleotid-Primer, welche im Überschuss vorliegen, an die Einzelstränge anlagern. Bei der anschließenden Elongation knüpft eine hitzestabile DNA-Polymerase die im Ansatz vorliegenden Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) an die 3’OH Enden der Primer an und synthetisiert die jeweils komplementäre DNA-Sequenz (Amplifikation). Hierzu wurde eine Pwo-Polymerase verwendet, die dem Bakterium *Pyrococcus woesei* entstammt und sich durch eine, in Relation zur üblicherweise verwendeten Taq-Polymerase (aus: *Thermus aquaticus*), geringere Fehlerrate (hohe *Proofreading*-Aktivität) bei jedoch niedrigerer Amplifikationsrate auszeichnet. Die Reaktionstemperatur wurde beim Optimum der Polymerase (72°C) gewählt. Im Anschluss erfolgen weitere Zyklen aus Denaturierung, *Annealing* und Elongation. Durch die exponentielle Vermehrung der DNA kann die spezifische Sequenz innerhalb von 20-30 Zyklen um den Faktor 10^6 bis 10^9 vermehrt werden.

Durchführung: Die Reaktion wurde im *Thermal Cycler* durchgeführt. Dazu wurden die PCR-Ansätze in 0,2 ml PCR-Tubes (Biozym, Oldendorf) angesetzt, wobei der PCR-Mix-2 jeweils kurz vor Start des Programms mit den in Tab. 2.3 aufgeführten Amplifikationsbedingungen zum PCR-Mix-1 hinzugefügt wurde (s. Tab. 2.2).

Tab. 2.2: Zusammensetzung des PCR-Mix bezogen auf einen Ansatz

Mix 1		
Vorwärtsprimer (ThermoElectron)	5 µM	2,5 µl
Rückwärtsprimer (ThermoElectron)	5 µM	2,5 µl
Template: cDNA von Dsg3EC1-5	100 ng/µl	1,0 µl
dNTP´s (Peqlab, Erlangen)	10 mM	1,0 µl
aqua dest		18 µl
Mix 2		
Reaktionspuffer mit $MgSO_4$ (Peqlab)	20 mM	5,0 µl
Pwo-Polymerase (Peqlab)	1,5 U/µl	2,0 µl
aqua dest		18 µl

Tab. 2.3: PCR Amplifikationsbedingungen

Vorgang	**Temperatur (°C)**	**Zeit (min)**
Denaturierung	94	3
dann 30 Zyklen mit:		
Denaturierung	94	0,5
Annealing	56	0,5
Elongation	72	2
nach den 30 Zyklen:		
terminale Elongation	72	7
	4	Pause

2.1.1.3 Restriktionsverdau der PCR-Produkte

Restriktionsendonukleasen erkennen bestimmte Basensequenzen in der DNA-Doppelhelix, welche häufig Palindrome (umgekehrte Sequenzwiederholungen) sind, wobei sie beide Duplexstränge an spezifischen Stellen durch Spaltung der Phosphodiesterbindung schneiden.

Tab. 2.4: Ausgewählte Restriktionsenzyme

Restiktionsenzym	**Restriktionsschnittstelle**	**Herkunft**
XmaI (NEB)	5' C↓CCGGG 3'	*Xanthomonas campestris*
	3' GGGCC↑C 5'	
BglII (NEB)	5' A↓GATCT 3'	*Bacillus globigii*
	3' TCTAG↑A 5'	

Die Schneidevorgänge mit den Restriktionsendonukleasen erfolgten separat, da diese ihre jeweilige optimale Aktivität in unterschiedlichen Puffersystemen aufweisen. Aus diesem Grund fand vor, zwischen und nach den einzelnen Verdauvorgängen der PCR-Produkte eine Aufreinigung mit dem *„Qia quick PCR purification kit"* (Qiagen, Hilden) gemäß der Angaben des Herstellers statt.

Die Verdauschritte wurden jeweils über Nacht bei 37°C durchgeführt. Dazu wurden die PCR-Produkte mit je 30 U XmaI (NEB) in Puffer 4 (NEB) mit BSA (*bovine serum albumin,* NEB) eingesetzt. Nach Aufreinigung der mit XmaI geschnittenen PCR-Produkte erfolgte der zweite Schneidevorgang mit BglII (NEB). Hierzu wurden die PCR-Produkte mit je 30 U BglII (NEB) in Puffer 3 (NEB) versetzt.

2.1.1.4 Agarosegelelektrophorese zur Kontrolle der Inserts

Zur Detektion und Kontrolle der Inserts wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Bei dieser Methode erfolgt die Trennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe, wobei man sich das Prinzip der Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld in Abhängigkeit von ihrer Größe zunutze macht. Die DNA wandert aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen zur Anode.

Zur Durchführung wurde ein 1,5%iges Agarosegel unter Zugabe von 1 µl einer 50 mg/ml Ethidiumbromid-Lösung (Sigma-Aldrich, München) pro 100 ml TBE Puffer (89 mM Tris (Roth, Karlsruhe), 89 mM Borsäure (Roth), 20M EDTA (Sigma-Aldrich)) in Gelkammern mit einem Gelkamm gegossen. Ethidiumbromid interkaliert in dop-

pelsträngige DNA und kann unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Nach Zugabe von 2 µl 6fach Ladepuffer (50% Glycerin (Roth), 0,25% Bromphenolblau (Sigma-Aldrich), 0,25% Xylencyanol (Sigma-Aldrich), 10 mM EDTA (Sigma-Aldrich) (0,5 M); pH 8,0) und 9 µl aqua dest zu 1 µl verdautem PCR-Produkt wurden 10 µl dieses Ansatzes zur Analyse in die Taschen des in TBE-Puffer befindlichen Agarosegels aufgetragen. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurden zusätzlich 10 µl des 1:5 mit aqua dest verdünnten Längenmarkers (DNA-Leiter, 100-10.000 bp, Peqlab) eingesetzt. Die DNA wurde in einer Elektrophoresekammer bei 170 V aufgetrennt, bis sich die Bromphenolblaubanden 1 cm entfernt vom unteren Ende des Gels befanden. Die durch Ethidiumbromid angefärbten DNA-Banden konnten unter UV-Licht im Geldokumentationssystem detektiert und dokumentiert werden.

Zusätzlich wurde die optische Dichte (OD) der Inserts photometrisch bei 260 nm bestimmt, um die Konzentration der DNA zu ermitteln. Dazu erfolgte eine Verdünnung der PCR-Produkte im Verhältnis 1:50 mit aqua dest.

2.1.2 Klonierung der Inserts in den Baculovirus-Transfervektor

2.1.2.1 Baculovirus-Transfervektor pAcGP67EHN

Der verwendete Baculovirus-Transfervektor pAcGP67A (BD-Biosciences, Heidelberg) zeichnet sich durch die Glykoprotein-67 (GP67)-Signalsequenz aus, welche die Sekretion der Fusionsproteine aus Insektenzellen unterstützt. Diese Sequenz liegt stromaufwärts zur Multiplen Klonierungsstelle (*multiple cloning site, MCS*), die Schnittstellen für verschiedene Restriktionsenzyme beinhaltet (5'- BamHI, SmaI/**XmaI**, XbaI oder NcoI, EcoRI, NotI, EagI, PstI und **BglII** -3'). Gewünschte DNA-Sequenzen können hier solchermaßen inseriert werden, dass die entsprechenden rekombinanten GP67-Signalpeptid-Fusionsproteine anschließend im Baculovirussystem exprimiert und über die Zellmembran ins Medium ausgeschleust werden. Die Proteinexpression steht unter der Kontrolle des Polyhedrinpromotors. Zudem verfügt der Plasmidvektor über ein Ampicillinresistenzgen, welches der Selektion jener Bakterienklone dient, die erfolgreich mit dem Vektor transformiert wurden.

Im Vorfeld wurde der Baculovirus-Transfervektor pAcGP67A im Bereich der MCS durch Hinzufügen eines E-Tags zur Detektion der Proteine im Westernblot sowie eines 6 × Histidin (His, H) - Asparagin (Asn, N)-Tags (His-Tag) zur Proteinaufreinigung verändert (Abb. 2.2). Der modifizierte Vektor pAcGP67EHN wurde freundlicherweise von

Dr. R. Müller, Universitätsklinik für Dermatologie und Allergologie, Marburg zur Verfügung gestellt.

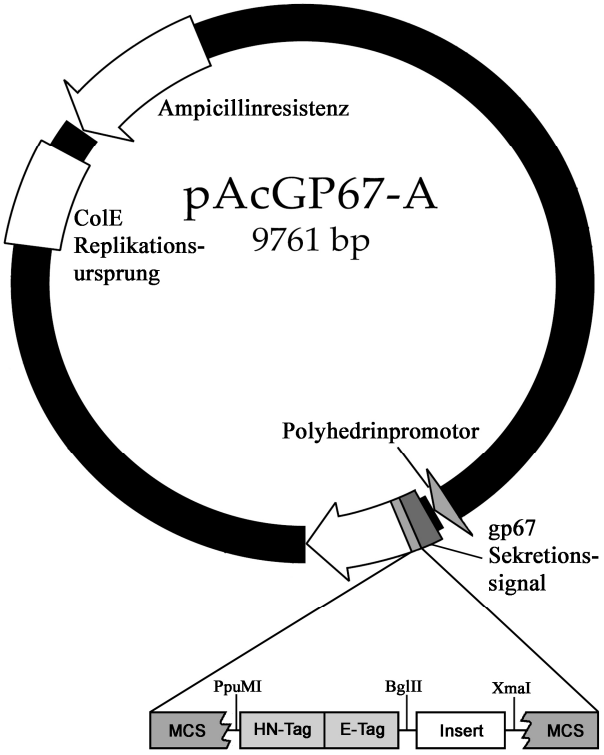


Abb. 2.2 : Modifizierter Baculovirus-Transfervektor pAcGP67EHN

Der 9761 Basenpaare (bp) umfassende Baculovirus-Transfervektor, pAcGP67A, zeichnet sich durch eine Ampicillinresistenz, die GP67-Signalsequenz und den Polyhedrin-Promotor aus. Der Replikationsursprung dient der unabhängigen Vermehrung vom Bakterienchromosom. E-Tag und His-Tag (EHN) wurden im Bereich der Multiplen Klonierungsstelle (MCS) integriert.

Tab. 2.5: Oligonukleotidsequenz des E-Tag/His-Tag (EHN-Tag)

Vorwärtsstrang (F)	5'-GAT CTC TGG TTC CGC GTG GAT CCG GTG CGC CGG TGC CGT ATC CGG ATC CGC TGG AAC CGC GTG CCG CAG TCG ACG CGC GCG GCC ATA ACC ATA ACC ATA ACC ATA ACC ATA ACC ATA ACT GAG G-3'
Rückwärtsstrang (R)	5'- GTC CCT CAG TTA TGG TTA TGG TTA TGG TTA TGG TTA TGG TTA TGG CCG CGC GCG TCG ACT GCG GCA CGC GGT TCC AGC GGA TCC GGA TAC GGC ACC GGC GCA CCG GAT CCA CGC GGA ACC AGA -3'

2.1.2.2 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung des Vektors

Analog zum Restriktionsverdau der Inserts erfolgte auch das Schneiden des Vektors mit den Restriktionsenzymen XmaI und BglII in ihren jeweiligen Puffersystemen. Aufreinigungsschritte wurden vor und nach den Verdauvorgängen und der Dephosphorylierung mit dem *„Qia quick PCR purification kit"* (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden 2 µg modifizierter Vektor pAcGP67EHN in Puffer 3 (NEB) mit 30 U BglII geschnitten. Anschließend erfolgte ein zweiter Restriktionsschritt, bei welchem der mit BglII verdaute Vektor in Puffer 4 (NEB) mit BSA und 30 U XmaI eingesetzt wurde. Beide Restiktionsvorgänge wurden jeweils über Nacht bei 37°C durchgeführt.

Um eine Rezirkulation des Vektors, welche bei unvollständigem Doppelverdau bzw. nicht vollständiger Abtrennung des Inserts möglich wäre, während der Ligation zu verhindern, erfolgte eine Dephosphorylierung (Entfernung der 5'Phosphatgruppen) mit alkalischer Phosphatase (33 µl Vektor Lösung, 3 µl SAP (*Shrimp alkaline phosphatase*) (Promega, Mannheim), 4 µl 10fach Puffer (Promega)). Nach einer Inkubationszeit von 45 min wurde die SAP für 15 min bei 65° deaktiviert.

Zur Detektion und Größenkontrolle des Vektors, wurden analog zum unter 2.1.1.4 beschriebenen Vorgehen eine Agarosegelelektrophorese sowie eine photometrische OD-Bestimmung durchgeführt. Dabei wurden 5 µl verdauter Vektor mit 2 µl 6fach Ladepuffer und 5 µl aqua dest versetzt und zur Analyse auf das Agarosegel aufgetragen.

2.1.2.3 Ligation

Eine Ligation von Vektor und Insert wurde über T4-Ligase infolge Knüpfung von Phosphodiesterbindungen katalysiert. Zur Ligation von pAcGP67EHN mit dem jeweiligen Insert wurden 100 ng geschnittener Vektor mit einem dreifachen molaren Überschuss an verdautem DNA-Fragment in Ligase-Puffer (2fach Rapid Ligation Puffer, Promega) mit 3 U/µl T4-Ligase (Promega) zuerst 15 min bei RT und anschließend 3 h bei 8°C inkubiert.

2.1.3 Transformation, Selektion, Amplifikation und Isolierung der rekombinanten Plasmide

2.1.3.1 Hitzeschocktransformation, Selektion und Amplifikation

Zur Transformation wurden 3 µl des jeweiligen Ligationsansatzes in 25 µl ultrakompetenten Bakterien *E.coli XL10 gold* (Stratagene, Amsterdam) für 20 min auf Eis inkubiert. Nach Auslösen eines Hitzeschocks (1 min, 42°C) wurden die Zellen nochmals 2 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock dient dabei zur Permeabilitätssteigerung der Bakterienmembran, so dass eine Aufnahme der Plasmide erleichtert wird. Nach Aufnahme der Zellen in 200 µl 37°C warmes LB (*Lysogeny broth*)-Medium (Invitrogen, Karlsruhe; 25g in 1 l aqua dest (pH 7,5)) wurden sie für eine Stunde bei 37°C und 200 rpm im Bakterieninkubator inkubiert. Jeweils 100 µl eines Transformationsansatzes wurden auf eine LB-Agar-Platte (32 g LB-Agar (Invitrogen) in 1 l aqua dest) mit 100 µg/ml Ampicillin (Sigma-Aldrich) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die aufgrund ihrer im aufgenommenen Plasmid integrierten Ampicillinresistenz gewachsenen Klone wurden selektiert, in jeweils 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin aliquotiert und über Nacht unter Schütteln bei 200 rpm im Bakterieninkubator bei 37°C inkubiert. Jeweils 500 µl der Bakterienübernachtkultur wurden in 500 µl LB-Medium, welches mit 100 µg/ml Ampicillin und 50% Glycerin angereichert worden war, bei -80°C verwahrt.

2.1.3.2 Kontrolle und Isolierung der rekombinanten Plasmide

PCR mit Kontrollprimern: Zur Amplifikation der Inserts in den Vektoren wurde der Bakteriensuspension jeweils ein Aliquot von 10 µl entnommen, bei 95°C aufgekocht und 1 µl als Template verwendet. Die PCR wurde analog dem unter 2.1.1.2 beschriebenen Vorgehen, jedoch unter Verwendung von Taq-DNA-Polymerase (Peqlab), durchgeführt. Diese entstammt dem Bakterium Thermus aquaticus und zeichnet sich durch hohe Prozessivität aus. Zur Amplifikation wurden Kontrollprimer (ThermoElectron) verwendet, welche 5' und 3' flankierend von der in die MCS einklonierten Dsg3-Sequenz binden (Tab. 2.7). Die PCR fand unter den in Tab. 2.3 beschriebenen Amplifikationsbedingungen und mit den in Tab. 2.6 aufgeführten Reagenzien statt.

Tab. 2.6: PCR-Ansatz zur Amplifikation der Inserts in den Vektoren

Vorwärtsprimer (ThermoElectron)	5 µM	1,25 µl
Rückwärtsprimer (ThermoElectron)	5 µM	1,25 µl
Template	100 ng/µl	1,0 µl
dNTP´s (Peqlab)	10 mM	0,5 µl
Reaktionspuffer (10x) mit 20mM $MgCl_2$ (Peqlab)	20 mM	2,5 µl
Taq-Polymerase (Peqlab)	1,5 U/µl	0,15 µl
aqua dest		18,35 µl

Tab. 2.7: Kontrollprimer

F	5'-TAACCATCTCGCAAATAAATAAGT-3'
R	5'-TAATACGCCGGACCAGTGAACAGA -3'

Kontrolle und Isolierung der rekombinanten Vektoren: Zur Detektion und Größenkontrolle der Inserts im Vektor erfolgte eine Agarosegelelektrophorese analog zum unter 2.1.1.4 beschriebenen Vorgehen, so dass Vektoren, welche in der Gelelektrophorese ein Insert in entsprechender Größe aufwiesen, isoliert werden konnten. Dazu wurde die Suspension der Bakterienübernachtkultur bei 1200 g für 10 min zentrifugiert. Das dazugehörige Pellet wurde nach Angaben des Herstellers mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen) aufgereinigt und die Plasmide isoliert. Die DNA wurde mit 50 µl EB Puffer (10 mM /HCl, pH 8,5 (Qiagen)) eluiert und ihre Konzentration photometrisch bestimmt.

Sequenzierung der rekombinanten Vektoren: Schließlich wurden die rekombinanten Baculovirus-Transfervektoren, welche das Insert mit der richtigen Größe sowie eine ausreichende DNA-Konzentration aufwiesen, sequenziert (Sequiserve, Vaterstetten). Dazu verwendete die Firma Sequiserve den Primer PH-Profor 5’-AAA TGA TAA CCA TCT CGC-3’, welcher an den Polyhedrinpromotor bindet.

2.2 Das Baculovirus-Expressionssystem

Die Voraussetzung für den Einsatz der rekombinanten Dsg3-Proteine ist deren Produktion in einem geeigneten Expressionssystem. Das Baculovirus-Expressionssystem (BEVS, *Baculovirus Expression Vector System*, Pharmingen, Heidelberg) ist ein eukaryotisches Expressionssystem in dem heterologe Gene in Insektenzellen exprimiert werden können. Baculoviren sind ausschließlich insektenpathogene und insektenspezifische Viren, die zu den Kernpolyhedrosis-Viren (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus,* AcNPV) gehören und Insektenspezies aus der Familie der *Lepidoptera* befallen. Dabei erfolgt die Infektion der Wirtszelle durch erleichterte Endozytose bzw. durch Fusion mit der Zellmembran. Üblicherweise besteht ihr Genom aus zirkulärer, doppelsträngiger DNA, hier wurde jedoch liniarisierte *Baculo-Gold-Bright-Virus*-DNA verwendet um die Rekombinationseffizienz zu erhöhen (s. 2.2.2). Die Integration heterologer Fremdgene in das Virusgenom erfolgt durch Transfervektoren (hier: pAcGP67EHN). Diese können mittels Kotransfektion mit Baculoviren in Insektenzellen eingeschleust werden. Dabei besitzt der Transfervektor Endsequenzen, die homolog zur Baculovirus DNA sind, was eine Rekombination ermöglicht. Durch Rekombination und Selektion erhält man infektiöse Viren mit eingebautem Fremdgen. Gebräuchlich ist die Kultivierung von Insektenzellen der *Lepidoptera*-Species, *Spodoptera frugiperda* und

Trichoplusia ni, als Wirtszellen für Kotransfektion, Virusamplifikation und Proteinexpression.

Ein Vorteil des eukaryotischen Baculovirusexpressionssystems gegenüber prokaryotischen Systemen besteht darin, dass die durch Insektenzellen exprimierten Fremdproteine solchermaßen produziert und modifiziert werden, dass sie sich in ihrer dreidimensionalen Struktur, Funktion und immunologischer Reaktivität kaum von den Proteinen der eukaryotischen Ursprungszelle unterscheiden. Sie werden sowohl posttranskriptionellen Veränderungen wie *Splicing,* als auch posttranslationalen Modifikationen wie Glykosylierung und Phosphorylierung unterzogen. Da die Expression der Fremd-DNA unter Kontrolle eines starken Promotors (Polyhedrin-Promotor) steht, können auch größere Mengen des gewünschten Proteins hergestellt werden (bis zu 1 g rekombinantes Protein / 1×10^9 Insektenzellen) (Pharmingen, 1999).

2.2.1 Insektenzellen und Kulturmedien

Zelllinien der *Lepidoptera*-Arten, *Spodoptera frugiperda* (SF-21, Invitrogen) und *Trichoplusia ni* (High-5, Invitrogen), wurden unter der Sterilwerkbank in 175 cm^2-Kulturflaschen (Nunc, Wiesbaden) ausgesät und bei 27°C kultiviert. Dafür wurde aus einer bewachsenen Kulturflasche das Kulturmedium (ca. 30 ml) abgenommen und verworfen. Die am Boden adhärenten Zellen wurden mit Kulturmedium (RT) abgespült und je nach Zelldichte unter dem Mikroskop zu gleichen Teilen auf drei (SF-21-Zellen) bis vier (High-5-Zellen) weitere 175 cm^2-Kulturflaschen, welche bereits frisches Medium enthielten, verteilt. Anschließend erfolgte eine zwei- bis dreitägige Inkubation bei 27°C im Wärmeschrank. Dabei zeichneten sich die SF-21-Zellen durch eine Verdopplungszeit von 24 h aus, während die der High-5-Zellen 18 h betrug.

Für die Kultivierung wurden folgende Insektenzellmedien mit ihren Zusätzen verwendet:

SF-21 Zellmedium:
Grace´s Insect Medium, Supplemented (Invitrogen)
+Penicillin/Streptomycin 1:100 (Invitrogen)
+hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum 10% (*fetal calf serum, FCS*) (PAA, Cölbe)

High-5 Zellmedium:
SF 900 II SFM (*serum free media*) (Invitrogen)
+Penicillin/Streptomycin 1:100 (Invitrogen)

2.2.2 Kotransfektion der rekombinanten Vektoren mit Baculovirus-DNA in SF-21-Insektenzellen

Die Kotransfektion des rekombinanten Transfervektors erfolgte mit linearisierter *Baculo-Gold-Bright-Virus*-DNA (BD Biosciences). Diese ist durch eine letale Deletion in solcher Weise modifiziert, dass sie nicht für ein lebensfähiges Virus kodiert. Nur infolge Kotransfektion von Insektenzellen mit Virus-DNA und Baculovirus-Transfervektor entsteht ein vermehrungsfähiges Virus. Folglich wird die Rekombinationseffizienz auf nahezu 100% erhöht. Außerdem beinhaltet die linearisierte DNA ein Gen, welches für ein grün-fluoreszierendes-Protein (GFP) codiert, so dass die mit dem rekombinanten Virus infizierten Insektenzellen fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden können.

Die Kotransfektion wurde mit SF-21-Zellen durchgeführt, welche zuvor in eine 25 cm^2 -Kulturflasche so ausgesät worden waren, dass diese ca. 1,5 Mio Zellen in 5 ml Insektenzellmedium (50-70% Konfluenz) beinhaltete. Nach einer Stunde Adhärenzzeit wurde das Insektenzellmedium abgenommen und die Zellen einmalig mit frischem Medium gewaschen. Danach erfolgte die Kotransfektion mit dem Baculo-Gold-Transfektions-Puffer A und B Set (BD Biosciences) nach Angaben des Herstellers. Hierzu wurden 0,5 µg *Baculo-Gold-Bright-Virus*-DNA, 2 µg rekombinanter Vektor und je 1 ml Transfektionspuffer A bzw. B verwendet. Nach einer vierstündigen Inkubationszeit bei 27°C wurde der Überstand abgenommen und die adhärenten Zellen nach einmaligem Waschen und Zugabe von 3 ml frischem Medium bei 27°C für weitere 5 d kultiviert. Daraufhin wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, bei 3350 g und 4°C 10 min abzentrifugiert, um die Zellen zu entfernen, und der virushaltige Überstand wurde zur weiteren Virusamplifikation verwendet.

2.2.3 Virusamplifikation

Um einen für die Proteinproduktion ausreichend hohen Virustiter von 10^7 bis 10^8 Viren/ml Kulturüberstand zu erreichen, mussten mehrfach Virusamplifikationen durchgeführt werden. Dazu wurden SF-21-Insektenzellen verwendet. Dabei ist das Verhältnis von transfizierten Baculoviren zu Insektenzellen entscheidend. Würden mehrere Baculoviren eine Insektenzelle infizieren, bestände die Möglichkeit der Rekombination viraler DNA, so dass Deletionsmutanten entstehen könnten. Dementsprechend wurde das Verhältnis von Viren zu SF-21-Zellen, die so genannte MOI (*multiplicity of infection*; = Viruslösung (ml) x Virustiter (pfu/ml) / Zellzahl) < 1 gewählt. Der Virustiter,

welcher in der Einheit „*plaque forming units*“ (pfu) angegeben wird, wurde im Vorfeld durch fluoreszenzmikroskopische Auszählung der einzelnen Plaques bestimmt.

Die Virusamplifikation erfolgte zunächst in 25 cm^2-Kulturflaschen (Nunc) ($1{,}5\times10^6$ Zellen) und schließlich in 175 cm^2-Kulturflaschen (Nunc) (30×10^6 Zellen). Auf die adhärent gewachsenen Zellen wurde 10 ml Kulturmedium (175 cm^2) mit einem entsprechendem Volumen an Viruslösung gegeben, so dass sich eine MOI < 1 ergab. Es folgte eine Inkubationszeit von 60 min bei RT, wobei ein regelmäßiges Schwenken der Kulturflaschen eine gleichmäßige Verteilung der Viruslösung in der Insektenzellkultur gewährleistete. Danach wurde in jede Kulturflasche zusätzlich 20 ml frisches Kulturmedium pipettiert und weitere 7 d bei 27°C inkubiert.

Die erfolgreiche Infektion zeigte sich bereits nach zwei bis drei Tagen sowohl licht-, als auch fluoreszenzmikroskopisch. Unter dem Lichtmikroskop ließ sich ein starker Adhärenzverlust nachweisen. Die Insektenzellen waren aufgetrieben und wiesen vergrößerte Kerne auf. Unter dem Fluoreszenzmikroskop leuchteten virusinfizierte Insektenzellen grün, bedingt durch die Eigenschaft des *Baculo-Gold-Bright-Virus,* das „Grün-Fluoreszierende-Protein“ (*green fluorescent protein*, GFP) zu produzieren.
Nach sieben Tagen wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und bei 3350 g für 10 min zentrifugiert. Der virushaltige Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung unter Lichtschutz bei 4°C gelagert. Bis ein ausreichend hoher Virustiter für die Proteinexpression vorhanden war, waren ca. vier Amplifikationen notwendig.

Zum Nachweis der erfolgreichen Transfektion und Virusamplifikation wurde mit Hilfe des *„DNeasy tissue kit“* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers virale DNA aus den Insektenzellen extrahiert und mittels PCR amplifiziert. Dafür wurden die unter 2.1.3.2 beschriebenen Primer und Amplifikationsbedingungen verwendet. Die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente wurde anschließend durch Agarosegelelektrophorese (s. 2.1.1.4) überprüft.

2.2.4 Expression der rekombinanten Proteine

Für die Produktion der rekombinanten Dsg3-Proteine wurden High-5-Insektenzellen verwendet. Diese zeichnen sich durch eine im Vergleich mit SF-21-Zellen für bestimmte Proteine höhere Expressionsrate aus. Es wurden 30×10^6 Zellen in einer 175 cm^2-Kulturflasche ausgesät. Nach Erreichen der Adhärenz wurde der Kulturüberstand verworfen und die Insektenzellen mit Baculoviren in einer MOI von etwa 10 inokuliert, welche die Wahrscheinlichkeit für eine Infektion jeder Zelle stark erhöht. Während der

60-minütigen Infektionszeit wurden die Kulturflaschen in regelmäßigen Abständen geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung des Virus auf die Insektenzellen zu gewährleisten. Anschließend wurde frisches Kulturmedium zugesetzt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von drei Tagen bei 27°C wurde der Kulturüberstand abgenommen und bei 3350 g für 10 min zentrifugiert. Aus dem resultierenden, proteinhaltigen Überstand konnte entweder sofort eine Proteinaufreinigung durchgeführt werden, oder dieser wurde ggf. bei 4°C verwahrt.

Zur Produktion größerer Proteinmengen wurden zusätzlich High-5-Zellen in einer Konzentration von 1-2×10^6 Zellen/ml Kulturmedium (insgesamt 300 ml) in einer Rollerflasche (Greiner Bio-One, Frickenhausen) angesetzt. Die Inokulation mit Baculovirus entsprach dem oben beschriebenen Vorgehen. Nach einer Inkubationszeit von drei Tagen bei ständiger Rotation wurde die Virussuspension in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Nunc) bei 3350 g zentrifugiert und aus dem resultierenden Überstand die Proteine isoliert.

2.2.5 Proteinaufreinigung

Die Aufreinigung der rekombinanten Proteine erfolgte nach dem Prinzip der Affinitätschromatographie, bei welcher man sich die Affinität des zu isolierenden Proteins zu einer bestimmten Substanz zunutze macht. In diesem Fall besaßen die Proteine einen sechsfachen Histidinrest als Liganden (His-Tag), welcher eine hohe Affinität zu Nickel aufweist. In der Nickelagarose konnten rekombinante Proteine folglich über ihre Histidinreste an NTA (*nitrilio-tri-acetic acid*)- ligierte Nickelionen (Ni^{2+}) gebunden werden. Im nächsten Schritt wurde das in einer Propylen-Säule durch die Agarose zurückgehaltene Protein mit Hilfe eines speziellen Puffers eluiert. Dieser enthält Imidazol, welches eine höhere Affinität zu Nickel besitzt als Histidin und folglich die an Histidin gekoppelten Proteine kompetetiv aus der Bindung mit der NTA-Nickelmatrix verdrängt.

Vorgehen: Zunächst wurde der proteinhaltige Überstand gegen Bindungspuffer (5 mM Imidazol, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCL, 1 mM $CaCl_2$, pH 7,9) über Nacht bei 4°C dialysiert, wobei der Imidazol-Zusatz dabei unspezifische Bindungen verhinderte. Die verwendeten Dialyseschläuche (Pierce, Rockford, USA) sind so beschaffen, dass Proteine mit einem Molekulargewicht von >10 kD im Schlauch zurückgehalten werden (*molecular weight cut off*, MWCO = 10), während der größte Teil der kleinmolekularen Mediumbestandteile durch Diffusion gegen Bindungspuffer ausgetauscht wird.

Zur Vorbereitung des Nickelagarosegels wurden pro 300 ml dialysiertem Kulturüberstand 6 ml, 1:2 mit aqua dest verdünnte, Nickelagarose-Suspension (Qiagen) verwendet. Diese wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (Nunc) gefüllt und bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Gelsediment anschließend jeweils zwei Waschschritten mit 50 ml aqua dest unterzogen. Anschließend erfolgten zwei weitere Waschschritte mit 1fachem Bindungspuffer. Nach jedem dieser Waschschritte wurde eine Zentrifugation (300 g, 5 min) durchgeführt. Das Sediment wurde schließlich auf das Volumen der eingesetzten Nickelagarose mit Bindungspuffer aufgefüllt.

Der dialysierte Kulturüberstand wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Nunc) gegeben, mit je 1 ml (1:2 verdünnt mit Bindungspuffer) aufbereiteter Nickelagarose pro Röhrchen versetzt und über Nacht bei 4°C auf dem Taumler inkubiert.

Für die Proteinaufreinigung wurde eine 10 ml-Polypropylensäule (Qiagen) mit einer Fritte versehen und mit Bindungspuffer gespült. Anschließend wurde die Protein-Agarose-Suspension auf die Säule gegeben und die Agarose bis zur vollständigen Sedimentation mit der Fritte aufgefangen. Die fertige Säule wurde mit Bindungspuffer gewaschen. Das über den His-Tag an Ni^{2+}-NTA gebundene Protein wurde nun mit 10 ml Elutionspuffer (0,5 M Imidazol, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCL, 1 mM $CaCl_2$, pH 7,9) von der Festphase gelöst. Das Eluat wurde zunächst fraktioniert gesammelt und die einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE und anschließend Coomassie-Färbung bzw. Westernblot auf Vorhandensein des spezifischen Proteins überprüft.

Proteinenthaltende Fraktionen wurden in Dialysekassetten (Pierce) mit einem *molecular weight cut off* (MWCO) von 10 kD gegen PBS mit 0,5 mM $CaCl_2$ dialysiert, um den Imidazol-Zusatz zu entfernen. Anschließend wurde die Proteinkonzentration nach Lowry bestimmt, das Dialysat zu jeweils 200 µl in Cryo-Tubes (Nunc) aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.2.6 Nachweis der rekombinanten Proteine

2.2.6.1 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Grundprinzip von Elektrophoresen sind elektrische Felder, in denen sich geladene Moleküle entsprechend ihrer Größe und Ladung auftrennen lassen. Die Elektrophorese in Gegenwart von Natrium-Dodecylsulfat (*sodium-dodecyl-sulfate*; *SDS*) wird als SDS-Gelelektrophorese bezeichnet und trennt Proteine entsprechend ihrer Größe in einem elektrischen Feld auf. Trennmedium ist hier eine kleinporige Polyacrylamid-Gelmatrix,

welche einen Widerstand für die zu trennenden Proteine darstellt. Dementsprechend passieren kleine Moleküle das engmaschige Netz schneller als große Proteine. Um diese Trennung weitgehend unabhängig von der Nettoladung der Proteine zu machen, wurde die Substanz Natrium-Dodecylsulfat eingeführt, welche das gesamte Protein mit einer negativen Ladung maskiert und somit dessen individuelle Eigenladung überlagert. Zudem wird das Protein denaturiert, d.h. es verliert seine spezifische Struktur, welche die Wanderung im engmaschigen Gelnetzwerk ebenfalls schwer voraussagbar machen würde.

Für die Gelelektrophorese wurden 12%-ige Gele verwendet. Diese besitzen 10 Taschen, in die jeweils 20 µl einer Probe mittels Mikroliterspritze gefüllt werden konnte. Als Laufpuffer diente Tris/Glycerin/SDS-1fach-Puffer (190 mM Glycin, 24 mM Tris, 0,1% SDS). Die zu untersuchenden Proben wurden mit Laemmli-Puffer versetzt und für 3 min bei 95°C erhitzt. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsmarker (*Precision Plus Protein Dual Color Standart*, Biorad, 10-250 kD) eingesetzt. Da Molekulargewichtsmarker standardisierte Proteinfraktionen definierter Größe enthalten, konnte die Größe der zu untersuchenden Proteine durch den Vergleich der Laufstrecken ermittelt werden. Die Gele wurden entsprechend der Anweisung des Herstellers in die Elektrophorese-Apparatur eingespannt. Es wurden 16 µl der Proteinlösung mit 4 µl 5fach Laemmli-Puffer (10% SDS, 50% Glycerin, 0,4 M Tris, 10% 2-Mercaptoethanol, 0,1% Bromphenolblau) aufgetragen sowie 4 µl des Molekulargewichtsmarkers eingesetzt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im Minigel (10×6 cm) bei 15 mA (0,25 mA/cm^2) etwa 60 min, bis das Bromphenolblau das Gelende erreicht hat. Die im Gel aufgetrennten Proteinfraktionen wurden entweder direkt gefärbt (Coomassie-Blaufärbung) oder auf eine Nitrocellulose-Membran zur Durchführung eines Immunoblots übertragen.

2.2.6.2 Coomassie-Blaufärbung

Um die in der SDS-Page-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine zu visualisieren, wurde eine Färbung mit Coomassie-Blau durchgeführt. Dazu wurden folgende Reagenzien verwendet:

Coomassie-Färbelösung:	**Entfärberlösung :**
1,25 g Coomassie Brilliant Blau	500 ml Methanol
500 ml Methanol	100 ml Eisessig
100 ml Eisessig	400 ml aqua dest
400 ml aqua dest	

Die Polyacrylamid-Gele wurden für 30 min in der Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend bis zu Sichtbarkeit der Proteinbanden für 30-60 min in die Entfärberlösung gelegt. Das Gel mit den sichtbaren Proteinbanden konnte direkt dokumentiert oder zwischen Kunststofffolien eingeschweißt und aufbewahrt werden.

2.2.6.3 Immunoblot (Westernblot)

Das Prinzip dieses Verfahrens besteht darin, die zuvor im Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran zu übertragen (*blotting*). Durch die angelegte Spannung wandern die negativ geladenen Proteine Richtung Anode (zur Membran). Nach Zugabe eines proteinspezifischen Primärantikörpers wird ein enzymmarkiertes anti-Immunglobulin (Sekundärantikörper) eingesetzt, so dass nach Substratzugabe die Proteine als Banden auf der Nitrozellulosemembran detektiert und dokumentiert werden können.

Zuerst wurden nach dem „Sandwich-Prinzip“ vier Filterpapiere (*Whatmanpapier*), das Gel (Kathodenseite), die Nitrozellulosemembran (Schleicher&Schuell, Einbeck) (Anodenseite) und wieder vier Filterpapiere fest und luftblasenfrei übereinander geschichtet. Dieses „Blot-Sandwich“ wurde dann in die Blotting-Kammer eingespannt und bei einer Stromstärke von 140 mA für 90 min in Transferpuffer (25 mM Tris, 190 mM Glycin, 20% Methanol) geblottet (*semidry blotting*). Nach dem Transfer wurde die Membran in Blockierungspuffer (s. Tab. 2.8) für 1 h bei RT blockiert. Das Milchpulver verhindert unspezifische Reaktionen des Antikörpers mit der Membran, indem es potentiell freie Proteinbindungsstellen absättigt. Da die hier verwendeten Proteine einen E-Tag beinhalten, wurde ein spezifischer anti-E-Tag-Antikörper (Amersham, Freiburg) als Primärantikörper zur Proteinerkennung eingesetzt. Dieser wurde mit Blockierungspuffer in einem Verhältnis von 1:1500 verdünnt und die Membran über Nacht unter Kühlung bei 4°C auf dem Taumler inkubiert. In drei aufeinander folgenden Waschschritten mit Waschpuffer (s. Tab. 2.8) für jeweils 10 min, wurde der nichtgebundene Primärantikörper entfernt. Dann wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper, einem mit Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase,* HRP) konjugierten anti-Maus-IgG (DAKO, Hamburg) in einer Verdünnung von 1:2000 mit Blockierungspuffer für 1 h bei RT auf dem Taumler inkubiert. Anschließend wurde der ungebundene Zweitantikörper, wie oben beschrieben, abgewaschen. Der Entwicklungsvorgang erfolgte durch Zugabe von ECL (*Enhanced Chemoluminescence*)-Reagenz (Amersham) bei einminütiger In-

kubationszeit. Daraufhin konnten die Proteinbanden im Geldokumentationssystem detektiert und dokumentiert werden.

2.2.7 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur quantitativen Proteinbestimmung des Dialysats wurde die von Lowry beschriebene Methode in modifizierter Form verwendet. Der eingesetzte Assay (DC Protein Assay, Bio-Rad) basiert auf einem von der Proteinkonzentration abhängigen Farbumschlag, der durch photometrische Messung bestimmt werden konnte. Als Eichgerade diente eine Verdünnungsreihe aus bovinem Serumalbumin (BSA, 1360 µg/ml) als Standardproteinlösung und PBS. Diese Verdünnungen sowie die zu bestimmenden Proben wurden in Zweifachansätzen in die Kavitäten der flachbodigen Mikrotiterplatte (Corning, Acton, USA) pipettiert (je 5 µl pro Vertiefung). Zu jedem Ansatz wurden 25 µl Reagenz A und anschließend 200 µl des Reagenz B hinzu gegeben. Nach 15 minütiger Inkubationszeit erfolgte die photometrische Konzentrationsbestimmung bei 655 nm.

2.3 Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

Das Prinzip des im Folgenden beschriebenen ELISA (*Enzyme-linked-immunosorbent-assay*) beruht auf der Bindung im Serum vorhandener Antikörper (Primärantikörper) an auf einer Mikrotiterplatte immobilisierte Proteine. Ein zweiter enzymgekoppelter Antikörper, gerichtet gegen den konstanten (Fc) Teil des Primärantikörpers, bindet an diesen und initiiert nach Substratzugabe eine starke Farbreaktion. Somit kann die Enzymaktivität und damit die Konzentration des Serumantikörpers photometrisch bestimmt werden.

In dieser Arbeit diente der ELISA dem Nachweis spezifischer IgG-Autoantikörper im Patientenserum, die gegen definierte rekombinante Proteine der extrazellulären Domäne des PV-Antigens Dsg3 (Abb. 1.10) gerichtet waren. Die Versuchsdurchführung erfolgte über drei Tage. Am ersten Tag wurden Mikrotiterplatten (*96-well polystyrene plates*, Corning) mit den in Beschichtungspuffer verdünnten Baculoproteinen (je 50 µl pro *well*) solchermaßen versetzt, dass sich eine Proteinkonzentration von 0,5 µM in jeder Vertiefung ergab. Durch Inkubation bei 4°C über Nacht wurden die Proteine auf der Mikrotiterplatte immobilisiert. Am zweiten Tag wurden die ELISA-Platten zur Elimination ungebundenen Proteins viermalig mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit Blockierungspuffer für ca. 1 h bei RT blockiert (100 µl pro Kavität). Nach Verwer-

fen des Puffers wurden 50 µl der 1:50 mit Blockierungspuffer versetzten Serumproben in jede Vertiefung der Platte gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am dritten Tag erfolgten zunächst vier Waschschritte, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Dann wurde eine Inkubation mit einem HRP-gekoppelten Zweitantikörper (*goat-anti-human-IgG*, DAKO) in einer Verdünnung von 1:5000 in Blockierungspuffer für 1 h bei RT durchgeführt (50 µl pro Kavität). Analog zum Erstantikörper wurde auch der ungebundene Zweitantikörper mit Hilfe von viermaligem Waschen eliminiert. Daraufhin wurden je 50 µl des Entwicklungspuffers in jede Kavität gegeben. Nach ca. 30 min konnte der entstandene Farbumschlag photometrisch bei 405 nm mit dem ELISA-Reader als Extinktion gemessen werden.

Zur Durchführung der Denaturierungsexperimente wurden die rekombinanten Dsg3-Proteine jeweils mit 3 M Urea (Roth) bzw. 10 mM EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid,* Sigma-Aldrich) inkubiert und in Anwesenheit von Urea bzw. EDTA auf die Mikrotiterplatte beschichtet. Im ELISA der mit EDTA vorbehandelten Proteine wurden Puffer ohne Kalziumzusatz verwendet (s. 3.3.5).

Tab. 2.8: Puffer für ELISA und Westernblot

Puffer	Zusammensetzung
PBS (*phosphate buffered saline*)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl , 4,3 mM Na_2HPO_4 , 1,4 mM KH_2PO_4
PBST	PBS mit 0,05% Tween 20 (Bio-Rad)
Beschichtungspuffer	PBS mit 0,5 mM $CaCl_2$ (Merck, Darmstadt)
Waschpuffer	PBST mit 0,5 mM $CaCl_2$ (Merck)
Blockierungspuffer	PBST mit 0,5 mM $CaCl_2$ und 5% fettfreiem Milchpulver (Töpfer)
Phosphat-Citrat Puffer	51,5 ml 0,2 M Na_2HPO_4, 48,5 ml 0,1 M Zitronensäure (Merck)
Substratlösung	100 mg ABTS (Calbiochem) in 100 ml Phosphat-Citrat Puffer
Entwicklungspuffer	1µl Wasserstoffperoxid (30% H_2O_2, Merck) pro 5 ml Substratlösung

2.4 Verwendete Geräte

Tab. 2.9: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Bakterieninkubator Orbital Shaker	Forma Scientific, Waltham, USA
Biofuge 15	Heraeus, Hanau
Blottingkammer	Biometra, Göttingen
ELISA Reader Multiskan Ex mit Multiskan Ascent Software 2.6	Thermo Electron Corporation, Dreieich
Feinwaage	Kern, Balingen
Fluoreszenzmikroskop	Nikon, Düsseldorf
Geldokumentationssystem ChemiSmart 2000	PeqLab, Erlangen
Gelelektrophoresekammer,Mini-Protean3 Dodeca™ Cell	Bio-Rad, München
Gelelektrophoresekammer, Perfect Blue™ Gelystem MaxiM	Peqlab, Erlangen
Lichtmikroskop ID03	Zeiss, Oberkochen
Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau
Mehrkanalpipette	Eppendorf, Hamburg
Multipipette	Eppendorf, Hamburg
Photometer UV-2	Unicam, Kassel
Pipettierhilfe	Becton Dickinson, Heidelberg
Rotator für Rollerflaschen	Ratek, Boronia, Australien
Sterilwerkbank Lamin Air	Heraeus, Hanau
Taumler	Heidolph Instruments, Schwabach
Thermalcycler Touch Down	Thermo Electron Corporation, Dreieich
Vortex Genius 3	IKA, Staufen
Wärmeschrank	Heraeus, Hanau
Wasserbad	GFL, Burgwedel

2.5 Patienten und gesunde Kontrollpersonen

In der vorliegenden Arbeit wurden Seren von 94 PV-Patienten unterschiedlicher klinischer Aktivität, welche in den Dermatologischen Kliniken der Universitäten Marburg, Erlangen und Aachen behandelt wurden, untersucht. Als Kontrollen dienten Seren von 24 freiwilligen, gesunden Personen. Patienten und Freiwillige gaben ihre schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an der Studie, die den Richtlinien der Deklaration von Helsinki entspricht. Die Serumproben wurden vor der Analyse bei -20°C verwahrt.

Die **klinische Diagnose** eines PV wurde wie folgt bestätigt:

1. Typische klinische Präsentation mit fragilen blasenartigen Erosionen an Schleimhaut und Haut
2. Histopathologisch (suprabasale Akantholyse)
3. Direkte Immunfluoreszenz (IgG Ablagerung auf der Oberfläche epidermaler Keratinozyten in periläsionaler Haut)
4. Indirekte Immunfluoreszenz (interzelluläre IgG-Reaktivität zirkulierender Autoimmunantikörper mit Epithelzellen des Affenösophagus)
5. ELISA (Detektion von anti-Dsg3 +/- anti-Dsg1 IgG-Autoantikörper)

Die **Krankheitsaktivität** von PV-Patienten wurde bezüglich der Erkrankungsdauer sowie dem Ausmaß und der Anzahl der Blasen wie folgt definiert:

1. akute Erkrankung (Dauer < 3 Monate, Beteiligung von mehr als 20% der Körperoberfläche mit weit gestreuten, unzählbaren Blasen)
2. chronische Erkrankung (Dauer > 3 Monate, wenige Blasen, die höchstens 20% der Körperoberfläche betreffen)
3. Remission (keine klinischen Symptome seit mehr als einem Monat)

Zusätzlich wurde der **klinische Phänotyp** nach dem bevorzugten Erscheinungsort der Blasen als mukosal (reine Schleimhautbeteiligung), mukokutan (gemischte Haut- und Schleimhautbeteiligung) bzw. kutan (reine Hautbeteiligung) klassifiziert.

Das Ausmaß von Haut- und Schleimhautbeteiligung einzelner PV-Patienten wurde im Beobachtungszeitraum zusätzlich durch ein kürzlich etabliertes Score-System, dem *„Autoimmune bullous skin disorder intensity Score“* (ABSIS) (Pfütze et al., 2007), beurteilt. Hierbei wird das Ausmaß der Hautläsionen durch die 9er Regel bestimmt. Die beteiligte Körperoberfläche (in Prozent) wird mit einem Gewichtungsfaktor multipliziert, der als 1,5 für erosive, bzw. exsudative Läsionen, Blasen und/oder positives Nikolsky-Zeichen, als 1 für erosive, trockene Läsionen sowie als 0,5 für reepithelialisierte Läsionen definiert ist. Die Beteiligung der oralen Mukosa wurde, wie ursprünglich von Saraswat und Kumar beschrieben, bewertet (Saraswat et al., 2003) und in modifizierter Form im ABSIS Mucosa-Score übernommen, welcher eine Spannweite zwischen 0 (keine Läsionen) und 11 (maximales Ausmaß an Läsionen) einschließt.

2.6 Statistische Analyse der ELISA-Ergebnisse

Die Patientenseren wurden in Zweifachansätzen untersucht, d.h. auf einer Mikrotiterplatte wurden zwei gleiche Probenansätze nebeneinander angelegt. Dies diente der Kontrolle und Verifizierung der erhaltenen Ergebnisse. Zur Auswertung wurden die aus den Zweifachansätzen berechneten Mittelwerte eingesetzt.

Die photometrische Bestimmung der Extinktionswerte bei 405 nm erfolgte in ca. zweiminütigen Abständen, bis ein auf jeder ELISA-Platte eingesetztes Referenzserum (Positivkontrolle, PV-Serum mit definierter IgG-Reaktivität gegen die gesamte Dsg3-Ektodomäne) eine OD (optische Dichte) von > 0,8 bis max. 1,0 aufwies. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Extinktionswerte festgelegt und als IgG-Reaktivität der Patientenseren gewertet. Zusätzlich wurde auf jeder ELISA-Platte mindestens eine Serumprobe einer gesunden Person als Negativkontrolle eingesetzt.

Die im Folgenden beschriebene statistische Auswertung der ELISA-Daten wurde unter Anleitung von PD Dr. Hans-Helge Müller, Institut für medizinische Biometrie und Epidemiologie, Universität Marburg durchgeführt. Zur statistischen Analyse wurden die Software Pakete SAS, Version 8.2 und StatXact, Version 6 verwendet (SAS Institute, Cary NC, USA und CYTEL Software Corporation, Cambridge MA, USA).

2.6.1 Bestimmung des Schwellenwertes

Zunächst war es wichtig eine bestimmte OD als angemessenen diagnostischen Schwellenwert zu definieren, um PV-Patienten und Kontrollen korrekt zu klassifizieren. Dieser so genannte *Cut-Off* stellte die Grenze dar, über welcher die IgG-Reaktivität eines Patientenserums als positiv gewertet wurde. Dabei sollte der ELISA größtmögliche Sensitivität und Spezifität aufweisen. Die Sensitivität (Empfindlichkeit) stellt die Wahrscheinlichkeit dar, mit der eine positive Diagnose im Test als positiv klassifiziert wird, während durch die Spezifität eine negative Diagnose im Test als negativ klassifiziert wird.

Zur Bestimmung des *Cut-Off*-Wertes wurde eine ROC (*receiver operating characteristic)*-Kurve für die gesamte extrazelluläre Domäne von Dsg3 (Dsg3EC1-5) erstellt, da PV-Patienten typischerweise IgG-Reaktivität gegen die gesamte Dsg3-Ektodomäne aufweisen. Dazu wurden für verschiedene Referenzwerte (ODs) die korrespondierenden Werte für Spezifität und Sensitivität berechnet und gegeneinander aufgetragen. Die optimale Diskriminanzschwelle wurde an dem Punkt angesetzt, an welchem der *Youden-*

Index (*YI*: Sensitivität+Spezifität-1) nahe 1 ist, weil dann eine maximale Summe von Sensitivität und Spezifität des Tests erreicht wurde. Die Erstellung der ROC-Kurve erfolgte mit Hilfe von SPSS (SPSS Inc., Chicago IL, USA) anhand eines großen Patientenkollektivs (123 PV-Patienten, 40 gesunde Kontrollpersonen) und ergab bei maximalem *YI* einen diagnostischen Schwellenwert von OD 0,376 (Müller et al., 2006). Die dazugehörige Sensitivität und Spezifität wurden jeweils mit 95% Konfidenzintervall (*confidence interval*, CI) nach der Methode von *Blyth-Still-Casella* geschätzt (Blyth and Still et al., 1983, Casella et al., 1986). Der *Cut-Off* von OD 0,376 wurde als Schwellenwert für alle ELISA-Experimente mit Dsg3-Konstrukten festgelegt (Müller et al., 2006).

Die Diagnose PV wird aktuell im ELISA ausschließlich durch den Nachweis von IgG-Autoantikörpern gegen die gesamte Dsg3-Ektodomäne gestellt. Ziel der Arbeit war es, die relative Häufigkeit von IgG-Autoantikörpern gegen die spezifischen Dsg3-Subdomänen in den unterschiedlichen klinischen Stadien von PV-Patienten zu erfassen. Da die Herstellung der im Referenzprotein Dsg3EC1-5 enthaltenen, kurzen rekombinanten Proteine unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen erfolgte, wurde der ermittelte Schwellenwert auch auf diese übertragen

2.6.2 Statistische Analyse

Unterschiede im Ausmaß der IgG-Reaktivität aufgrund einer unterschiedlichen Krankheitsaktivität oder aufgrund eines unterschiedlichen klinischen Phänotyps wurden mit Hilfe des *Fisher-Freeman-Halton*-Tests untersucht. Bei dem gewählten Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ wurden p-Werte ≤ 0.05 im Rahmen einer Hypothesengenerierung als signifikant betrachtet, wobei dann auf eine Adjustierung durch multiples Testen verzichtet wurde.

Für die Analyse der IgG-Titer wurde die Häufigkeitsverteilung der OD-Werte in den Gruppen (PV-Patienten und Kontrollen) sowie in den jeweiligen Untergruppen von PV als *Box-Plot*-Diagramm graphisch präsentiert. Diese Art der schematischen Darstellung ist gut dazu geeignet, mehrere Verteilungen miteinander zu vergleichen. Dabei wird der Kasten (*box*) durch das erste und dritte Quartil (entspricht dem 25. bzw. 75. Perzentil) eingegrenzt, so dass 50% der Werte in diesem Bereich repräsentiert werden. In der Box ist der Median als Linie eingezeichnet. An das obere und untere Ende des Kastens schließen sich die so genannten „Schnurrhaare“ (w*hiskers*) an, welche hier die Spannweite der Werte innerhalb des 1,5 fachen interquartilen Bereichs repräsentierten.

Die außerhalb dieses Bereichs liegenden Extremwerte wurden als separate Punkte abgebildet. Mit Hilfe des nicht-parametrischen *Kruskal-Wallis* Tests wurden deskriptive p-Werte zur Bewertung der Unterschiede innerhalb der einzelnen Subgruppen berechnet.

Auch für die Darstellung der Denaturierungsexperimente wurden *Box-Plots* konstruiert. Um den Effekt der Denaturierung der einzelnen rekombinanten Dsg3-Proteine auf die IgG-Reaktivität von PV-Seren zu erfassen, wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest (*Wilcoxon Signed Rank Test*) verwendet.

3 Ergebnisse

Die aus der vorliegenden Arbeit resultierenden Ergebnisse gehen aus zwei zusammenhängenden experimentellen Bereichen hervor. Zunächst wurden vier verschiedene Bereiche der extrazellulären Domäne von Dsg3 (Dsg3EC2, Dsg3EC3, Dsg3EC4 und Dsg3EC5) in den Baculovirus-Transfervektor pAcGP67EHN kloniert. Diese Subdomänen sowie die gesamte Ektodomäne (Dsg3EC1-5), der NH_2-terminale Bereich (Dsg3EC1) und ein als immundominant beschriebener Anteil des EC1 (Dsg3EC1p, AS 25-88), welche bereits als rekombinante Baculoviren der Arbeitsgruppe zur Verfügung standen, wurden als rekombinante Proteine hergestellt. Im zweiten Teil der Arbeit wurden die exprimierten Proteine als Antigene im ELISA eingesetzt. Ziel war es, die IgG-Reaktivität sowohl eines klinisch gut charakterisierten Kollektivs von PV-Patienten als auch bei einzelnen PV-Patienten im Krankheitsverlauf gegen die definierten Bereiche des extrazellulären Anteils von Dsg3 zu bestimmen. Zusätzlich wurden die rekombinanten Proteine Denaturierungsexperimenten unterzogen, um Aussagen über die Konformationsabhängigkeit der IgG-Autoantikörper-Bindung zu treffen.

3.1 Herstellung der rekombinanten Dsg3-Proteine

3.1.1 Nachweis der amplifizierten Dsg3-Inserts

Zur Klonierung der extrazellulären Bereiche des Dsg3 wurden die DNA-Sequenzen des humanen Dsg3 (Dsg3EC2 (87-227), Dsg3EC3 (184-349), Dsg3EC4 (313-451), Dsg3EC5 (424-566)) mittels PCR amplifiziert. Die virale cDNA der vollständigen Ektodomäne von Dsg3 diente dabei als Template. Die amplifizierte DNA der jeweiligen Subdomänen wurde mit den Restriktionsenzymen BglII und XmaI geschnitten und die Größe der resultierenden Inserts vor und nach den Restriktionsvorgängen per Agarosegelelektrophorese überprüft (Abb. 3.1).

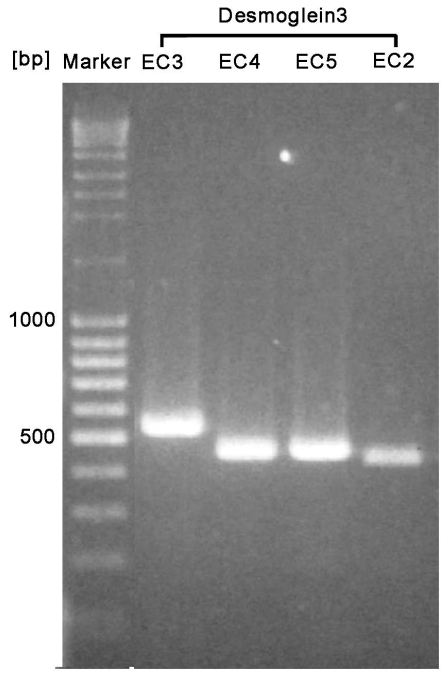


Abb. 3.1: Agarosegelelektrophorese der mittels PCR amplifizierten Desmoglein 3-Inserts

In diesem Agarosegel wurden die PCR-Produkte von Dsg3EC3 (ca. 530 bp), Dsg3EC4 (ca. 450 bp) und Dsg3EC5 (ca. 460 bp) vor dem Restriktionsverdau sowie das bereits geschnittene PCR-Produkt von Dsg3EC2 (432 bp) aufgetrennt und dokumentiert.

3.1.2 Nachweis der in den Baculovirus-Transfervektor klonierten Dsg3-Inserts

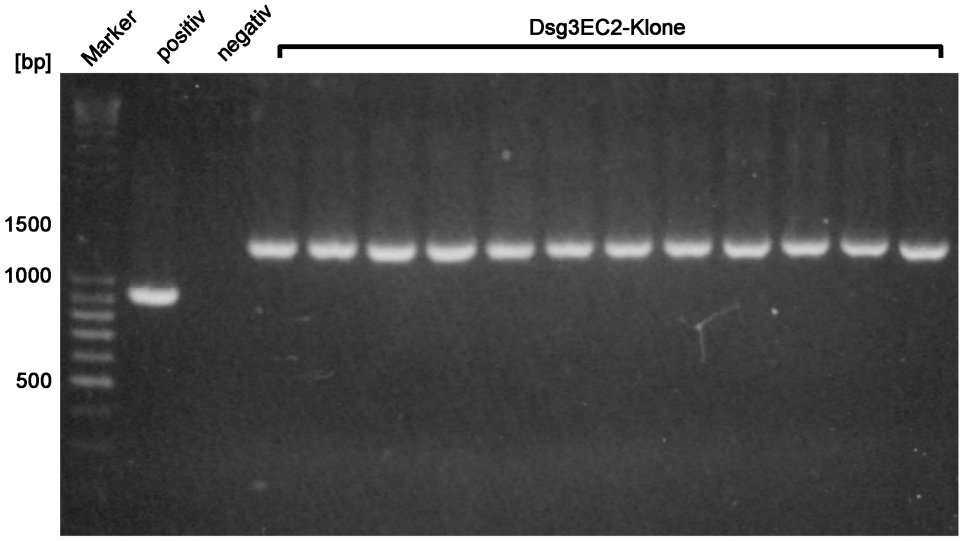


Abb. 3.2: Agarosegelelektrophorese der in den Vektor klonierten Desmoglein 3-Inserts am Beispiel von Dsg3EC2

Beispielhaft wird die Gelelektrophorese der PCR-Produkte verschiedener bakterieller Klone von Dsg3EC2 (1478 bp) gezeigt, welche alle gelelektrophoretisch ein Insert der richtigen Größe aufwiesen. Als Positivkontrolle fungierte der Baculovirus-Transfervektor pAcGP67EHN ohne Insert (946 bp), als Negativkontolle diente aqua dest.

Die amplifizierte und mit den Restriktionsenzymen geschnittene cDNA der jeweiligen Inserts wurde in den modifizierten Baculovirus-Transfervektor pAcGP67EHN mit Hilfe von T4-Ligase ligiert. Anschließend erfolgte die Transfektion und Vermehrung der klonierten Vektoren in *E. coli*. Isolierte Plasmide wurden durch PCR amplifiziert und mittels Gelelektrophorese auf die richtige Größe des Inserts überprüft (Abb. 3.2). Zur Amplifikation wurden Kontrollprimer verwendet, welche 5'- und 3'-flankierend von der in die MCS einklonierten Dsg3-Sequenz binden. Die Nukleotidsequenzen der Inserts ausgewählter bakterieller Klone wurden anschließend durch Sequenzierung überprüft.

3.1.3 Mikroskopischer Nachweis der Transfektion und Virusamplifikation

Nach Kotransfektion der rekombinanten Transfervektoren mit *Baculo-Gold-Bright*-DNA in SF21-Insektenzellen, war es möglich die Infektion der Zellen anhand des koexprimierten GFP (*green fluorescent protein*) unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen. Somit ließ sich in den nachfolgenden Virusamplifikationen die Erhöhung der Anzahl infizierter Zellen überprüfen.

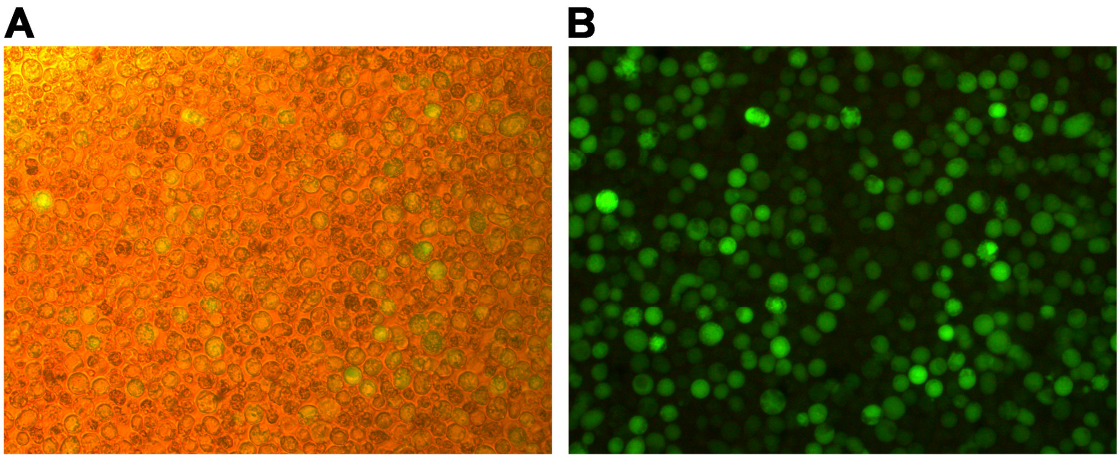


Abb. 3.3 A, B: Darstellung virusinfizierter SF-21-Insektenzellen durch Licht (A)- und Fluoreszenzmikroskopie (B)

SF-21-Insektenzellen, die sich in der zweiten Virusamplifikation mit Dsg3EC2 befanden, wobei licht- und fluoreszenzmikroskopisch (A) sowie rein fluoreszenzmikroskopisch (B) ein vergleichbarer Abschnitt derselben Zellkulturflasche dokumentiert wurde, werden beispielhaft gezeigt. Die grün fluoreszierenden Zellen stellen die virusinfizierten GFP-koexprimierenden SF-21-Zellen dar. Zudem sind infizierte Insektenzellen lichtmikroskopisch durch ihr aufgetriebenes Aussehen gekennzeichnet (A).

3.1.4 Nachweis der Dsg3-Inserts in den infizierten Insektenzellen

Zum Nachweis der Dsg3-Inserts in infizierten Insektenzellen wurde die rekombinante virale DNA mittels *„DNeasy tissue kit“* aus SF-21-Zellen isoliert und anschließend durch PCR mit den Kontrollprimern amplifiziert. Zur Überprüfung der Inserts auf die richtige Größe wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

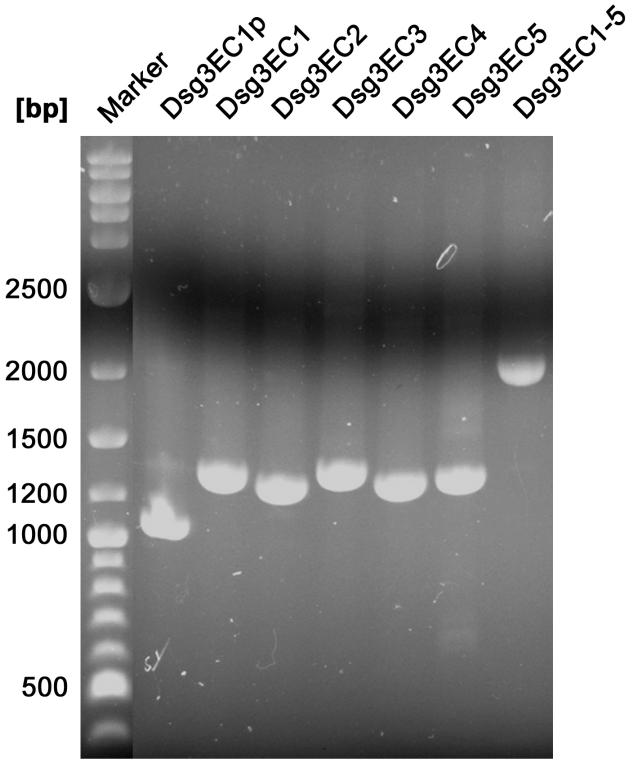


Abb. 3.4: Agarosegelelektrophorese der Desmoglein 3-Inserts nach Isolierung viraler DNA aus infizierten SF-21-Insektenzellen

In der Agarosegelelektrophorese wurde das PCR-Produkt der gesamten Desmoglein 3-Ektodomäne (Dsg3EC1-5) und der einzelnen extrazellulären Desmoglein 3-Subdomänen aufgetrennt und dokumentiert.

3.1.5 Nachweis der rekombinanten Proteine im Westernblot

Die im Baculovirussystem in High-5-Insektenzellen exprimierten rekombinanten Proteine wurden aus Kulturüberständen über Nickelagarose isoliert und aufgereinigt. Mit Hilfe des Westernblot konnten die aufgereinigten Proteine nachgewiesen werden. Hierzu wurden sie elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Nach Inkubation mit einem anti-E-Tag-Antikörper wurde ein mit Meerrettichperoxidase markierter anti-Maus-IgG-Zweitantikörper eingesetzt. Schließlich konnten die Proteine durch Zugabe von ECL-Reagenz im Geldokumentationssystem sichtbar gemacht werden. Die Proteinkonzentration wurde quantitativ durch eine modifizierte Methode nach Lowry photometrisch bestimmt. Dabei wurden Konzentrationen zwischen 100 - 1000 µg/ml erreicht.

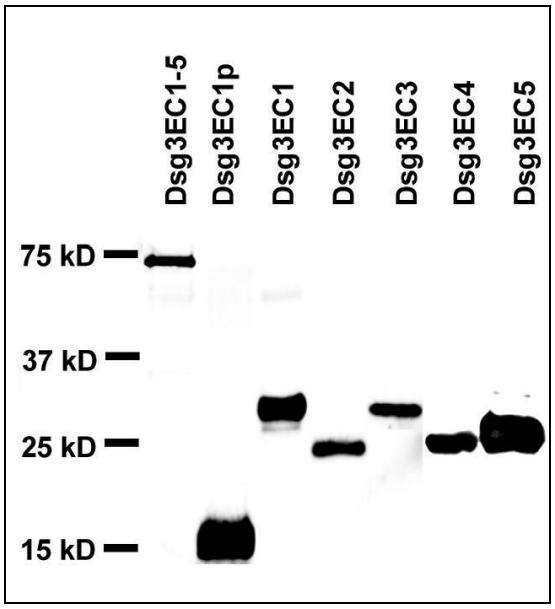


Abb. 3.5: Darstellung der rekombinanten Desmoglein 3-Proteine im Westernblot

Im Westernblot wiesen die rekombinanten Baculoproteine das erwartete Molekulargewicht von 73,2 kD (Dsg3EC1-5), 15,8 kD (Dsg3EC1p), 26,6 kD (Dsg3EC1), 24,4 kD (Dsg3EC2), 27,7 kD (Dsg3EC3), 24,3 kD (Dsg3EC4) und 24,3 kD (Dsg3EC5) auf.

3.2 Etablierung des ELISA

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die im Baculovirussystem produzierten und anschließend aufgereinigten rekombinanten Proteine im ELISA zur Bestimmung der IgG-Reaktivität von PV-Patientenseren eingesetzt. Die 94 untersuchten Patienten waren hinsichtlich ihrer Krankheitsaktivität und des klinischen Phänotyps gut charakterisiert (s. 2.5). Als Kontrollen dienten Seren von 24 freiwilligen, gesunden Personen. Außerdem wurde das Autoantikörperprofil von zwei repräsentativen PV-Patienten im Krankheitsverlauf bestimmt. Zusätzlich durchgeführte Denaturierungsexperimente mit den rekombinanten Proteinen sollten Aufschluss über die Konformationsabhängigkeit der durch IgG-Autoantikörper erkannten Epitope geben.

Alle untersuchten Serumproben wurden in einer Verdünnung von 1:50 in PBS mit 0,5 mM $CaCl_2$ sowie 5% Milchpulver eingesetzt und in Zweifachansätzen untersucht. Der jeweilige Vergleich der Einzelwerte zeigte in dem hier durchgeführten ELISA eine gute Reproduzierbarkeit der Extinktionswerte.

Der ELISA-Assay mit dem anhand einer ROC-Kurve für die gesamte extrazelluläre Domäne von Dsg3 (Dsg3EC1-5) ermittelten Cut-Off von 0,376 wies eine Sensitivität von 0,8211 (95% CI: 0,7445-0.8809) und eine Spezifität von 1 (95% CI: 0,9222-1,0000) auf. Er wurde als Schwellenwert für alle ELISA-Experimente mit Dsg3-Konstrukten festgelegt, wie bereits in vorhergehenden Arbeiten von Müller et al. beschrieben, wobei OD Werte über dem *Cut-Off* von OD 0,376 als positive IgG-

Reaktivität gegen die rekombinanten Dsg3-Proteine gewertet wurden, diejenigen darunter als keine (negative) Reaktivität (Müller et al., 2006).

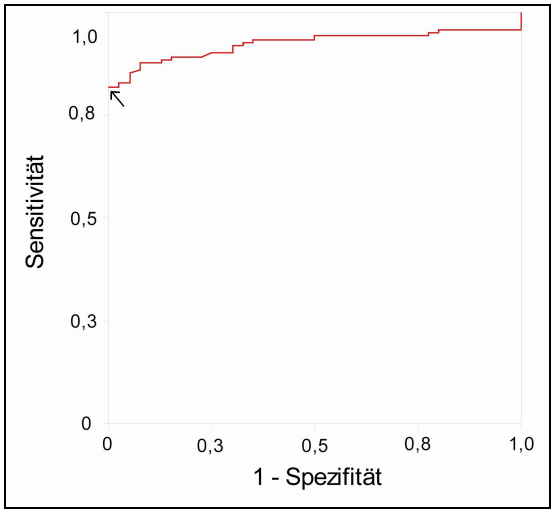


Abb. 3.6: ROC (receiver operating characteristic)-Kurve für Dsg3EC1-5

Für die gesamte extrazelluläre Domäne von Desmoglein 3 (Dsg3EC1-5) wurde eine ROC-Kurve erstellt. Dazu wurden für die verschiedenen Referenzwerte (ODs) die korrespondierenden Werte für Spezifität und Sensitivität berechnet und gegeneinander aufgetragen.

3.3 Auswertung der ELISA-Ergebnisse

3.3.1 IgG-Reaktivität von PV-Seren mit den rekombinanten Dsg3-Proteinen

Basierend auf einem *Cut-Off*-Wert von OD > 0,376 ließen sich bei insgesamt 91% der PV-Patienten IgG-Antikörper gegen die gesamte Dsg3-Ektodomäne (Dsg3EC1-5) sowie in 50% aller untersuchten Seren Antikörper gegen den NH_2-Terminus (Dsg3EC1) nachweisen. Nur 7% der PV-Patienten reagierten mit dem kurzen NH_2-terminalen Fragment, Dsg3EC1p. Insgesamt 26% der Seren zeigten IgG-Reaktivität mit der Subdomäne Dsg3EC2, 15% mit Dsg3EC3, 21% mit Dsg3EC4 sowie 17% mit der COOH-terminalen Dsg3EC5-Domäne (Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Gesamt- IgG-Autoantikörperprofil von Pemphigus vulgaris-Patienten

rekombinante Proteine	**Dsg3EC1-5**	**Dsg3EC1p**	**Dsg3EC1**	**Dsg3EC2**	**Dsg3EC3**	**Dsg3EC4**	**Dsg3EC5**
Total (n=94)	91%	7%	50%	26%	15%	21%	17%

(n) gibt die Anzahl der insgesamt untersuchten Pemphigus vulgaris-Patienten an.

3.3.2 IgG-Reaktivität und IgG-Titer gegen die extrazellulären Dsg3-Domänen unter Berücksichtigung der Krankheitsaktivität

Zunächst sollte das IgG-Autoantikörperprofil der Kohorte von 94 PV-Patienten in Bezug auf die Krankheitsaktivität ausgewertet werden. Dabei befanden sich nach den unter 2.5 definierten Kriterien 39 Patienten im akuten und 42 Patienten im chronischen Stadium sowie 13 in Remission.

Die in Tab. 3.2 dargestellte Auswertung der ELISA-Daten zeigt, dass 97% der PV-Patienten im Akutstadium und 93% der untersuchten Patienten mit chronischer Krankheitsaktivität gegen die gesamte extrazelluläre Domäne von Dsg3 (Dsg3EC1-5) reagierten, während nur 69% der Patienten in Remission eine Autoantikörperantwort aufwiesen. Es ergab sich eine signifikante, direkte Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität der untersuchten PV-Patienten und dem Vorhandensein von IgG-Antikörpern gegen Dsg3EC1-5 im *Fisher-Freeman-Halton*-Test ($p = 0.002876$).

In der Gruppe der PV-Seren, die insgesamt eine IgG-Reaktivität gegen das NH_2-terminale, extrazelluläre Fragment Dsg3EC1 zeigten (50%), ließen sich im Akutstadium bei 49%, in chronischen Krankheitsstadien bei 50% und in Remission bei 54% der Patientenseren IgG-Autoantikörper nachweisen. Hinsichtlich dieser Dsg3-Subdomäne konnte kein signifikanter Unterschied in der IgG-Reaktivität zwischen den einzelnen Krankheitsstadien festgestellt werden ($p = 0.07832$).

Nur eine Minderheit der Seren von Patienten mit klinisch-aktivem PV (d.h. in akuten bzw. chronischen Krankheitsstadien) zeigte eine IgG-Autoantikörperantwort gegen das kurze NH_2-terminale Segment Dsg3EC1p (8% bzw. 10%). Bei in Remission befindlichen Patienten wurde in keiner der getesteten Serumproben eine IgG-Reaktivität gegen Dsg3EC1p nachgewiesen.

Bezüglich Patienten mit akutem bzw. chronischem Krankheitsverlauf konnten unterschiedlich häufig IgG-Autoantikörper gegen die Subdomänen Dsg3EC2 (38% bzw. 21%), Dsg3EC3 (21% bzw. 14%), Dsg3EC4 (26% bzw. 24%) und Dsg3EC5 (21% bzw. 14%) im ELISA detektiert werden. Bei rückläufiger Krankheitsaktivität wurde keine Autoantikörperantwort gegen die extrazellulären Bereiche Dsg3EC2, Dsg3EC3 und Dsg3EC4 mehr nachgewiesen, während eine IgG-Reaktivität gegen Dsg3EC5 immer noch in 17% der Seren vorhanden war. Insgesamt konnten signifikante Unterschiede, bezüglich der IgG-Reaktivität gegen die rekombinanten Proteine Dsg3EC2 ($p = 0.0007662$), Dsg3EC3 ($p = 0.01852$) und Dsg3EC4 ($p = 0.006924$), zwischen den drei analysierten Krankheitsstadien aufgezeigt werden.

Tab. 3.2: IgG-Autoantikörperprofil in den verschiedenen Krankheitsstadien von Pemphigus vulgaris-Patienten

Krankheitsstadium	Dsg3EC1-5	Dsg3EC1p	Dsg3EC1	Dsg3EC2	Dsg3EC3	Dsg3EC4	Dsg3EC5
Akut (n=39)	97%	8%	49%	38%	21%	26%	21%
Chronisch (n=42)	93%	10%	50%	21%	14%	24%	14%
Remission (n=13)	69%	0%	54%	0%	0%	0%	15%
p-Wert	0.002876	0.09994	0.07832	0.0007662	0.01852	0.006924	0.1097
Total (n=94)	*91%*	*7%*	*50%*	*26%*	*15%*	*21%*	*17%*

Dargestellt ist der prozentuale Anteil von Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten in den Krankheitsstadien akut, chronisch und Remission, welche jeweils im ELISA eine IgG-Reaktivität (OD > 0,376) gegen die gesamte extrazelluläre Domäne von Desmoglein 3 (Dsg3EC1-5) bzw. gegen die einzelnen Subdomänen Dsg3EC1p, Dsg3EC1, Dsg3EC2, Dsg3EC3, Dsg3EC4 und Dsg3EC5 aufwiesen. (n) gibt die Anzahl der untersuchten PV-Patienten insgesamt (Total), bzw. innerhalb der einzelnen Krankheitsstadien an. p-Werte ≤ 0.05 weisen auf einen im *Fisher-Freeman-Halton*-Test statistisch signifikanten Unterschied in der IgG-Reaktivität zwischen den Subgruppen (Krankheitsstadien) hin.

Ein zusätzliches Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die IgG-Titer der PV-Patienten unterschiedlicher Krankheitsaktivität gegen die spezifischen Dsg3-Domänen anhand der im ELISA ermittelten OD-Werte, zu analysieren. Dazu erfolgte eine deskriptive Darstellung der IgG-Reaktivität im *Box-Plot*-Diagramm (Abb. 3.7). Mit Hilfe des nicht-parametrischen *Kruskal-Wallis*-Tests wurden p-Werte zur Erfassung der Unterschiede innerhalb der einzelnen Subgruppen berechnet.

Es ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen den IgG-Titern gegen Dsg3EC1-5 und der Krankheitsaktivität untersuchter PV-Patienten (p = 0,02502), was sich in einer Abnahme der OD-Werte (bzw. der IgG-Antikörper Titer) von akuter über chronische Erkrankung bis zur Remission zeigte. Dagegen konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der IgG-Titer gegen die kurzen rekombinanten Proteine Dsg3EC1p (p = 0.2025), Dsg3EC1 (p = 0.8519), Dsg3EC2 (p = 0.4891), Dsg3EC3 (p = 0.2991), Dsg3EC4 (p = 0.2376) und Dsg3EC5 (p = 0.5714) in den verschiedenen Krankheitsstadien aufgezeigt werden. Trotzdem schien das Vorhandensein von Autoantikörpern gegen diese Subdomänen im Krankheitsverlauf von aktivem zu rückläufigem PV tendenziell abzunehmen. Die OD-Werte und somit die IgG-Titer gegen Dsg3EC1p, Dsg3EC2, Dsg3EC3 und Dsg3EC4 aller untersuchten PV-Seren in Remission waren niedriger als der *Cut-Off*.

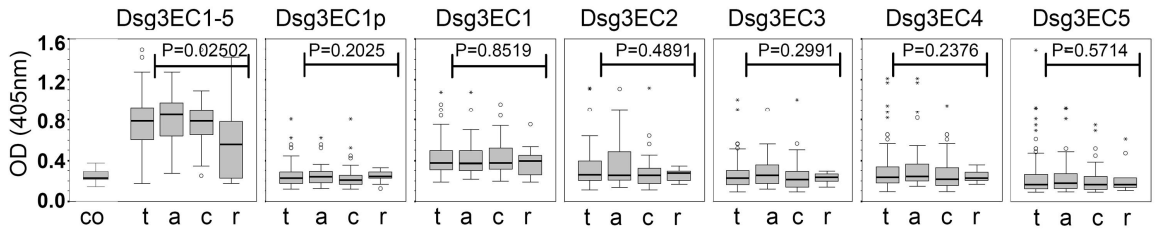


Abb. 3.7: IgG-Titer in den verschiedenen Krankheitsstadien von Pemphigus vulgaris-Patienten

Das *Box-Plot*-Diagramm visualisiert die IgG-Titer der Seren von Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten unterschiedlicher Krankheitsaktivität (total (t), akut (a), chronisch (c) und remittierend (r)) und der Seren gesunder Kontrollpersonen (*control* (co)) gegen die definierten extrazellulären Desmoglein 3 (Dsg3)-Domänen. Die Seren wurden mittels ELISA analysiert und die jeweiligen ODs, welche die Antikörpertiter repräsentieren, als *Box-Plot* wiedergegeben. Dabei stellt die Box erste und dritte Quartilen dar und der Median wird als Linie gezeigt. Die „*Whiskers*" repräsentieren die Spannweite der Werte innerhalb des 1,5 fachen interquartilen Bereichs und Ausreißer außerhalb der *Whiskers* werden als Punkte abgebildet. p-Werte ≤ 0.05 weisen auf eine statistisch signifikante Korrelation im *Kruskal-Wallis*-Test hin.

3.3.3 IgG-Reaktivität und IgG-Titer gegen die extrazellulären Dsg3-Domänen unter Berücksichtigung des klinischen Phänotyps

Analog zum Vorgehen bei der Krankheitsaktivität wurde die IgG-Autoantikörperantwort von PV-Patienten hinsichtlich des klinischen Phänotyps untersucht. Die 94 Patienten waren anhand der unter 2.5 aufgeführten Kriterien in Subgruppen mit vornehmlich mukosalen (n = 21), mukokutanen (n = 62) sowie kutanen Läsionen (n = 11) unterteilt.

Eine IgG-Autoantikörperreaktion gegen die gesamte Dsg3-Ektodomäne, Dsg3EC1-5, konnte in 95% der Seren von Patienten mit alleiniger Krankheitsmanifestation im Bereich der Schleimhäute und 94% der Seren von Patienten mit mukokutanem PV nachgewiesen werden, während nur 73% der Patienten mit reiner Hautbeteiligung reagierten (Tab. 3.3). Im *Fisher-Freeman-Halton*-Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem Vorhandensein von IgG gegen Dsg3EC1-5 und dem klinischen Erscheinungsbild ($p = 0.01736$).

Darüber hinaus ließ sich auch bezüglich der NH_2-terminalen Domäne, Dsg3EC1, eine statistische Korrelation zwischen der Präsenz von IgG-Autoantikörpern und dem klinischen Phänotyp bestätigen ($p = 0.004172$). 43% bzw. 58% (mukosale bzw. mukokutane Ausprägung von Läsionen) der PV-Patienten zeigten sich dabei spezifisch IgG-

reaktiv gegen Dsg3EC1, während bei reiner Hautmanifestation nur noch bei 18% der Seren Antikörper nachweisbar waren. Nur eine Minderheit der Seren von Patienten mit aktivem Krankheitsbild (d.h. mukosaler (14%) und mukokutaner (6%) Phänotyp) wiesen eine Autoantikörperantwort gegen das kurze NH_2-terminale Segment Dsg3EC1p auf. Sobald eine reine Hautbeteiligung vorherrschte, ließ sich keine IgG-Reaktivität mehr nachweisen. Obwohl kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der IgG-Reaktivität gegen Dsg3EC1p innerhalb der drei Subgruppen festgestellt werden konnte ($p = 0.07248$), scheinen Antikörper gegen Dsg3EC1p im Krankheitsverlauf tendenziell in ähnlichen Anteilen vorhanden zu sein wie IgG gegen Dsg3EC1.

Die IgG-Reaktivität gegen die rekombinanten Proteine Dsg3EC2, Dsg3EC3, Dsg3EC4 und Dsg3EC5 lag in Bezug auf die mukosale bzw. mukokutane Beteiligung bei 29% bzw. 27% (Dsg3EC2), 14% bzw. 18% (Dsg3EC3), 14% bzw. 26% (Dsg3EC4) sowie 10% bzw. 19% (Dsg3EC5). Bei Patienten mit vorwiegenden Hauterscheinungen war die Autoantikörperantwort gegen alle Subdomänen, mit Ausnahme von Dsg3EC5, signifikant reduziert. Dabei ließen sich signifikante Unterschiede beim Nachweis von IgG gegen Dsg3EC1 ($p = 0.004172$), Dsg3EC2 ($p = 0.03018$), Dsg3EC3 ($p = 0.03879$) und Dsg3EC4 ($p = 0.0296$), zwischen vorwiegender Schleimhaut- gegenüber reiner Hautmanifestation feststellen. Dagegen korrelierte die IgG-Reaktivität mit Dsg3EC5 in Bezug auf die verschiedenen Phänotypen nicht signifikant ($p = 0.05437$).

Tab. 3.3: IgG-Autoantikörperprofil bei den verschiedenen klinischen Phänotypen von Pemphigus vulgaris-Patienten

Klinischer Phänotyp	Dsg3EC1-5	Dsg3EC1p	Dsg3EC1	Dsg3EC2	Dsg3EC3	Dsg3EC4	Dsg3EC5
mukosal (n=21)	95%	14%	43%	29%	14%	14%	10%
mukokutan (n=62)	94%	6%	58%	27%	18%	26%	19%
kutan (n=11)	73%	0%	18%	9%	0%	9%	18%
p-Wert	0.01736	0.07248	0.004172	0.03018	0.03879	0.0296	0.05437
Total (n=94)	*91%*	*7%*	*50%*	*26%*	*15%*	*21%*	*17%*

Dargestellt ist der prozentuale Anteil von PV-Patienten, welche jeweils eine mukosale, mukokutane bzw. kutane Hautbeteiligung aufwiesen und im ELISA eine IgG-Reaktivität (OD > 0,376) gegen die spezifischen, rekombinanten Dsg3-Proteine zeigten.

Analog zu dem unter 3.3.2 beschriebenen Verfahren für die unterschiedlichen Krankheitsstadien sollten auch die verschiedenen phänotypischen Ausprägungen des PV

hinsichtlich einer Differenz der IgG-Autoantikörper-Titer untersucht werden. Wie im *Box-Plot*-Diagramm (Abb. 3.8) dargestellt, zeigte die Analyse der IgG-Titer mit Hilfe des *Kruskal-Wallis*-Tests teilweise vergleichbare Ergebnisse mit der Auswertung der IgG-Reaktivität in Tab. 3.3. Die IgG-Titer gegen Dsg3EC1-5 schienen bei Patienten mit reiner Hautmanifestation der Effloreszenzen tendenziell niedriger zu sein als bei Patienten mit einer schleimhautbetonten Ausprägung der Läsionen, dies ließ sich jedoch statistisch nicht belegen (p = 0.1132). Weiterhin konnte weder bezüglich des kurzen NH_2-terminalen Fragments, Dsg3EC1p (p = 0.1605), noch hinsichtlich Dsg3EC2 (p = 0.06835) eine signifikante Korrelation zwischen IgG-Titer und klinischem Phänotyp nachwiesen werden. Im Gegensatz dazu war die Höhe der IgG-Titer gegen Dsg3EC1 (p = 0.01545), Dsg3EC3 (p = 0.01511), Dsg3EC4 (p = 0.03009) und Dsg3EC5 (p = 0.02972) zwischen vorwiegend mukosalem und überwiegend kutanem Phänotyp signifikant unterschiedlich (Abb. 3.8).

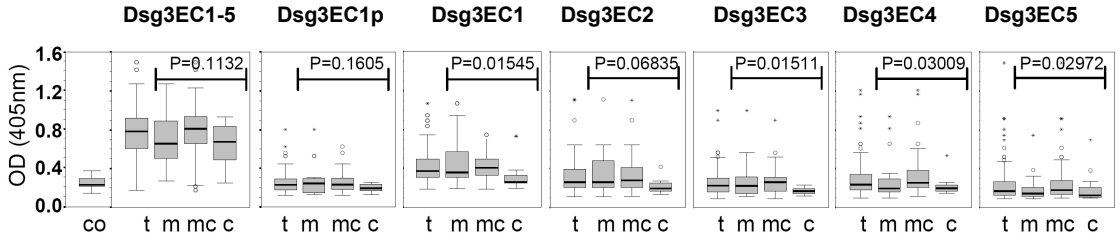


Abb. 3.8: IgG-Titer bei den verschiedenen klinischen Phänotypen von Pemphigus vulgaris-Patienten

Das *Box-Plot*-Diagramm visualisiert, analog zur Darstellung in Abb. 3.7, die IgG-Reaktivität der Seren von Pemphigus vulgaris-Patienten unterschiedlichen Phänotyps (mukosal (m), mukokutan (mc), kutan (c)) gegen die rekombinanten extrazellulären Desmoglein 3-Proteine.

3.3.4 IgG-Autoantikörperprofil einzelner PV-Patienten im Krankheitsverlauf

Zusätzlich zur Analyse des IgG-Autoantikörperprofils am Gesamtkollektiv wurden die IgG-Titer der Seren zweier PV-Patienten gegen spezifische extrazelluläre Dsg3-Domänen im klinischen Verlauf untersucht. Dabei sollten individuelle, domänenspezifische Titerschwankungen in Relation zur Krankheitsaktivität mittels ELISA erfasst werden. Die klinische Aktivität der zwei beschriebenen, repräsentativen PV-Patienten wurde, wie unter 2.5 angegeben, mittels *ABSIS-Score* beschrieben.

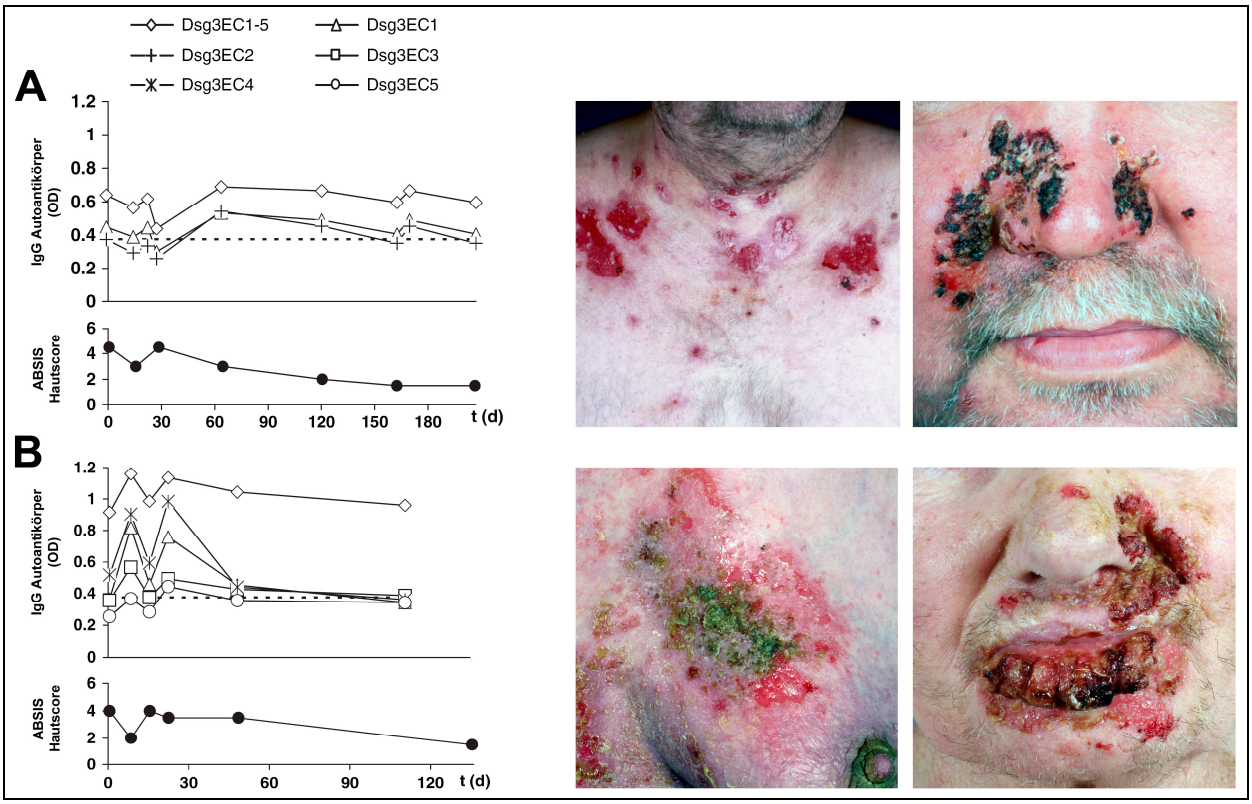


Abb. 3.9 A, B: IgG-Autoantikörperprofil repräsentativer Pemphigus vulgaris-Patienten gegen extrazelluläre Desmoglein 3-Domänen im klinischen Verlauf

Die jeweilig oberen Liniendiagramme zeigen die IgG-Titer (OD) von zwei ausgewählten Pemphigus vulgaris-Patienten (A, B) gegen extrazelluläre Desmoglein 3-Domänen im Krankheitsverlauf, welcher als *ABSIS-Hautscore* in den jeweilig unteren Diagrammen dargestellt wird. Dabei repräsentieren hohe Scorewerte eine ausgeprägte Krankheitsaktivität. Der Beobachtungszeitraum ist in Tagen (d) angegeben. Es werden jeweils nur die Subdomänen aufgeführt, die von patientenspezifischen IgG-Antikörpern erkannt wurden, wobei im ELISA eine Extinktion oberhalb des *Cut-Off* von OD > 0,376 (gestrichelte Linie) gemessen wurde. Neben dem korrespondierenden Liniendiagramm positionierte klinische Bilder zeigen einen Brust- bzw. Gesichtsausschnitt der PV-Patienten vor Therapieeinleitung und wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Hertl, Dermatologische Universitätsklinik, Marburg zur Verfügung gestellt.

PV-Patient „A“ mit mukokutanem PV zeigte insgesamt eine, durch fallenden *ABSIS-Score* repräsentierte, allmähliche Rückläufigkeit der Hautläsionen infolge der Behandlung mit dem monoklonalen, anti-CD20-Antikörper Rituximab, welcher zwischen Tag 0 und Tag 32 verabreicht wurde. Dies war begleitet von einem Abfall des IgG-Titers gegen die NH_2-terminalen, rekombinanten Proteine Dsg3EC1 und Dsg3EC2 unter den *Cut-Off*, während die IgG-Titer gegen die gesamte extrazelluläre Domäne des Dsg3 annähernd unverändert blieben. Im Detail folgte einem kurzfristigen Wiederanstieg des *ABSIS-Score* (d 15-28) verzögert auch eine Zunahme der IgG-Reaktivität gegen die o.g.

Dsg3-Domänen (d 28-64), wobei Antikörpertiter gegen die NH_2-terminalen Domänen wieder über dem *Cut-Off* nachzuweisen waren. Infolge klinischer Verbesserung der Hautläsionen (fallender *ABSIS-Score* ab d 28) konnten nach dem 64. Tag des Beobachtungszeitraums auch wieder nahezu konstant regrediente IgG-Autoantikörpertiter verzeichnet werden (Abb. 3.9, A).

PV-Patient „B“ mit chronisch-mukokutaner Erkrankung zeigte ebenso einen Rückgang der kutanen Erosionen durch den therapeutischen Effekt von Rituximab zwischen Tag 0 und Tag 32. Auch hier wurde dies begleitet von einer verzögerten Reduktion der IgG-Titer gegen Dsg3EC1 und zusätzliche extrazelluläre Dsg3-Subdomänen, wie Dsg3EC3, Dsg3EC4 und Dsg3EC5. Einem kurzfristigen Anstieg im *ABSIS-Score* (d 8-15) folgte, wie auch im Verlauf von Patient A beobachtet, wiederum eine Zunahme der IgG-Reaktivität gegen die spezifischen Dsg3-Domänen mit zeitlicher Verzögerung (d 15-22). Die kontinuierlich regrediente klinische PV-Aktivität ab d 15 wurde von einer raschen Reduktion des Autoantikörpertiters gegen die Dsg3-Subdomänen (v.a. Dsg3EC1 und Dsg3EC4) ab d 22 begleitet, während die IgG-Reaktivität gegen die gesamte Ektodomäne (Dsg3EC1-5) im klinischen Verlauf des Patienten nahezu konstant auf hohem Niveau blieb (Abb. 3.9, B).

3.3.5 Untersuchung zur Konformationsabhängigkeit der durch IgG-Autoantikörper erkannten Dsg3-Epitope

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob die Interaktion von PV-spezifischen Autoantikörpern mit Epitopen der extrazellulären Domäne von Dsg3 eine Konformationsabhängigkeit zeigt. Hierzu wurden die rekombinanten Proteine vor ihrem Einsatz im ELISA mit 3 M Harnstoff (Urea) bzw. 10 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) denaturiert. Dabei verursacht eine Vorbehandlung mit Urea durch Zerstörung der Wasserstoffbrückenbindungen eine Proteinentfaltung. EDTA führt durch Chelation von Kalzium (Ca^{2+})-Ionen zu einem Verlust der kalziumabhängigen Konformation der Proteine, ohne diese zu degradieren. Konformationelle Epitope innerhalb der extrazellulären Dsg3-Domänen können nach Denaturierung folglich durch IgG-Autoantikörper in PV-Patientenseren nicht mehr erkannt werden (OD-Abfall), während nicht-konformationelle Epitope immer noch erkannt werden (kein OD-Abfall).

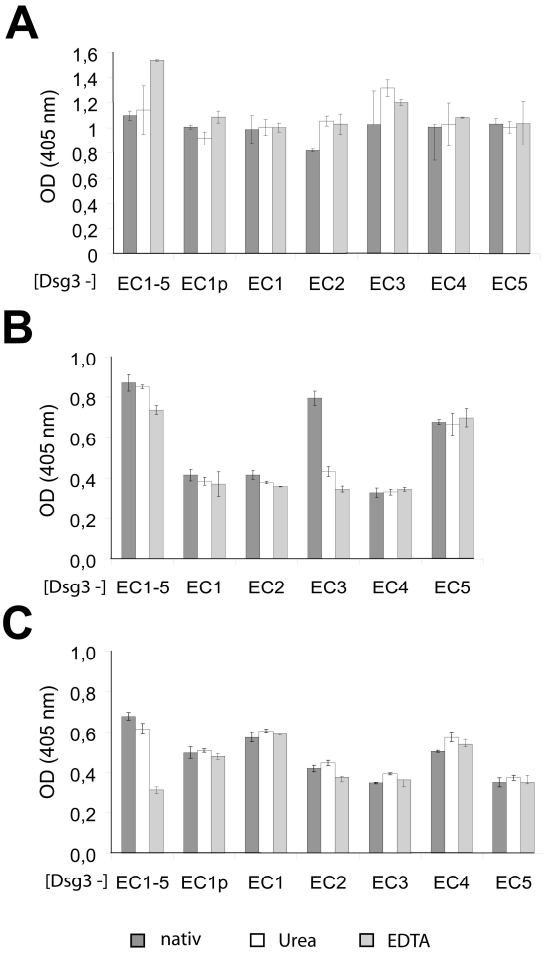


Abb. 3.10 A, B, C: Anti-E-Tag Reaktivität (A) und IgG-Reaktivität einzelner Pemphigus vulgaris-Seren (B, C) gegen native und denaturierte Desmoglein 3-Proteine

Die Balkendiagramme stellen den Effekt der Denaturierung mit 3 M Urea, bzw. 10 mM EDTA auf die nativen rekombinanten Desmoglein 3-Proteine dar. Als Primärantikörper im ELISA wurde im Diagramm A der anti-E-Tag-Antikörper eingesetzt, im Diagramm B und C dienten die IgG-Autoantikörper der Seren von zwei repräsentativen Pemphigus vulgaris-Patienten als Primärantikörper. Die bei der Mehrfachmessung entstandenen Abweichungen sind durch *„Whiskers“* gekennzeichnet.

Zunächst wurde der Effekt der Denaturierung auf die anti-E-Tag-Reaktivität getestet, wobei kein Abfall der jeweiligen OD infolge einer Behandlung mit Urea bzw. EDTA festzustellen war, was darauf hinweist, dass die Denaturierungsvorgänge nicht zur Degradation der rekombinanten Proteine geführt hatten (Abb. 3.10, A). Zusätzlich wurden die Experimente mit Seren von PV-Patienten durchgeführt, um den Effekt der Denaturierung auf die Epitoperkennung durch IgG zu analysieren. Zwei repräsentative Untersuchungen werden hier als Balkendiagramme gezeigt (Abb. 3.10, B, C). Beim ersten Patienten (Abb. 3.10, B) wurde die IgG-Reaktivität gegen die gesamte Dsg3-Ektodomäne (Dsg3EC1-5) durch die Vorbehandlung mit EDTA reduziert (OD-Abfall). Es zeigte sich keine Veränderung hinsichtlich der IgG-Autoantikörperreaktivität gegen die Subdomänen Dsg3EC1, Dsg3EC2, Dsg3EC4 und Dsg3EC5 durch die Denaturierung, was sich im annähernd konstanten Niveau der OD-Werte widerspiegelt. Die IgG-Reaktivität gegen Dsg3EC3 wurde dagegen durch die Vorbehandlung mit Urea und EDTA stark reduziert. Bezüglich des zweiten Patienten (Abb. 3.10, C) zeigte sich eine verminderte IgG-Reaktivität gegen Dsg3EC1-5 infolge der Denaturierungsvorgänge,

während keine Auswirkung auf die IgG-Erkennung der spezifischen Dsg3-Subdomänen nach Präinkubation mit Urea und EDTA nachzuweisen war.

Um den Effekt der Denaturierung auf die IgG-Reaktivität gegen die rekombinanten extrazellulären Dsg3-Proteine hinsichtlich einer statistischen Signifikanz beurteilen zu können, wurden insgesamt 25 Seren von PV-Patienten untersucht, welche alle unter nativen Bedingungen IgG-Reaktivität gegen die gesamte Dsg3-Ektodomäne zeigten (Abb. 3.11).

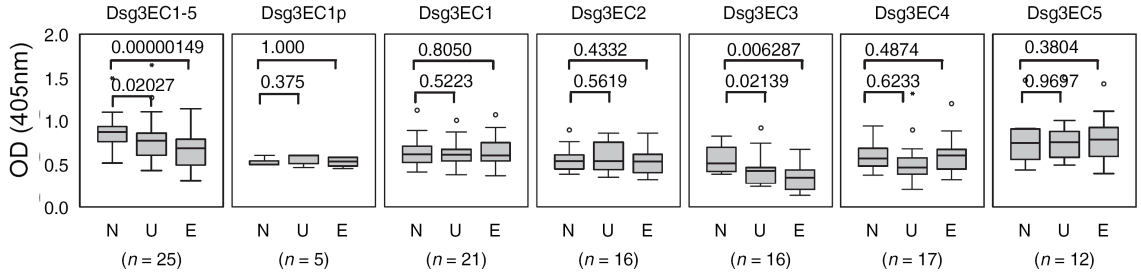


Abb. 3.11: IgG-Titer eines Pemphigus vulgaris-Patientenkollektivs gegen native und denaturierte Desmoglein 3-Proteine

Das *Box-Plot*-Diagramm stellt den Effekt der Denaturierung mit 3M Urea (U) und 10mM EDTA (E) auf die IgG-Reaktivität (OD) nativer rekombinanter Desmoglein 3 (Dsg3)-Proteine (N) dar. Unterschiede zwischen den Subgruppen (nativ-Urea, nativ-EDTA) wurden statistisch mittels *Wilcoxon-Signed-Rank*-Test ausgewertet, wobei $p \leq 0.05$ einen signifikanten Unterschied aufzeigt. (n) bezeichnet die Anzahl untersuchter Seren, die IgG-Reaktivität gegen das jeweilige Protein unter nativen Bedingungen gezeigt haben.

Eine Vorbehandlung von Dsg3EC1-5 mit Urea ($p = 0.02027$) und EDTA ($p = 0.00000149$) reduzierte im ELISA signifikant die IgG-Reaktivität der PV-Seren. Dagegen führte eine Denaturierung von Dsg3EC1p (Urea: $p = 0.375$, EDTA: $p = 1.0$), Dsg3EC1 (Urea: $p = 0.5223$, EDTA: $p = 0.805$), Dsg3EC2 (Urea: $p = 0.5619$, EDTA: $p = 0.4332$), Dsg3EC4 (Urea: $p = 0.6233$, EDTA: $p = 0.4874$) und Dsg3EC5 (Urea: $p = 0.9697$, EDTA: $p = 0.3804$) zu keiner statistisch signifikanten Reduktion der IgG-Reaktivität gegen die jeweiligen Subdomänen. Ähnlich wie bei der gesamten Ektodomäne verursachte auch die Inkubation von Dsg3EC3 mit Urea ($p = 0.02139$) und EDTA ($p = 0.006287$) eine signifikant verminderte IgG-Reaktivität.

4 Diskussion

4.1 Expression der rekombinanten Dsg3-Proteine

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, rekombinante Proteine, welche jeweils definierte Abschnitte der Dsg3-Ektodomäne repräsentieren, im eukaryotischen Baculovirusexpressionssystem für den anschließenden Einsatz im ELISA zu produzieren. Die Voraussetzung dafür wurde von Dr. Masayuki Amagai (Keio-Universität, Japan) geschaffen, welcher das Baculoviruskonstrukt Dsg3EC1-5 zur Verfügung stellte. Die NH_2-terminalen Bereiche Dsg3EC1 und Dsg3EC1p waren ebenfalls bereits als rekombinante Baculoviren in der Arbeitsgruppe vorhanden, während die Subdomänen Dsg3EC2, Dsg3EC3, Dsg3EC4 und Dsg3EC5 zuvor in den Transfervektor kloniert werden mussten. Nach Kotransfektion der Baculovirus-Transfervektoren mit Baculovirus-DNA in Insektenzellen und anschließender Virusamplifikation ließ sich von jedem Protein eine ausreichende Menge für den Einsatz im ELISA exprimieren.

Der Vorteil des eukaryotischen Baculovirusexpressionssystems im Vergleich mit einem prokaryotischen System besteht in der Ausführung posttranslationaler Modifikationen, welche eine mit den Proteinen der eukaryotischen Ursprungszelle vergleichbare Konformation und folglich immunologische Reaktivität gewährleisten (Kidd und Emery, 1993). Studien von Amagai et al. zeigten, dass zwar Baculovirusproteine, welche die gesamte Dsg3-Ektodomäne umfassen, nicht jedoch bakterielle Fusionsproteine, in der Lage waren, pathogene Autoantikörper durch Präadsorption vollständig aus PV-Patientenseren zu eliminieren (Amagai et al., 1992, 1994). Memar und Mitarbeiter konnten ebenso demonstrieren, dass eukaryotisch produzierte, rekombinante Dsg3-Proteine die essentiellen Epitope aufwiesen, um pathogene Autoantikörper, welche Blasen in neonatalen Mäusen induzierten, aus PV-Seren zu adsorbieren (Memar et al., 1996).

4.2 IgG-Reaktivität gegen definierte extrazelluläre Dsg3-Domänen im ELISA

Zum Nachweis von IgG-Autoantikörpern in PV-Patientenseren gegen die definierten rekombinanten Proteine wurde als semiquantitatives Verfahren in dieser Arbeit ELISA gewählt, wobei sich alle Proteine spezifisch immunreaktiv zeigten. Dabei konnte mit dem definierten Schwellenwert von 0,376 OD eine Sensitivität von 82,1% sowie eine Spezifität von 100% erreicht werden. Amagai und Mitarbeiter beschrieben im von ihnen

entwickelten Dsg3-ELISA eine etwas höhere Sensitivität von 97,5% und ähnliche Spezifität von 97,8% (Amagai et al., 1999a). Auch Harman et al. erzielten vergleichbare Ergebnisse mit einer Sensitivität von 95% und einer Spezifität von 98% (Harman et al., 2000). Dsg3- und Dsg1-ELISA stellen etablierte Methoden zum Autoantikörpernachweis dar und werden mittlerweile in der PV-Routinediagnostik verwendet (Amagai et al., 1999a, Harman et al., 2000), wobei das Ausmaß der IgG-Reaktivität mit der Krankheitsaktivität einzelner PV-Patienten korreliert, so dass dieses Verfahren zudem zur individuellen Verlaufsdiagnostik geeignet ist (Ishii et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde der mittels ROC-Kurve für das Referenzprotein Dsg3EC1-5 bestimmte *Cut-Off* auch auf die Dsg3-Subdomänen übertragen, da für diese aufgrund der in PV-Seren nur sporadisch vorkommenden Autoantikörper keine individuellen ROC-Kurven erstellt werden konnten und die Zielsetzung darin bestand, die relative Häufigkeit von IgG-Autoantikörpern gegen die Subdomänen bei Patienten unterschiedlicher klinischer Aktivität zu erfassen (Müller et al., 2006). Die einzelnen Dsg3-Konstrukte sind im Referenzprotein enthalten und wurden unter identischen Bedingungen produziert, so dass eine vergleichbare Reaktivität gewährleistet war.

Ein Ziel nachfolgender Studien könnte darin bestehen, anhand eines größeren Patientenkollektivs individuelle Schwellenwerte für die einzelnen Subdomänen zu definieren, was ggf. zur Optimierung von ELISA-Diagnosekriterien für PV beitragen würde. Zusätzlich wäre die Ermittlung eines Protein-Index-Wertes *(protein index value, PIV)* für jedes der rekombinanten Proteine denkbar. Dieser spiegelt den Autoantikörpertiter als absoluten Wert wider und wird u.a. in kommerziell erwerblichen Dsg-ELISAs (z.B. MESACUP Desmoglein Test „Dsg3“, MBL, Nagoya, Japan) zur Schwellenwertdefinierung herangezogen, wobei er das Vorhandensein einer jeweils proteinspezifischen Positivkontrolle auf jeder Mikrotiterplatte voraussetzt.

In dieser Studie reagierten annähernd alle PV-Patientenseren mit der gesamten extrazellulären Domäne Dsg3EC1-5 (91%) sowie die Hälfte der Seren mit Dsg3EC1, während die anderen Subdomänen zu einem geringeren Anteil (15%-26%) erkannt wurden. Lediglich 7% der Seren zeigten spezifisches IgG gegen Dsg3EC1p (AS 25-88), welches ein kurzes und wahrscheinlich immundominantes Stück der NH_2-terminalen Domäne repräsentiert (Sekiguchi et al., 2001).

Es ist bekannt, dass sich die pathogene Autoantikörperantwort von PV-Patienten hauptsächlich gegen die extrazelluläre Domäne von Dsg3 richtet, wobei die für die homophile Adhäsion von Dsg3 essentielle, aminoterminale Region bereits 1990 von Nose

und Mitarbeitern als immundominantes Epitop identifiziert wurde (Nose et al., 1990; Amagai et al., 1992, 1994). Die Pathogenität der gegen den NH_2-Terminus gerichteten Autoantikörper konnte u.a. im Mausmodell demonstriert werden, in dem monoklonales IgG gegen einen bestimmten Anteil des Aminoterminus von Dsg3 (AS 1-161) suprabasale Akantholyse als typisches histologisches Zeichen für PV in neonatalen Mäusen induzierte (Tsunoda et al., 2003). Dagegen konnte kein PV-spezifischer Phänotyp infolge eines Transfers von Antikörpern, die gegen Epitope außerhalb der NH_2-Domäne gerichtet waren, hervorgerufen werden (Tsunoda et al., 2003).
Erwähnenswerterweise zeigen Ergebnisse von Ohata et al., welche die Reaktivität PV-spezifischer Autoantikörper gegen extra- und intrazelluläre Dsg3-Bereiche untersuchten, dass Epitope nicht ausschließlich im Bereich der Ektodomäne, sondern bei einer geringen Anzahl von PV-Patienten (4/31) auch innerhalb des zytoplasmatischen Anteils von Dsg3 erkannt werden (Ohata et al., 2001).

Ein Nachteil der mittels ELISA durchgeführten Untersuchungen zur Reaktivität domänenspezifischer Autoantikörper beruht auf der im Vergleich zur gesamten Dsg3-Ektodomäne geringen molekularen Größe eingesetzter rekombinanter Proteine. Dies könnte bedingt durch eine inkomplette Proteinfaltung zu einer unvollständigen Repräsentation der ca. 15-30 kD umfassenden Dsg3-Konstrukte innerhalb ihrer Tertiärstruktur geführt haben, so dass eventuell nicht alle durch IgG-Autoantikörper erkannten, konformationsabhängigen Epitope im ELISA erfasst wurden. Zudem ist jeweils ein Anteil der Proteine an die Mikrotiterplatte gebunden, so dass relevante Epitope ggf. teilweise verdeckt und folglich nicht vollständig durch Autoantikörper erkennbar waren. Ein Verfahren, welches die Analyse von Dsg3 in seiner natürlichen Tertiärstruktur erlaubt, ist die Immunopräzipitation. Diese macht sich das Prinzip der Ausfällung von Antigen-Antikörper-Komplexen zunutze und könnte in Kombination mit Westernblot zukünftig eine noch spezifischere Epitopcharakterisierung ermöglichen (Hashimoto et al., 1998).

4.3 IgG-Reaktivität gegen native und denaturierte rekombinante Dsg3-Proteine

Neben der Bestimmung der domänenspezifischen Autoantikörperantwort von PV-Patienten sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob die Interaktion von PV-IgG mit B-Zell-Epitopen im Bereich der spezifischen extrazellulären Domänen jeweils konformationsabhängig und/oder nicht konformationsabhängig ist. Hierzu wurden die rekombinanten Proteine mit Urea (Zerstörung von Wasserstoffbrückenbindungen)

bzw. EDTA (Chelation von Kalziumionen) vor ihrem Einsatz im ELISA denaturiert, so dass sie ihre ursprüngliche Konformation verloren, ohne jedoch zu degradieren. Amagai et al. postulierten, dass die Reaktivität von PV-Autoantikörpern mit Dsg3 von der molekularen, kalziumsensitiven Konformation des Proteins abhängt, indem sie zeigten, dass die Bindungskapazität von PV-IgG an rekombinantes Dsg3 durch Denaturierung des Proteins mit EDTA, Säure, oder Basen verloren geht (Amagai et al., 1995b).

Auch in der vorliegenden Arbeit demonstrieren die ELISA-Daten sowohl einer ausgewählten Kohorte an PV-Patienten als auch individueller PV-Patienten, dass die denaturierende Behandlung der vollständigen Dsg3-Ektodomäne (Dsg3EC1-5) zu einem Abfall der IgG-Reaktiviät in Patientenseren führt, was auf das Vorhandensein konformationeller Epitope schließen lässt. Ähnliche Ergebnisse konnten auch für die extrazelluläre Domäne, Dsg3EC3, erzielt werden. Im Gegensatz dazu ließ sich die IgG-Reaktivität gegen die Subdomänen Dsg3EC1, Dsg3EC1p, Dsg3EC2, Dsg3EC4 und Dsg3EC5 nicht durch die Denaturierungsexperimente beeinflussen, was für eine Erkennung nicht-konformationeller Epitope spricht. Insgesamt scheinen PV-IgG-Autoantikörper in dieser Studie sowohl mit konformationellen als auch mit nicht-konformationellen, antigenen Determinanten innerhalb der Dsg3-Ektodomäne zu reagieren.

Kürzliche Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe weisen ebenso darauf hin, dass nicht-konformationelle Epitope innerhalb des NH_2-Terminus von Dsg3 und Dsg1 durch PV-spezifisches IgG erkannt werden (Müller et al., 2006). Futei et al. konnten in einer Epitopstudie unter Verwendung Domänen-vertauschter (*domain-swapped*) Dsg3/Dsg1-rekombinanter Proteine ferner zeigen, dass die Mehrheit der IgG-Autoantikörper aus PV-Seren mit konformationellen Epitopen im Bereich des NH_2-Terminus (AS 1-161) reagiert. Dieser Ansatz erlaubte eine Analyse der Epitope in ihrer regelrechten Konformation, da diese infolge des Domänenaustauschs innerhalb ihrer Tertiärstruktur untersucht werden konnten (Futei et al., 2000). Vorherige Studien von Amagai et al. demonstrierten, dass im prokaryotischen System hergestellte, rekombinante Dsg3-Proteine durch fehlende posttranslationale Modifikationen nicht die korrekte Konformation des authentischen Dsg3 präsentieren und somit im Gegensatz zu baculovirusproduzierten Proteinen nicht in der Lage waren pathogene Autoantikörper vollständig aus Patientenseren zu eliminieren (Amagai et al., 1992, 1994).

Auch in Hinblick auf die Denaturierungsexperimente könnte die bereits erwähnte, ggf. unvollständig ausgeprägte Tertiärstruktur der kurzen Dsg3-Domänen zu einer in-

kompletten Identifizierung konformationeller Epitope in der vorliegenden Arbeit geführt haben (s. 4.2).

4.4 IgG-Reaktivität und IgG-Titer unter Berücksichtigung der klinischen Aktivität

Die Auswertung der ELISA-Ergebnisse des PV-Patienten-Kollektivs in Hinsicht auf Unterschiede im IgG-Autoantikörperprofil in Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität stellte sich folgendermaßen dar. Bezüglich der klinischen Stadien ergab sich eine signifikante Abnahme der IgG-Reaktivität gegen die gesamte Ektodomäne Dsg3EC1-5 von akuter PV-Manifestation (97%) gegenüber prolongierter Remission (69%). Des Weiteren zeigte sich eine signifikante Reduktion der IgG-Autoantikörperantwort gegen Dsg3EC2, Dsg3EC3 und Dsg3EC4 von akuten Krankheitsverläufen bis zur Remission, in der serologisch keine spezifische Reaktivität gegen diese Dsg3-Subdomänen nachweisbar war. Im Gegensatz dazu ließ sich keine Relation der IgG-Reaktivität mit der NH_2-terminalen Domäne (Dsg3EC1) sowie dem COOH-Terminus (Dsg3EC5) und der klinischen Aktivität nachweisen. Darüber hinaus ergab die Analyse der IgG-Titer, dass diese zwar bezüglich des gesamten extrazellulären Dsg3-Anteils im Krankheitsverlauf signifikant unterschiedlich sind, die Höhe der IgG-Titer gegen die einzelnen Subdomänen jedoch nicht im klinischen Verlauf differiert. Die Auswertung der ELISA-Daten einzelner PV-Patienten unter Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Rituximab wies eine deutliche Assoziation eines aktiven Krankheitsprozesses mit dem Ausmaß der anti-Dsg3EC1-Reaktivität auf. Ferner zeigte auch die Autoantikörperreaktion mit anderen Dsg3-Subdomänen eine, vorwiegend zeitlich verzögerte, Fluktuation mit der im *ABSIS-Score* evaluierten Krankheitsaktivität, während die IgG-Erkennung der gesamten Dsg3-Ektodomäne von der klinischen Aktivität individueller PV-Patienten nahezu unbeeinflusst blieb. Insgesamt war das Vorhandensein von IgG-Autoantikörpern gegen Epitope der NH_2-Domäne ebenso wie gegen Epitope im Bereich von Dsg3EC2, Dsg3EC3 und Dsg3EC4 in dieser Studie mit einem klinisch-aktiven PV assoziiert, während die domänenspezifischen IgG-Titer keine Korrelation mit der Krankheitsaktivität zeigten.

Eine Relation der IgG-Reaktivität gegen die gesamte Dsg3-Ektodomäne im ELISA mit der klinischen Aktivität einzelner PV-Patienten konnte auch von Ishii et al. belegt werden (Ishii et al., 1997). In einer kürzlich durch unsere Arbeitsgruppe veröffentlichten Studie konnten zudem Autoantikörper gegen nicht-konformationelle NH_2-terminale Epitope in Assoziation mit aktiven Krankheitsstadien nachgewiesen werden (Müller et

al., 2006). Die vorliegende Arbeit bietet erste Anhaltspunkte dafür, dass auch nicht-konformationelle Epitope der Subdomänen Dsg3EC2, Dsg3EC3 und Dsg3EC4 in den verschiedenen Krankheitsstadien von PV-Patienten unterschiedlich häufig durch IgG-Autoantikörper erkannt werden.

Bhol und Mitarbeiter konnten in einer *in vitro*-Studie demonstrieren, dass IgG_1- und IgG_4-Autoantikörper von PV-Patienten mit aktiver Erkrankung Epitope innerhalb der EC1- (AS 50-79, Bos1) und EC2- (AS 200-229, Bos6) Domänen erkennen, während Patienten in prolongierter Remission sowie gesunde Träger HLA-prävalenter Klassen ausschließlich IgG_1 gegen EC1 aufweisen. Zusätzliche Experimente an humanen Hautkulturen zeigten, dass hohe EC1- bzw. EC2-spezifische IgG-Titer in der Lage waren eine Akantholyse auszulösen, was die pathogene Potenz der gegen den NH_2-Terminus gerichteten Autoantikörperreaktion unterstreicht (Bhol et al., 1995). Eine kürzlich publizierte Folgestudie, bei welcher eine Serie monoklonaler anti-Dsg3-Antikörper mit Hilfe des aktiven Mausmodells isoliert wurde, machte die Beobachtung, dass der synergistische Effekt allein nicht pathogener Antikörper gegen Regionen außerhalb des NH_2-Terminus einen desmosomalen Adhäsionsverlust infolge gemeinsamer Injektion in Mäuse auslösen kann (Kawasaki et al., 2006). Auch bei der Autoimmundermatose, bullöses Pemphigoid, konnte eine Assoziation zwischen klinischer Krankheitsaktivität und der IgG-Erkennung NH_2- bzw., COOH-terminaler BP180-Domänen nachgewiesen werden, wobei Autoantikörper gegen die aminoterminale Region mutmaßlich pathogen sind (Hofmann et al., 2002).

Eine IgG-Reaktivität gegen ein nicht-konformationelles, vermutlich immundominantes Epitop (Dsg3EC1p, AS 25-88) innerhalb der NH_2-terminalen Region von Dsg3 (Futei et al., 2000; Sekiguchi et al., 2001), wurde nur bei einer Minderheit (7%) der untersuchten PV-Seren detektiert, schien dann aber tendenziell mit der Krankheitsaktivität zu korrelieren. Eine statistische Signifikanz konnte, vermutlich aufgrund der zu geringen Fallzahl, allerdings nicht nachgewiesen werden. Eine kürzlich publizierte Studie identifizierte ein lineares Epitop (AS 49-60) innerhalb der EC1-Domäne mit geringer Redundanz zum humanen Proteom, welches von 100% (10/10) der untersuchten Dsg3-reaktiven PV-Seren erkannt wurde (Lucchese et al., 2006).

Die Auswertung der ELISA-Daten in Hinsicht auf den Phänotyp der untersuchten PV-Patienten ergab, dass 94% bzw. 95% der Seren von PV-Patienten mit alleiniger Schleimhautbeteiligung bzw. mukokutanem Phänotyp IgG-Reaktivität gegen die gesamten Dsg3-Ektodomäne (Dsg3EC1-5) zeigten, während nur 73% der Patienten mit

vorwiegender Hautbeteiligung gegen diese reagierten. Die Analyse der IgG-Reaktivität gegen den NH_2-terminalen Anteil Dsg3EC1, zeigte ferner ein vorwiegendes Vorkommen spezifischer IgG-Autoantikörper bei Patienten mit mukosalem (43%) bzw. mukokutanem (58%) Phänotyp, wogegen nur eine Minderheit der Patienten mit kutanen Läsionen eine Reaktivität aufwies (18%). Analoge Beobachtungen konnten bezüglich der IgG-Reaktivität gegen Dsg3EC2, Dsg3EC3 und Dsg3EC4, jedoch nicht in Hinsicht auf Dsg3EC5 gemacht werden. Die Auswertung der IgG-Titer ergab im Fall von Dsg3EC1, Dsg3EC3, Dsg3EC4 und Dsg3EC5 eine direkte Relation zum Ausmaß der Schleimhautbeteiligung, da diese im Verlauf von mukosalen Läsionen über den mukokutanen PV bis hin zur vorwiegenden Hautbeteiligung signifikant abfielen. Hinsichtlich der Reaktivität gegen Dsg3EC2 konnte dieser Effekt statistisch nicht nachgewiesen werden, man kann jedoch einen tendenziellen Titerabfall im Stadium mit reiner Hautbeteiligung beobachten.

Insgesamt zeigt die Auswertung der Autoantikörperprofile, dass die IgG-Reaktivität mit verschiedenen, vornehmlich aminoterminalen, nicht-konformationellen Epitopen hauptsächlich mit einem schleimhautdominanten Phänotyp assoziiert ist und insgesamt mit der Krankheitsaktivität von PV-Patienten korreliert. Diese Resultate lassen den Rückschluss zu, dass während des „natürlichen Krankheitsverlaufs“ vom mukosalen Phänotyp zur vorwiegend kutanen Beteiligung eine Verschiebung in der Epitop-Erkennung von NH_2-terminalen Bereichen zu anderen antigenen Determinanten der Dsg3-Ektodomäne im Sinne eines „*Epitope Spreading“* stattfindet. Dieses bereits unter 1.3.1 erwähnte Phänomen beschreibt, dass die Immunantwort im Krankheitsverlauf, vermutlich aufgrund stattgehabter Gewebedestruktion, nicht auf das ursprüngliche, krankheitsauslösende Epitop beschränkt bleibt, sondern auf weitere Epitope desselben Proteins (intramolekulares *Epitope Spreading*) bzw. andere Proteine im gleichen Gewebe (intermolekulares *Epitope Spreading*) ausgeweitet wird (Chan et al., 1998). Auch bei anderen Autoimmunerkrankungen wie multiple Sklerose (McRae et al., 1995), Insulinabhängiger Diabetes mellitus (Bonifacio et al., 2000) sowie systemischer Lupus erythematodes (Arbuckle et al., 1999), spielt dieses Immunphänomen eine Rolle. Salato und Mitarbeiter postulierten, dass während des natürlichen klinischen Verlaufs des PV von reiner Schleimhautbeteiligung zum mukokutanen Phänotyp eine Verlagerung in der Epitoperkennung durch Dsg3-reaktive Autoantikörper stattfindet. Im Detail konnten sie zeigen, dass die Mehrheit der Patienten mit schleimhautdominanten PV Serum-IgG gegen COOH-terminale Regionen von Dsg3 aufweist, wobei intramolekulares *Epitope*

Spreading von Anteilen des COOH-Terminus (AS 87-566) zu aminoterminalen Bereichen (AS 1-88) ein kritischer Schritt ist, welcher dem intermolekularen *Epitope Spreading* von Dsg3 zu Dsg1 vorausgeht (Salato et al., 2005). Ihre Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, da hier eine IgG-Reaktivität mit aminoterminalen Epitopen von Dsg3 vorwiegend bei Patienten mit schleimhautdominanten Phänotyp vorgefunden wurde, während eine Autoantikörperantwort gegen den COOH-Terminus auch bei mukokutaner und kutaner Beteiligung nachgewiesen werden konnte. Trotzdem demonstrieren beide Ergebnisse, dass intramolekulares *Epitope Spreading* die klinische Aktivität von PV-Patienten beeinflussen kann und erklären damit, warum PV-Patienten trotz klinischer Remission persistierende Autoantikörperlevel gegen einzelne Subdomänen von Dsg3 aufweisen können.

Darüber hinaus konnte beim PF ein Zusammenhang zwischen intramolekularem *Epitope Spreading* im Bereich des desmosomalen Autoantigens, Dsg1, und dem Krankheitsausbruch der in Brasilien endemischen Erkrankung, Fogo selvagem, beobachtet werden (Li et al., 2003). Li et al. zeigten, dass in präklinischen Stadien hauptsächlich Dsg1-Epitope im Bereich der COOH-terminalen Domäne EC5 erkannt wurden, während der Krankheitsbeginn durch das Auftreten von NH_2-Terminus-spezifischen Autoantikörpern (EC1 und EC2 Domäne) geprägt war. Weiterhin wiesen Seren von endemischen PF-Patienten in Remission eine ausschließlich auf den COOH-Terminus (EC5 Domäne) beschränkte Reaktivität auf. Diese Resultate legen nahe, dass primär nicht pathogene Dsg1-Autoantikörper gegen COOH-terminale Epitope vorhanden sind, wobei als Konsequenz des intramolekularen *Epitope Spreading* schließlich pathogene Autoantikörper gegen die aminoterminalen Domänen gebildet werden, welche zum Ausbruch der Autoimmunkrankheit führen (Li et al., 2003). Analog dazu werden auch in der vorliegenden Arbeit in aktiven Krankheitsstadien primär Autoantikörper gegen den NH_2-Terminus (Dsg3EC1) vorgefunden, während sich kein Unterschied bezüglich des Vorkommens COOH-reaktiver Antikörper (Dsg3EC5) innerhalb der Krankheitsstadien nachweisen lässt.

Das Konzept des gemeinsamen Vorkommens pathogener und nicht pathogener Autoantikörper beim PV wird außerdem in einer vor kurzem veröffentlichten Studie von Payne et al. bestätigt. Unter Verwendung von Antikörper-Phagen-Display *(antibody-phage-display)* konnte eine große Anzahl humaner monoklonaler anti-Dsg-Antikörper in Form einzelsträngiger Fragmente der variablen Region *(single-chain variable-region fragments, scFv*s) aus einem Patienten mit aktiven mukokutanem PV isoliert werden.

Die Injektion dieser Antikörper in neonatale Mäuse identifizierte zwei pathogene *scFvs*, die in der Lage waren eine Blasenbildung mit PV-ähnlicher Histologie hervorzurufen. Weiterhin konnten diese beiden *scFvs,* jedoch nicht die übrigen isolierten Antikörper, eine Zelldissoziation in humanen Keratinozytenkulturen induzieren, was darauf schließen lässt, dass sowohl pathogene als auch nicht pathogene Autoantikörper isoliert worden waren (Payne et al., 2005). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen das Konzept, dass pathogene gegen den NH_2-Terminus gerichtete Autoantikörper zusammen mit IgG gegen andere extrazelluläre Regionen, z.B. Dsg3EC2, Dsg3EC3 und Dsg3EC4, synergistisch den intraepidermalen Adhäsionsverlust bei PV-Patienten auslösen können.

4.5 Ausblick

Die im eukaryotischen System exprimierten definierten Abschnitte der extrazellulären Domäne von Dsg3 wurden im ELISA durch spezifische IgG-Autoantikörper in PV-Patientenseren erkannt. Dabei scheinen sowohl konformationelle als auch nicht-konformationelle Epitope eine Rolle zu spielen, wobei die Autoantikörperreaktivität gegen spezifische, v.a. NH_2-terminale, extrazelluläre Subdomänen mit der Krankheitsaktivität und dem Phänotyp von PV-Patienten korreliert. Der Einsatz dieser rekombinanten Proteine im ELISA könnte somit, zusätzlich zu dem für die gesamte extrazelluläre Dsg3-Domäne entwickelten serologischen *Assay* (Ishii et al., 1997), als verfeinerter prognostischer Marker zur Erfassung der Krankheitsaktivität des PV dienen. Zukünftige Untersuchungen könnten sich außerdem mit der Fragestellung befassen, ob die hier beobachtete Verlagerung der Epitoperkennung innerhalb des extrazellulären Dsg3-Anteils in Abhängigkeit vom Phänotyp auch bei individuellen PV-Patienten im Verlauf nachzuweisen ist.

Weiterführende Versuche zur Reaktivität der IgG-Subklassen (IgG_{1-4}) mit den rekombinanten extrazellulären Dsg3-Domänen im ELISA bzw. Immunoblot könnten zudem die Immunantwort bei dieser schweren Autoimmundermatose noch spezifischer charakterisieren. Vorherige Studien zeigten eine Prävalenz von IgG_4-Autoantikörpern gegen den vollständigen extrazellulären Dsg3-Anteil bei Patienten mit deutlicher Krankheitsaktivität, wogegen in Remission IgG_1 überwog (Bhol et al., 1995). Auch eine Bestimmung der Reaktivität anderer Ig-Klassen (IgA, IgE) gegen die definierten Dsg3-Domänen, wie von Spaeth et al. für die gesamte Ektodomäne gezeigt, wäre denkbar (Spaeth et al., 2001). Eine weitere Einsatzmöglichkeit der für diese Arbeit produzierten

Proteine ist das PV-Mausmodell, welches eine *in vivo*-Charakterisierung der Pathogenese dieser Autoimmunerkrankung erlaubt (Anhalt et al., 1982; Amagai et al., 2000; Eming et al., in Vorbereitung). Darüber hinaus sind Untersuchungen zur Pathogenität epitopspezifischer Dsg3-Autoantikörper im Keratinozyten-Dissoziations-Assay denkbar (Ishii et al., 2005).

Neben diagnostischen Fortschritten könnten die für die vorliegende Arbeit hergestellten rekombinanten Proteine auch zur Optimierung der Therapie beitragen. Die extrakorporale Immunadsorption dient der selektiven Eliminierung zirkulierender, pathogenetischer Antikörper, ohne den für die Plasmapherese typischen Verlust weiterer Plasmakomponenten. In Kombination mit Immunsuppression ist sie bereits als effiziente und nebenwirkungsarme therapeutische Option beim PV erkannt worden (Eming und Hertl, 2006a; Eming et al., 2006b). Die Grundlage für diesen Therapieansatz bieten Experimente von Amagai et al., welche zeigten, dass eine Adsorption von Antikörpern aus PV-Patientenseren durch die gesamte extrazelluläre Domäne von Dsg3 zu einem Pathogenitätsverlust dieser Seren führt (Amagai et al., 1994). Die Verfügbarkeit spezifischer Dsg3-Proteine sowie eine detaillierte Kenntnis über die krankheitsaktivitätsabhängige Erkennung PV-relevanter Epitope könnte mittels antigenspezifischer Immunadsorption zu einer noch gezielteren Eliminierung von Autoantikörpern beitragen.

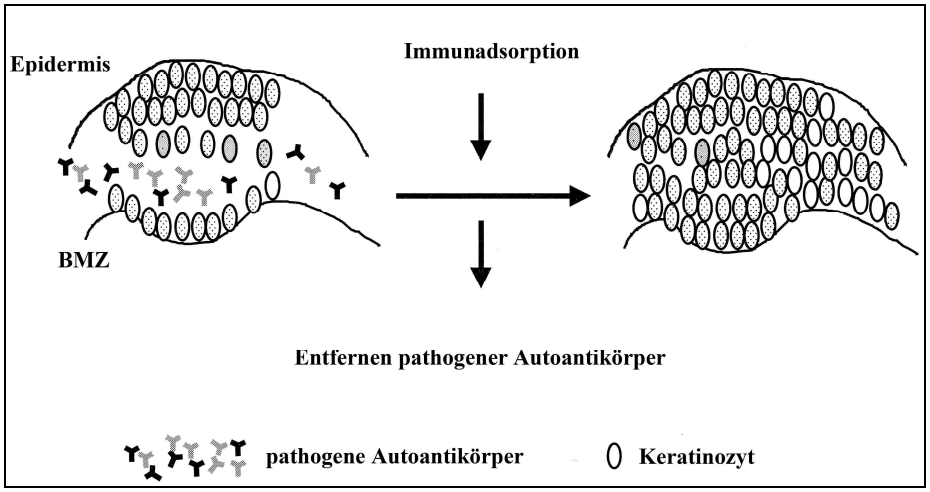


Abb. 4.1: Eliminierung pathogener Autoantikörper durch Immunadsorption

Durch extrakorporale Immunadsorption können zirkulierende, pathogenetische Antikörper selektiv aus peripherem Patientenblut entfernt werden. Dazu erfolgt eine Passage der Plasma-Fraktion über eine mit Protein-A-Sepharose oder Tryptophan- bzw. Penylalanin-PVA (*polyvinyl alcohol*) versehene, Affinitäts-Säule. (BMZ) Basalmembranzone. (nach Hertl, 2001)

5 Zusammenfassung

Der Pemphigus vulgaris (PV) ist eine durch intraepidermale Blasenbildung gekennzeichnete Autoimmundermatose, deren Pathogenese durch die Bildung von Immunglobulin G (IgG)-Autoantikörpern gegen das desmosomale Adhäsionsprotein, Desmoglein 3 (Dsg3), initiiert wird. Vorausgehende Studien zeigten, dass pathogene Autoantikörper vorwiegend konformationelle Epitope innerhalb der aminoterminalen Ektodomäne von Dsg3 erkennen.

Zielsetzung der vorgelegten Arbeit war es, die IgG-Reaktivität der Seren eines klinisch gut charakterisierten Kollektivs an PV-Patienten gegen definierte Bereiche der extrazellulären Domäne von Dsg3 mittels Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) zu analysieren. Weitere Untersuchungen sollten zeigen, ob die Interaktion von PV-spezifischen Autoantikörpern mit Dsg3-Epitopen konformationsabhängig ist.

Eine Voraussetzung für die Durchführung der ELISA-Experimente stellte die Produktion der gesamten Dsg3-Ektodomäne, Dsg3EC1-5, sowie ihrer fünf Subdomänen im Baculovirusexpessionssystem dar. Im Anschluss an die Klonierung der extrazellulären Dsg3-Domänen in einen geeigneten Baculovirustransfervektor erfolgte eine Kotransfektion mit Baculovirus-DNA in Insektenzellen. Nach Amplifizierung des Virus-Titers konnten die rekombinanten Proteine exprimiert und affinitätschromatographisch aufgereinigt werden. Insgesamt wurden eine Kohorte von 94 PV-Patienten, charakterisiert durch die jeweilige Krankheitsaktivität (akut (n=39), chronisch (n=42), Remission (n=13)) und den klinischen Phänotyp (mukosal (n=21), mukokutan (n=62), kutan (n=11)) untersucht. Darüber hinaus erfolgte die Analyse der Seren von zwei einzelnen PV-Patienten im Krankheitsverlauf.

Innerhalb dieser Kohorte zeigten 91 % der Seren IgG-Reaktivität gegen die vollständige extrazelluläre Domäne, während jeweils 15 % bis 50 % der Autoantikörper auch einzelne Dsg3-Subdomänen erkannten. Die IgG-Autoantikörperantwort und IgG-Titer gegen die gesamte Dsg3-Ektodomäne korrelierten dabei mit der Krankheitsaktivität der PV-Patienten. Weiterhin war die IgG-Reaktivität gegen den NH_2-Terminus (Dsg3EC1) im Krankheitsverlauf einzelner PV-Patienten sowie gegen die extrazellulären Domänen Dsg3EC2, Dsg3EC3 und Dsg3EC4 in der Gesamtkohorte mit aktiven Krankheitsstadien des PV assoziiert. Die Autoantikörperantwort gegen die vier NH_2-terminalen Subdomänen wies außerdem eine Assoziation mit einem schleimhautdominanten Phänotyp auf. ELISA-Experimente mit nativen und denaturierten rekombinanten

Dsg3-Proteinen demonstrierten, dass IgG-Autoantikörper aus PV-Seren sowohl mit konformationellen als auch mit nicht-konformationellen Epitopen innerhalb der Dsg3-Ektodomäne reagieren.

Insgesamt zeigte die Auswertung der Autoantikörperprofile, dass die IgG-Reaktivität mit verschiedenen, vornehmlich aminoterminalen, nicht-konformationellen Epitopen hauptsächlich mit einem schleimhautdominanten Phänotyp assoziiert ist und mit der Krankheitsaktivität von PV-Patienten korreliert. Diese Resultate deuten darauf hin, dass während des „natürlichen Krankheitsverlaufs“ beim PV von der mukosalen zur vorwiegend kutanen Manifestation der Läsionen eine Verschiebung der Epitop-Erkennung von NH_2-terminalen Bereichen zu anderen antigenen Determinanten der Dsg3-Ektodomäne stattfindet. Dieses Phänomen des *„Epitope spreading“* wird auch bei anderen Autoimmunkrankheiten beobachtet.

Die Verfügbarkeit der rekombinanten Dsg3-Proteine könnte, anhand einer detaillierten Charakterisierung des Dsg3-Autoantikörperprofils im ELISA, verfeinerte serologische Kriterien zur Erfassung der Krankheitsaktivität von PV-Patienten definieren.

6 Summary

Pemphigus vulgaris (PV) is an autoimmune bullous disease which is characterized by intraepidermal blister formation. It is caused by production of immunoglobulin G (IgG) autoantibodies against the desmosomal adhesion proteins desmoglein 3 (Dsg3) and desmoglein 1 (Dsg1). It has been proposed that pathogenic autoantibodies predominantly recognize conformational epitopes within the aminoterminal ectodomain of Dsg3.

The aim of this study was to analyse IgG reactivity against defined subdomains of the Dsg3 ectodomain in the sera from a cohort of clinically well-characterized PV patients by enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA). Further experiments intended to characterize the interaction of PV autoantibodies with conformational and non-conformational Dsg3 epitopes.

For the establishment of the ELISA assays, the entire ectodomain Dsg3EC1-5 and its five individual subdomains were expressed utilizing a baculovirus system. Cloning of the extracellular Dsg3 domains into a suitable transfer vector was followed by co-transfection with baculovirus DNA into insect cells. Subsequently, the virus titres were amplified and recombinant Dsg3 proteins were expressed and purified by affinity chromatography. A cohort of 94 PV patients was clustered by disease activity, acute (n=39), chronic (n=42), remittend (n=13), and clinical phenotype, mucosal (n=21), mucocutaneous (n=62) and cutaneous (n=11) and their sera were analysed. Furthermore, the course of the disease was followed up serologically in two individual PV patients.

In this cohort, 91 % of the sera showed IgG reactivity against the entire ectodomain, while the IgG recognition of single Dsg3 subdomains ranged between 15 % and 50 %. IgG autoantibody titres reacting with the entire ectodomain correlated with disease activity. Reactivity with the extracellular domains (Dsg3EC2, Dsg3EC3 and Dsg3EC4) and the NH_2-terminus (Dsg3EC1) was related with disease severity in the entire cohort and individual PV patients, respectively. Furthermore, autoantibodies against the four NH_2-terminal subdomains were associated with a mucosal dominant phenotype. ELISA with native and denaturated Dsg3 proteins demonstrated that PV specific IgG reacts with both conformational and non-conformational epitopes within the Dsg3 ectodomain.

The present analysis of IgG autoantibody profiles of the studied PV sera demonstrates that recognition of distinct, preferentially aminoterminal, non-conformational epitopes is generally related to a mucosal dominant phenotype and correlates with the disease activity in PV patients. These findings suggest that during the “natural course” from mucosal dominant to mucocutaneous PV, there may be a shifted epitope recognition of IgG against NH_2-terminal epitopes to other antigenetic determinants of the Dsg3 ecto-domain. This phenomenon, called “epitope spreading”, is consistent with findings in other autoimmune diseases.

The availability of recombinant Dsg3 subdomains may have clinical potential, by defining more refined serological markers and determining patient's Dsg3 autoantibody profile for improved diagnosis.

7 Literatur

1. Abreu-Velez, A. M., Beutner, E. H., Montoya, F., Bollag, W. B., und Hashimoto, T. (2003). Analyses of autoantigens in a new form of endemic pemphigus foliaceus in Colombia. J Am Acad Dermatol *49*, 609-614.

2. Ahmed, A. R., Yunis, E. J., Khatri, K., Wagner, R., Notani, G., Awdeh, Z., und Alper, C. A. (1990). Major histocompatibility complex haplotype studies in Ashkenazi Jewish patients with pemphigus vulgaris. Proc Natl Acad Sci U S A *87*, 7658-7662.

3. Ahmed, A. R., Wagner, R., Khatri, K., Notani, G., Awdeh, Z., Alper, C. A., und Yunis, E. J. (1991). Major histocompatibility complex haplotypes and class II genes in non-Jewish patients with pemphigus vulgaris. Proc Natl Acad Sci U S A *88*, 5056-5060.

4. Ahmed, A. R., Mohimen, A., Yunis, E. J., Mirza, N. M., Kumar, V., Beutner, E. H., und Alper, C. A. (1993). Linkage of pemphigus vulgaris antibody to the major histocompatibility complex in healthy relatives of patients. J Exp Med *177*, 419-424.

5. Amagai, M., Klaus-Kovtun, V., und Stanley, J. R. (1991). Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. Cell *67*, 869-877.

6. Amagai, M., Karpati, S., Prussick, R., Klaus-Kovtun, V., und Stanley, J. R. (1992). Autoantibodies against the amino-terminal cadherin-like binding domain of pemphigus vulgaris antigen are pathogenic. J Clin Invest *90*, 919-926.

7. Amagai, M., Hashimoto, T., Shimizu, N., und Nishikawa, T. (1994). Absorption of pathogenic autoantibodies by the extracellular domain of pemphigus vulgaris antigen (Dsg3) produced by baculovirus. J Clin Invest *94*, 59-67.

8. Amagai, M. (1995). Adhesion molecules. I: Keratinocyte-keratinocyte interactions; cadherins and pemphigus. J Invest Dermatol *104*, 146-152.

9. Amagai, M., Hashimoto, T., Green, K. J., Shimizu, N., und Nishikawa, T. (1995a). Antigen-specific immunoadsorption of pathogenic autoantibodies in pemphigus foliaceus. J Invest Dermatol *104*, 895-901.

10. Amagai, M., Ishii, K., Hashimoto, T., Gamou, S., Shimizu, N., und Nishikawa, T. (1995b). Conformational epitopes of pemphigus antigens (Dsg1 and Dsg3) are calcium dependent and glycosylation independent. J Invest Dermatol *105*, 243-247.

11. Amagai, M., Koch, P. J., Nishikawa, T., und Stanley, J. R. (1996). Pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) is localized in the lower epidermis, the site of blister formation in patients. J Invest Dermatol *106*, 351-355.

12. Amagai, M., Nishikawa, T., Nousari, H. C., Anhalt, G. J., und Hashimoto, T. (1998). Antibodies against desmoglein 3 (pemphigus vulgaris antigen) are present in sera from patients with paraneoplastic pemphigus and cause acantholysis in vivo in neonatal mice. J Clin Invest *102*, 775-782.

13. Amagai, M., Komai, A., Hashimoto, T., Shirakata, Y., Hashimoto, K., Yamada, T., Kitajima, Y., Ohya, K., Iwanami, H., und Nishikawa, T. (1999a). Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3 for serodiagnosis of pemphigus. Br J Dermatol *140*, 351-357.

14. Amagai, M., Tsunoda, K., Zillikens, D., Nagai, T., und Nishikawa, T. (1999b). The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile. J Am Acad Dermatol *40*, 167-170.

15. Amagai, M., Tsunoda, K., Suzuki, H., Nishifuji, K., Koyasu, S., und Nishikawa, T. (2000). Use of autoantigen-knockout mice in developing an active autoimmune disease model for pemphigus. J Clin Invest *105*, 625-631.

16. Amagai, M. (2002). Pemphigus as a paradigm of autoimmunity and cell adhesion. Keio J Med *51*, 133-139.

17. Anhalt, G. J., Labib, R. S., Voorhees, J. J., Beals, T. F., und Diaz, L. A. (1982). Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. N Engl J Med *306*, 1189-1196.

18. Anhalt, G. J., und Diaz, L. A. (1989). In vivo studies of antibody dependent acantholysis. Immunol Ser *46*, 291-316.

19. Aoyama, Y., Owada, M. K., und Kitajima, Y. (1999). A pathogenic autoantibody, pemphigus vulgaris-IgG, induces phosphorylation of desmoglein 3, and its dissociation from plakoglobin in cultured keratinocytes. Eur J Immunol *29*, 2233-2240.

20. Arbuckle, M. R., Reichlin, M., Harley, J. B., und James, J. A. (1999). Shared early autoantibody recognition events in the development of anti-Sm B/B' in human lupus. Scand J Immunol *50*, 447-455.

21. Arin, M. J., und Hunzelmann, N. (2005). Anti-B- cell-directed immunotherapy (rituximab) in the treatment of refractory pemphigus--an update. Eur J Dermatol *15*, 224-230.

22. Arin, M. J., Engert, A., Krieg, T., und Hunzelmann, N. (2005). Anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) in the treatment of pemphigus. Br J Dermatol *153*, 620-625.

23. Bedane, C., Prost, C., Thomine, E., Intrator, L., Joly, P., Caux, F., Blecker, M., Bernard, P., Leboutet, M. J., Tron, F.*, et al.* (1996). Binding of autoantibodies is not restricted to desmosomes in pemphigus vulgaris: comparison of 14 cases of pemphigus vulgaris and 10 cases of pemphigus foliaceus studied by western immunoblot and immunoelectron microscopy. Arch Dermatol Res *288*, 343-352.

24. Beutner, E. H., und Jordon, R. E. (1964). Demonstration of Skin Antibodies in Sera of Pemphigus Vulgaris Patients by Indirect Immunofluorescent Staining. Proc Soc Exp Biol Med *117*, 505-510.

25. Bhol, K., Natarajan, K., Nagarwalla, N., Mohimen, A., Aoki, V., und Ahmed, A. R. (1995). Correlation of peptide specificity and IgG subclass with pathogenic and nonpathogenic autoantibodies in pemphigus vulgaris: a model for autoimmunity. Proc Natl Acad Sci U S A *92*, 5239-5243.

26. Blaschuk, O. W., Sullivan, R., David, S., und Pouliot, Y. (1990). Identification of a cadherin cell adhesion recognition sequence. Dev Biol *139*, 227-229.

27. Blyth, C., Still, H. (1983). Binomial confidence intervals. J Am Stat Assoc *78*, 108-116.

28. Bonifacio, E., Lampasona, V., Bernasconi, L., und Ziegler, A. G. (2000). Maturation of the humoral autoimmune response to epitopes of GAD in preclinical childhood type 1 diabetes. Diabetes *49*, 202-208.

29. Borradori, L., und Sonnenberg, A. (1999). Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. J Invest Dermatol *112*, 411-418.

30. Buxton, R. S., Cowin, P., Franke, W. W., Garrod, D. R., Green, K. J., King, I. A., Koch, P. J., Magee, A. I., Rees, D. A., Stanley, J. R., und et al. (1993). Nomenclature of the desmosomal cadherins. J Cell Biol *121*, 481-483.

31. Bystryn, J. C. (1988). Plasmapheresis therapy of pemphigus. Arch Dermatol *124*, 1702-1704.

32. Caldelari, R., de Bruin, A., Baumann, D., Suter, M. M., Bierkamp, C., Balmer, V., und Müller, E. (2001). A central role for the armadillo protein plakoglobin in the autoimmune disease pemphigus vulgaris. J Cell Biol *153*, 823-834.

33. Campo-Voegeli, A., Muniz, F., Mascaro, J. M., Garcia, F., Casals, M., Arimany, J. L., Amagai, M., und Camps, A. (2002). Neonatal pemphigus vulgaris with extensive mucocutaneous lesions from a mother with oral pemphigus vulgaris. Br J Dermatol *147*, 801-805.

34. Casella, G. (1986). Refining binomial confidence intervals. Can J Stat *14*, 113-129.

35. Chan, L. S., Soong, H. K., Foster, C. S., Hammerberg, C., und Cooper, K. D. (1991). Ocular cicatricial pemphigoid occurring as a sequela of Stevens-Johnson syndrome. Jama *266*, 1543-1546.

36. Chan, L. S., Vanderlugt, C. J., Hashimoto, T., Nishikawa, T., Zone, J. J., Black, M. M., Wojnarowska, F., Stevens, S. R., Chen, M., Fairley, J. A.*, et al.* (1998). Epitope spreading: lessons from autoimmune skin diseases. J Invest Dermatol *110*, 103-109.

37. Cheng, S. W., Kobayashi, M., Kinoshita-Kuroda, K., Tanikawa, A., Amagai, M., und Nishikawa, T. (2002). Monitoring disease activity in pemphigus with enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3. Br J Dermatol *147*, 261-265.

38. Chowdhury, M. M., und Natarajan, S. (1998). Neonatal pemphigus vulgaris associated with mild oral pemphigus vulgaris in the mother during pregnancy. Br J Dermatol *139*, 500-503.

39. Cotterill, J. A., Barker, D. J., und Millard, L. G. (1978). Plasma exchange in the treatment of pemphigus vulgaris. Br J Dermatol *98*, 243.

40. Diaz, L. A., Sampaio, S. A., Rivitti, E. A., Martins, C. R., Cunha, P. R., Lombardi, C., Almeida, F. A., Castro, R. M., Macca, M. L., Lavrado, C., und et al. (1989). Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). I. Clinical features and immunopathology. J Am Acad Dermatol *20*, 657-669.

41. Ding, X., Aoki, V., Mascaro, J. M., Jr., Lopez-Swiderski, A., Diaz, L. A., und Fairley, J. A. (1997). Mucosal and mucocutaneous (generalized) pemphigus vulgaris show distinct autoantibody profiles. J Invest Dermatol *109*, 592-596.

42. Ding, X., Diaz, L. A., Fairley, J. A., Giudice, G. J., und Liu, Z. (1999). The anti-desmoglein 1 autoantibodies in pemphigus vulgaris sera are pathogenic. J Invest Dermatol *112*, 739-743.

43. Drachman, D. B. (1994). Myasthenia gravis. N Engl J Med *330*, 1797-1810.

44. Emery, D. J., Diaz, L. A., Fairley, J. A., Lopez, A., Taylor, A. F., und Giudice, G. J. (1995). Pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris autoantibodies react with the extracellular domain of desmoglein-1. J Invest Dermatol *104*, 323-328.

45. Eming, R., und Hertl, M. (2006a). Immunoadsorption in pemphigus. Autoimmunity 39, 609-616.

46. Eming, R., Rech, J., Barth, S., Kalden, J. R., Schuler, G., Harrer, T. und Hertl, M. (2006b) Prolonged clinical remission of patients with severe pemphigus upon rapid removal of desmoglein-reactive autoantibodies by immunoadsorption. Dermatology 212, 177-187

47. Esaki, C., Seishima, M., Yamada, T., Osada, K., und Kitajima, Y. (1995). Pharmacologic evidence for involvement of phospholipase C in pemphigus IgG-induced inositol 1,4,5-trisphosphate generation, intracellular calcium increase, and plasminogen activator secretion in DJM-1 cells, a squamous cell carcinoma line. J Invest Dermatol *105*, 329-333.

48. Eyre, R. W., und Stanley, J. R. (1988). Identification of pemphigus vulgaris antigen extracted from normal human epidermis and comparison with pemphigus foliaceus antigen. J Clin Invest *81*, 807-812.

49. Feliciani, C., Toto, P., Amerio, P., Pour, S. M., Coscione, G., Shivji, G., Wang, B., und Sauder, D. N. (2000). In vitro and in vivo expression of interleukin-1alpha and tumor necrosis factor-alpha mRNA in pemphigus vulgaris: interleukin-1alpha and tumor necrosis factor-alpha are involved in acantholysis. J Invest Dermatol *114*, 71-77.

50. Futei, Y., Amagai, M., Sekiguchi, M., Nishifuji, K., Fujii, Y., und Nishikawa, T. (2000). Use of domain-swapped molecules for conformational epitope mapping of desmoglein 3 in pemphigus vulgaris. J Invest Dermatol *115*, 829-834.

51. Gemsa, D., Kalden, J.R., und Resch, K. (1997). Immunologie, Grundlagen-Klinik-Praxis, Thieme, Stuttgart

52. Green, K. J., und Jones, J. C. (1996). Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components. Faseb J *10*, 871-881.

53. Harman, K. E., Gratian, M. J., Seed, P. T., Bhogal, B. S., Challacombe, S. J., und Black, M. M. (2000). Diagnosis of pemphigus by ELISA: a critical evaluation of two ELISAs for the detection of antibodies to the major pemphigus antigens, desmoglein 1 and 3. Clin Exp Dermatol *25*, 236-240.

54. Harman, K. E., Seed, P. T., Gratian, M. J., Bhogal, B. S., Challacombe, S. J., und Black, M. M. (2001). The severity of cutaneous and oral pemphigus is related to desmoglein 1 and 3 antibody levels. Br J Dermatol *144*, 775-780.

55. Hashimoto, T., Amagai, M., Watanabe, K., Dmochowski, M., Chidgey, M. A., Yue, K. K., Garrod, D. R., und Nishikawa, T. (1995). A case of pemphigus vulgaris showing reactivity with pemphigus antigens (Dsg1 and Dsg3) and desmocollins. J Invest Dermatol *104*, 541-544.

56. Hashimoto, T., Amagai, M., Ning, W., Nishikawa, T., Karashima, T., Mori, O., Jablonska, S., und Chorzelski, T. P. (1998). Novel non-radioisotope immunoprecipitation studies indicate involvement of pemphigus vulgaris antigen in paraneoplastic pemphigus. J Dermatol Sci *17*, 132-139.

57. Hertl, M., Amagai, M., Sundaram, H., Stanley, J., Ishii, K., und Katz, S. I. (1998a). Recognition of desmoglein 3 by autoreactive T cells in pemphigus vulgaris patients and normals. J Invest Dermatol *110*, 62-66.

58. Hertl, M., Karr, R. W., Amagai, M., und Katz, S. I. (1998b). MHC II restriction pattern of autoreactive desmoglein 3 specific T cell responses in pemphigus vulgaris patients and normals. J Invest Dermatol *110*, 388-392.

59. Hertl, M. (2000). Humoral and cellular autoimmunity in autoimmune bullous skin disorders. Int Arch Allergy Immunol *122*, 91-100.

60. Hertl, M. (2001). Autoimmune diseases of the skin. pathogenesis, diagnosis, management. Springer, Wien

61. Hertl, M., und Schuler, G. (2002a). Bullous autoimmune dermatoses. 1: Classification. Hautarzt *53*, 207-219.

62. Hertl, M., und Schuler, G. (2002b). Bullous autoimmune dermatoses. 3: Diagnosis and therapy. Hautarzt *53*, 352-365.

63. Hertl, M., Eming, R., und Borradori, L. (2007). Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody)--ultimate or first choice in pemphigus? Dermatology *214*, 275-277.

64. Hofmann, S., Thoma-Uszynski, S., Hunziker, T., Bernard, P., Koebnick, C., Stauber, A., Schuler, G., Borradori, L., und Hertl, M. (2002). Severity and phenotype of bullous pemphigoid relate to autoantibody profile against the NH2- and COOH-terminal regions of the BP180 ectodomain. J Invest Dermatol *119*, 1065-1073.

65. Huber, O. (2003). Structure and function of desmosomal proteins and their role in development and disease. Cell Mol Life Sci *60*, 1872-1890.

66. Huilgol, S. C., und Black, M. M. (1995). Management of the immunobullous disorders. II. Pemphigus. Clin Exp Dermatol *20*, 283-293.

67. Hunt, D. M., Sahota, V. K., Taylor, K., Simrak, D., Hornigold, N., Arnemann, J., Wolfe, J., und Buxton, R. S. (1999). Clustered cadherin genes: a sequence-ready contig for the desmosomal cadherin locus on human chromosome 18. Genomics *62*, 445-455.

68. Ishii, K., Amagai, M., Hall, R. P., Hashimoto, T., Takayanagi, A., Gamou, S., Shimizu, N., und Nishikawa, T. (1997). Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assays with baculovirus-expressed recombinant desmogleins. J Immunol *159*, 2010-2017.

69. Ishii, K., Harada, R., Matsuo, I., Shirakata, Y., Hashimoto, K., and Amagai, M. (2005). In vitro keratinocyte dissociation assay for evaluation of the pathogenicity of anti-desmoglein 3 IgG autoantibodies in pemphigus vulgaris. J Invest Dermatol *124*, 939-946.

70. Jablonska, S., Chorzelski, T. P., Beutner, E. H., und Chorzelska, J. (1975). Herpetiform pemphigus, a variable pattern of pemphigus. Int J Dermatol *14*, 353-359.

71. Jacobi, A., Shuler, G., und Hertl, M. (2005). Rapid control of therapy-refractory pemphigus vulgaris by treatment with the tumour necrosis factor-alpha inhibitor infliximab. Br J Dermatol *153*, 448-449.

72. Janeway, C.A., Travers. P., Walport, M., und Shlomchil, M. (2002). Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

73. Jolles, S. (2001). A review of high-dose intravenous immunoglobulin (hdIVIg) in the treatment of the autoimmune blistering disorders. Clin Exp Dermatol *26*, 127-131.

74. Jung, E.G., und Moll, I. (2003). Dermatologie, Thieme, Stuttgart

75. Junqueira, L.C., Carneiro, J., und Kelley, R.O. (2005). Histologie. Springer, Wien

76. Karpati, S., Amagai, M., Prussick, R., Cehrs, K., und Stanley, J. R. (1993). Pemphigus vulgaris antigen, a desmoglein type of cadherin, is localized within keratinocyte desmosomes. J Cell Biol *122*, 409-415.

77. Karpati, S., Amagai, M., Prussick, R., und Stanley, J. R. (1994). Pemphigus vulgaris antigen is a desmosomal desmoglein. Dermatology *189 Suppl 1*, 24-26.

78. Kawana, S., Hashimoto, T., Nishikawa, T., und Nishiyama, S. (1994). Changes in clinical features, histologic findings, and antigen profiles with development of pemphigus foliaceus from pemphigus vulgaris. Arch Dermatol *130*, 1534-1538.

79. Kawasaki, H., Tsunoda, K., Hata, T., Ishii, K., Yamada, T., und Amagai, M. (2006). Synergistic pathogenic effects of combined mouse monoclonal anti-desmoglein 3 IgG antibodies on pemphigus vulgaris blister formation. J Invest Dermatol *126*, 2621-2630.

80. Kazerounian, S., Mahoney, M. G., Uitto, J., und Aho, S. (2000). Envoplakin and periplakin, the paraneoplastic pemphigus antigens, are also recognized by pemphigus foliaceus autoantibodies. J Invest Dermatol *115*, 505-507.

81. Kidd, I. M., und Emery, V. C. (1993). The use of baculoviruses as expression vectors. Appl Biochem Biotechnol *42*, 137-159.

82. Kitajima, Y., Aoyama, Y., und Seishima, M. (1999). Transmembrane signaling for adhesive regulation of desmosomes and hemidesmosomes, and for cell-cell datachment induced by pemphigus IgG in cultured keratinocytes: involvement of protein kinase C. J Investig Dermatol Symp Proc *4*, 137-144.

83. Kljuic, A., Bazzi, H., Sundberg, J. P., Martinez-Mir, A., O'Shaughnessy, R., Mahoney, M. G., Levy, M., Montagutelli, X., Ahmad, W., Aita, V. M.*, et al.* (2003). Desmoglein 4 in hair follicle differentiation and epidermal adhesion: evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris. Cell *113*, 249-260.

84. Koch, P. J., Walsh, M. J., Schmelz, M., Goldschmidt, M. D., Zimbelmann, R., und Franke, W. W. (1990). Identification of desmoglein, a constitutive desmosomal glycoprotein, as a member of the cadherin family of cell adhesion molecules. Eur J Cell Biol *53*, 1-12.

85. Koch, P. J., Mahoney, M. G., Ishikawa, H., Pulkkinen, L., Uitto, J., Shultz, L., Murphy, G. F., Whitaker-Menezes, D., und Stanley, J. R. (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.

86. Kotzin, B. L., Leung, D. Y., Kappler, J., und Marrack, P. (1993). Superantigens and their potential role in human disease. Adv Immunol *54*, 99-166.

87. Kruskal, W.H. und Wallis, W.A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. J Am Stat Assoc *47*, 538-621.

88. Kunte, C., Barbosa, J. M., Wolff, H., und Meurer, M. (1997). [Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem)]. Hautarzt *48*, 228-233.

89. Lanzavecchia, A. (1985). Antigen-specific interaction between T and B cells. Nature *314*, 537-539.

90. Lever, W. F. (1953). Pemphigus. Medicine (Baltimore) *32*, 1-123.

91. Li, N., Aoki, V., Hans-Filho, G., Rivitti, E. A., und Diaz, L. A. (2003). The role of intramolecular epitope spreading in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). J Exp Med *197*, 1501-1510.

92. Lin, M. S., Swartz, S. J., Lopez, A., Ding, X., Fernandez-Vina, M. A., Stastny, P., Fairley, J. A., und Diaz, L. A. (1997). Development and characterization of desmoglein-3 specific T cells from patients with pemphigus vulgaris. J Clin Invest *99*, 31-40.

93. Lucchese, A., Mittelman, A., Tessitore, L., Serpico, R., Sinha, A. A., und Kanduc, D. (2006). Proteomic definition of a desmoglein linear determinant common to Pemphigus vulgaris and Pemphigus foliaceous. J Transl Med *4*, 37.

94. Mahoney, M. G., Wang, Z., Rothenberger, K., Koch, P. J., Amagai, M., und Stanley, J. R. (1999). Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. J Clin Invest *103*, 461-468.

95. McRae, B. L., Vanderlugt, C. L., Dal Canto, M. C., und Miller, S. D. (1995). Functional evidence for epitope spreading in the relapsing pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. J Exp Med *182*, 75-85.

96. Merlob, P., Metzker, A., Hazaz, B., Rogovin, H., und Reisner, S. H. (1986). Neonatal pemphigus vulgaris. Pediatrics *78*, 1102-1105.

97. Memar, O. M., Rajaraman, S., Thotakura, R., Tyring, S. K., Fan, J. L., Seetharamaiah, G. S., Lopez, A., Jordon, R. E., und Prabhakar, B. S. (1996). Recombinant desmoglein 3 has the necessary epitopes to adsorb and induce blister-causing antibodies. J Invest Dermatol *106*, 261-268.

98. Miyagawa, S., Amagai, M., Iida, T., Yamamoto, Y., Nishikawa, T., und Shirai, T. (1999). Late development of antidesmoglein 1 antibodies in pemphigus vulgaris: correlation with disease progression. Br J Dermatol *141*, 1084-1087.

99. Moll, R., Bahn, H., Bayerl, C., und Moll, I. (1996). [Cell adhesion molecules and extracellular matrix components as target structures of autoimmunity]. Verh Dtsch Ges Pathol *80*, 67-79.

100. Müller, R., Svoboda, V., Wenzel, E., Gebert, S., Hunzelmann, N., Müller, H. H., und Hertl, M. (2006). IgG reactivity against non-conformational NH-terminal epitopes of the desmoglein 3 ectodomain relates to clinical activity and phenotype of pemphigus vulgaris. Exp Dermatol *15*, 606-614.

101. Müller R, Svoboda V, Wenzel E, Müller HH, und Hertl M (2008). IgG against extracellular subdomains of desmoglein 3 relates to clinical phenotype of pemphigus vulgaris. Exp Dermatol *17*, 35-43.

102. Mutasim, D. F. (1999). Autoimmune bullous diseases: diagnosis and management. Dermatol Nurs *11*, 15-21; quiz 22-13.

103. Nguyen, V. T., Ndoye, A., und Grando, S. A. (2000a). Novel human alpha9 acetylcholine receptor regulating keratinocyte adhesion is targeted by Pemphigus vulgaris autoimmunity. Am J Pathol *157*, 1377-1391.

104. Nguyen, V. T., Ndoye, A., und Grando, S. A. (2000b). Pemphigus vulgaris antibody identifies pemphaxin. A novel keratinocyte annexin-like molecule binding acetylcholine. J Biol Chem *275*, 29466-29476.

105. Niedermeier, A., Eming, R., Pfütze, M., Neumann, C. R., Happel, C., Reich, K., und Hertl, M. (2007). Clinical response of severe mechanobullous epidermolysis bullosa acquisita to combined treatment with immunoadsorption and rituximab (anti-CD20 monoclonal antibodies). Arch Dermatol *143*, 192-198.

106. Nilles, L. A., Parry, D. A., Powers, E. E., Angst, B. D., Wagner, R. M., und Green, K. J. (1991). Structural analysis and expression of human desmoglein: a cadherin-like component of the desmosome. J Cell Sci *99 (Pt 4)*, 809-821.

107. Nose, A., Tsuji, K., und Takeichi, M. (1990). Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules. Cell *61*, 147-155.

108. Nousari, H. C., und Anhalt, G. J. (1999). Pemphigus and bullous pemphigoid. Lancet *354*, 667-672.

109. Ohata, Y., Amagai, M., Ishii, K., und Hashimoto, T. (2001). Immunoreactivity against intracellular domains of desmogleins in pemphigus. J Dermatol Sci *25*, 64-71.

110. Oldstone, M. B. (1987). Molecular mimicry and autoimmune disease. Cell *50*, 819-820.

111. Payne, A. S., Ishii, K., Kacir, S., Lin, C., Li, H., Hanakawa, Y., Tsunoda, K., Amagai, M., Stanley, J. R., und Siegel, D. L. (2005). Genetic and functional characterization of human pemphigus vulgaris monoclonal autoantibodies isolated by phage display. J Clin Invest *115*, 888-899.

112. Pfütze, M., Niedermeier, A., Hertl, M., und Eming, R. (2007). Introducing a novel Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score (ABSIS) in pemphigus. Eur J Dermatol *17*, 4-11.

113. Pharmingen, (1999). Baculovirus Expression Vector System Manual. 6th Edition.

114. Pisetsky, D. S. (2000). Anti-DNA and autoantibodies. Curr Opin Rheumatol *12*, 364-368.

115. Rizzo, C., Fotino, M., Zhang, Y., Chow, S., Spizuoco, A., und Sinha, A. A. (2005). Direct characterization of human T cells in pemphigus vulgaris reveals elevated autoantigen-specific Th2 activity in association with active disease. Clin Exp Dermatol *30*, 535-540.

116. Salato, V. K., Hacker-Foegen, M. K., Lazarova, Z., Fairley, J. A., und Lin, M. S. (2005). Role of intramolecular epitope spreading in pemphigus vulgaris. Clin Immunol *116*, 54-64.

117. Saraswat, A., Bhushan, K., und India, C. (2003). A new grading system for oral pemphigus. Int J Dermatol *42*, 413-414.

118. Schmidt, E., Brocker, E. B., und Zillikens, D. (2000). [Pemphigus. Loss of desmosomal cell-cell contact]. Hautarzt *51*, 309-318.

119. Seishima, M., Esaki, C., Osada, K., Mori, S., Hashimoto, T., und Kitajima, Y. (1995). Pemphigus IgG, but not bullous pemphigoid IgG, causes a transient increase in intracellular calcium and inositol 1,4,5-triphosphate in DJM-1 cells, a squamous cell carcinoma line. J Invest Dermatol *104*, 33-37.

120. Sekiguchi, M., Futei, Y., Fujii, Y., Iwasaki, T., Nishikawa, T., und Amagai, M. (2001). Dominant autoimmune epitopes recognized by pemphigus antibodies map to the N-terminal adhesive region of desmogleins. J Immunol *167*, 5439-5448.

121. Shimizu, H., Masunaga, T., Ishiko, A., Kikuchi, A., Hashimoto, T., und Nishikawa, T. (1995). Pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus sera show an inversely graded binding pattern to extracellular regions of desmosomes in different layers of human epidermis. J Invest Dermatol *105*, 153-159.

122. Sinha, A. A., Brautbar, C., Szafer, F., Friedmann, A., Tzfoni, E., Todd, J. A., Steinman, L., und McDevitt, H. O. (1988). A newly characterized HLA DQ beta allele associated with pemphigus vulgaris. Science *239*, 1026-1029.

123. Spaeth, S., Riechers, R., Borradori, L., Zillikens, D., Budinger, L., und Hertl, M. (2001). IgG, IgA and IgE autoantibodies against the ectodomain of desmoglein 3 in active pemphigus vulgaris. Br J Dermatol *144*, 1183-1188.

124. Stanley, J. R., Klaus-Kovtun, V., und Sampaio, S. A. (1986a). Antigenic specificity of fogo selvagem autoantibodies is similar to North American pemphigus foliaceus and distinct from pemphigus vulgaris autoantibodies. J Invest Dermatol *87*, 197-201.

125. Stanley, J. R., Koulu, L., Klaus-Kovtun, V., und Steinberg, M. S. (1986b). A monoclonal antibody to the desmosomal glycoprotein desmoglein I binds the same polypeptide as human autoantibodies in pemphigus foliaceus. J Immunol *136*, 1227-1230.

126. Stanley, J. R. (1989). Pemphigus and pemphigoid as paradigms of organ-specific, autoantibody-mediated diseases. J Clin Invest *83*, 1443-1448.

127. Stanley, J. R. (1993). Cell adhesion molecules as targets of autoantibodies in pemphigus and pemphigoid, bullous diseases due to defective epidermal cell adhesion. Adv Immunol *53*, 291-325.

128. Stingl, G., and Holubar, K. (1975). Coexistence of lichen planus and bullous pemphigoid. A immunopathological study. Br J Dermatol *93*, 313-320.

129. Takeichi, M. (1990). Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. Annu Rev Biochem *59*, 237-252.

130. Takeichi, M. (1991). Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. Science *251*, 1451-1455.

131. Theofilopoulos, A. N. (1995). The basis of autoimmunity: Part II. Genetic predisposition. Immunol Today *16*, 150-159.

132. Toth, G. G., und Jonkman, M. F. (2001). Therapy of pemphigus. Clin Dermatol *19*, 761-767.

133. Tsunoda, K., Ota, T., Aoki, M., Yamada, T., Nagai, T., Nakagawa, T., Koyasu, S., Nishikawa, T., und Amagai, M. (2003). Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. J Immunol *170*, 2170-2178.

134. Turner, M. S., Sutton, D., und Sauder, D. N. (2000). The use of plasmapheresis and immunosuppression in the treatment of pemphigus vulgaris. J Am Acad Dermatol *43*, 1058-1064.

135. Vanderlugt, C. J., and Miller, S. D. (1996). Epitope spreading. Curr Opin Immunol *8*, 831-836.

136. Veldman, C., Stauber, A., Wassmuth, R., Uter, W., Schuler, G., und Hertl, M. (2003). Dichotomy of autoreactive Th1 and Th2 cell responses to desmoglein 3 in patients with pemphigus vulgaris (PV) and healthy carriers of PV-associated HLA class II alleles. J Immunol *170*, 635-642.

137. Veldman, C., Hohne, A., Dieckmann, D., Schuler, G., und Hertl, M. (2004a). Type I regulatory T cells specific for desmoglein 3 are more frequently detected in healthy individuals than in patients with pemphigus vulgaris. J Immunol *172*, 6468-6475.

138. Veldman, C. M., Gebhard, K. L., Uter, W., Wassmuth, R., Grotzinger, J., Schultz, E., und Hertl, M. (2004b). T cell recognition of desmoglein 3 peptides in patients with pemphigus vulgaris and healthy individuals. J Immunol *172*, 3883-3892.

139. Wang, X., Bregegere, F., Frusic-Zlotkin, M., Feinmesser, M., Michel, B., und Milner, Y. (2004). Possible apoptotic mechanism in epidermal cell acantholysis induced by pemphigus vulgaris autoimmunoglobulins. Apoptosis *9*, 131-143.

140. Warren, S. J., Lin, M. S., Giudice, G. J., Hoffmann, R. G., Hans-Filho, G., Aoki, V., Rivitti, E. A., Santos, V., und Diaz, L. A. (2000). The prevalence of antibodies against desmoglein 1 in endemic pemphigus foliaceus in Brazil. Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. N Engl J Med *343*, 23-30.

141. Weber, S., Traunecker, A., Oliveri, F., Gerhard, W., und Karjalainen, K. (1992). Specific low-affinity recognition of major histocompatibility complex plus peptide by soluble T-cell receptor. Nature *356*, 793-796.

142. Wucherpfennig, K. W., Yu, B., Bhol, K., Monos, D. S., Argyris, E., Karr, R. W., Ahmed, A. R., und Strominger, J. L. (1995). Structural basis for major histocompatibility complex (MHC)-linked susceptibility to autoimmunity: charged residues of a single MHC binding pocket confer selective presentation of self-peptides in pemphigus vulgaris. Proc Natl Acad Sci U S A *92*, 11935-11939.

143. Yamashina, Y., Miyagawa, S., Kawatsu, T., Iida, T., Higashimine, I., Shirai, T., und Kaneshige, T. (1998). Polymorphisms of HLA class II genes in Japanese patients with pemphigus vulgaris. Tissue Antigens *52*, 74-77.

144. Yoshida, K., Takae, Y., Saito, H., Oka, H., Tanikawa, A., Amagai, M., und Nishikawa, T. (2005). Cutaneous type pemphigus vulgaris: a rare clinical phenotype of pemphigus. J Am Acad Dermatol *52*, 839-845.

8 Anhang

Tab. 8.1: IgG-Reaktivität (OD-Werte) der Pemphigus vulgaris-Patienten-Kohorte im ELISA

PV-Patient	Stadium	Phänotyp	Dsg3EC1-5	Dsg3EC1p	Dsg3EC1	Dsg3EC2	Dsg3EC3	Dsg3EC4	Dsg3EC5
P23	a	m	0,602	0,25	0,902	0,516	0,317	0,213	0,128
P245	a	m	0,386	0,211	0,251	0,207	0,181	0,189	0,146
P254	a	m	0,924	0,149	0,399	0,158	0,146	0,352	0,142
P261	a	m	0,998	0,255	0,569	0,3	0,207	0,324	0,129
P537	a	m	0,273	0,195	0,276	0,531	0,32	0,292	0,216
P1305	a	m	0,596	0,292	0,373	0,219	0,197	0,196	0,106
P1698	a	m	1,275	0,522	1,077	0,483	0,35	0,821	0,252
AC115	a	mc	1,129	0,205	0,641	0,641	0,225	0,173	0,81
P34	a	mc	0,932	0,621	0,703	0,905	0,364	0,526	0,338
P62	a	mc	0,992	0,167	0,343	0,148	0,136	0,313	0,126
P74	a	mc	0,721	0,141	0,306	0,255	0,21	0,174	0,163
P83	a	mc	0,443	0,177	0,301	0,206	0,226	0,337	0,17
P189	a	mc	0,605	0,295	0,314	0,207	0,144	0,151	0,135
P200	a	mc	0,716	0,264	0,495	1,108	0,904	1,21	0,489
P206	a	mc	0,892	0,347	0,502	0,598	0,518	0,48	0,266
P207	a	mc	0,924	0,218	0,329	0,234	0,211	0,158	0,119
P236	a	mc	1,138	0,36	0,532	0,467	0,447	1,17	0,279
P238	a	mc	0,583	0,336	0,498	0,245	0,258	0,248	0,232
P240	a	mc	1,01	0,254	0,486	0,268	0,256	0,878	1,489
P250	a	mc	0,543	0,186	0,281	0,191	0,161	0,324	0,108
P257	a	mc	0,858	0,223	0,516	0,601	0,559	0,237	0,115
P260	a	mc	0,925	0,154	0,41	0,23	0,167	0,244	0,18
P325	a	mc	0,884	0,275	0,233	0,646	0,278	0,272	0,923
P326	a	mc	0,838	0,207	0,357	0,178	0,155	0,153	0,115
P441	a	mc	0,958	0,197	0,356	0,213	0,196	0,205	0,18
P463	a	mc	1,173	0,228	0,468	0,406	0,327	0,24	0,916
P489	a	mc	0,751	0,178	0,454	0,425	0,369	0,341	0,52
P700	a	mc	0,663	0,253	0,577	0,318	0,293	0,27	0,196
P1053	a	mc	0,65	0,252	0,353	0,504	0,513	0,408	0,266
P1092	a	mc	1,031	0,18	0,347	0,155	0,145	0,211	0,128
P1535	a	mc	0,853	0,188	0,331	0,247	0,185	0,178	0,107
P1699	a	mc	0,812	0,345	0,47	0,451	0,395	0,422	0,451
P1712	a	mc	0,803	0,332	0,41	0,36	0,303	0,232	0,185
P1721	a	mc	0,738	0,181	0,219	0,151	0,152	0,161	0,128
P1729	a	mc	0,988	0,261	0,253	0,227	0,419	0,378	0,241
P1740	a	mc	1,232	0,558	0,495	0,493	0,444	0,547	0,45
P1742	a	mc	0,403	0,297	0,301	0,25	0,258	0,239	0,198
P35	a	c	0,885	0,125	0,258	0,136	0,134	0,149	0,108
P246	a	c	0,626	0,242	0,295	0,137	0,121	0,199	0,097
P75	c	m	0,742	0,213	0,333	0,262	0,389	0,238	0,207
P138	c	m	0,42	0,291	0,535	0,258	0,213	0,195	0,111
P192	c	m	0,895	0,249	0,315	0,213	0,135	0,192	0,183
P193	c	m	0,629	0,155	0,322	0,32	0,224	0,156	0,177
P197	c	m	0,968	0,134	0,353	0,118	0,116	0,096	0,095
P198	c	m	0,888	0,141	0,246	0,113	0,115	0,101	0,097
P202	c	m	0,67	0,24	0,309	0,28	0,244	0,214	0,124

P203	c	m	0,653	0,146	0,361	0,133	0,138	0,097	0,093
P234	c	m	0,647	0,143	0,195	0,111	0,136	0,11	0,116
P569	c	m	0,499	0,131	0,456	0,311	0,242	0,144	0,115
P823	c	m	0,952	0,303	0,844	0,561	0,279	0,187	0,749
P1538	c	m	0,871	0,806	0,956	1,118	1,002	0,94	0,384
P1739	c	m	0,487	0,525	0,709	0,644	0,568	0,655	0,326
P55	c	mc	1,088	0,178	0,298	0,234	0,18	0,183	0,181
P87	c	mc	0,693	0,239	0,707	0,246	0,278	0,434	0,12
P92	c	mc	0,652	0,231	0,314	0,174	0,122	0,116	0,162
P187	c	mc	0,902	0,445	0,66	0,318	0,364	0,655	0,168
P191	c	mc	0,859	0,167	0,389	0,116	0,115	0,156	0,098
P194	c	mc	0,805	0,119	0,369	0,156	0,127	0,204	0,106
P196	c	mc	0,967	0,162	0,391	0,163	0,158	0,151	0,147
P201	c	mc	0,813	0,423	0,665	0,435	0,506	0,243	0,244
P235	c	mc	0,907	0,192	0,381	0,239	0,214	0,276	0,145
P237	c	mc	0,724	0,222	0,364	0,31	0,308	0,606	0,303
P241	c	mc	0,704	0,246	0,436	0,455	0,454	0,466	0,451
P247	c	mc	0,728	0,351	0,582	0,422	0,291	0,265	0,298
P251	c	mc	0,897	0,198	0,525	0,298	0,095	0,117	0,519
P492	c	mc	1,011	0,175	0,373	0,165	0,162	0,252	0,136
P525	c	mc	1,092	0,174	0,293	0,25	0,141	0,231	0,236
P565	c	mc	1,495	0,179	0,406	0,206	0,227	0,455	0,177
P605	c	mc	0,602	0,235	0,422	0,419	0,402	0,205	0,137
P646	c	mc	0,648	0,129	0,466	0,272	0,285	0,565	0,188
P717	c	mc	0,818	0,325	0,478	0,36	0,28	0,462	0,172
P893	c	mc	0,871	0,275	0,524	0,326	0,311	0,33	0,235
P1675	c	mc	0,782	0,268	0,372	0,395	0,299	0,232	0,155
P66	c	c	0,345	0,255	0,742	0,25	0,186	0,155	0,123
P93	c	c	0,671	0,151	0,258	0,171	0,166	0,212	0,269
P104	c	c	0,939	0,166	0,198	0,275	0,143	0,532	0,379
P204	c	c	0,901	0,168	0,213	0,418	0,14	0,24	0,696
P253	c	c	0,342	0,253	0,386	0,161	0,16	0,261	0,105
P255	c	c	0,765	0,205	0,262	0,197	0,198	0,169	0,101
P338	c	c	0,795	0,194	0,329	0,248	0,231	0,18	0,126
P562	c	c	0,252	0,235	0,341	0,222	0,205	0,221	0,134
P123	r	m	0,504	0,289	0,256	0,249	0,296	0,228	0,167
P12	r	mc	0,593	0,227	0,261	0,299	0,271	0,221	0,127
P43	r	mc	0,556	0,296	0,456	0,284	0,21	0,226	0,152
P96	r	mc	0,553	0,331	0,319	0,166	0,165	0,169	0,137
P133	r	mc	1,418	0,227	0,367	0,188	0,198	0,356	0,231
P256	r	mc	0,786	0,246	0,532	0,28	0,269	0,3	0,167
P505	r	mc	0,224	0,321	0,451	0,298	0,263	0,255	0,234
P538	r	mc	0,212	0,18	0,393	0,202	0,141	0,335	0,106
P644	r	mc	0,227	0,229	0,413	0,265	0,266	0,202	0,186
P647	r	mc	0,175	0,127	0,189	0,342	0,193	0,262	0,141
P709	r	mc	0,941	0,285	0,424	0,312	0,285	0,284	0,473
P1154	r	mc	0,871	0,287	0,756	0,326	0,238	0,184	0,612
P44	r	c	0,64	0,165	0,257	0,183	0,19	0,169	0,147

Die Tab. gibt die infolge Zweifachmessung gemittelten OD-Werte der 94 im ELISA untersuchten PV-Patienten gegen die verschiedenen Desmoglein 3-Domänen an. Krankheitsstadien: (a) akut, (c) chronisch, (r) Remission. Phänotyp: (m) mukosal, (mc) mukokutan, (c) kutan. (vgl. Tab. 3.2, 3.3; Abb. 3.7, 3.8)

Tab. 8.2: IgG-Reaktivität (OD-Werte) der Kontrollseren im ELISA

Kontrolle	Dsg3EC1-5	Dsg3EC1p	Dsg3EC1	Dsg3EC2	Dsg3EC3	Dsg3EC4	Dsg3EC5
K12	0,241	0,156	0,216	0,41	0,42	0,389	0,387
K17	0,313	0,345	0,3	0,28	0,294	0,153	0,166
K18	0,228	0,199	0,326	0,154	0,232	0,135	0,106
K19	0,165	0,213	0,18	0,119	0,118	0,121	0,109
K22	0,213	0,224	0,223	0,201	0,2	0,186	0,205
K23	0,216	0,322	0,342	0,311	0,312	0,3	0,355
K24	0,224	0,202	0,224	0,199	0,19	0,185	0,164
K25	0,218	0,19	0,306	0,186	0,185	0,167	0,143
K26	0,192	0,19	0,255	0,153	0,197	0,144	0,12
K27	0,16	0,129	0,23	0,163	0,184	0,123	0,131
K28	0,254	0,219	0,299	0,242	0,215	0,153	0,134
K30	0,145	0,192	0,212	0,191	0,183	0,169	0,161
K34	0,251	0,231	0,261	0,267	0,241	0,316	0,146
K36	0,288	0,368	0,357	0,368	0,321	0,304	0,204
K37	0,215	0,236	0,281	0,173	0,191	0,217	0,119
K39	0,164	0,148	0,177	0,161	0,173	0,184	0,156
K41	0,39	0,167	0,402	0,237	0,246	0,198	0,121
K42	0,223	0,155	0,263	0,139	0,117	0,131	0,113
K45	0,224	0,146	0,266	0,151	0,14	0,38	0,099
K46	0,213	0,162	0,349	0,202	0,186	0,146	0,118
K48	0,22	0,147	0,241	0,252	0,228	0,217	0,186
K49	0,212	0,146	0,192	0,152	0,154	0,159	0,124
K50	0,398	0,201	0,239	0,239	0,184	0,266	0,125
K52	0,3	0,189	0,394	0,21	0,205	0,303	0,143

Die Tab. gibt die infolge Zweifachmessung gemittelten OD-Werte der im ELISA untersuchten 24 Kontrollseren von gesunden Personen gegen die verschiedenen Desmoglein 3-Domänen an. (vgl. Abb. 3.7, 3.8)

Tab. 8.3 A, B: IgG-Reaktivität (OD-Werte) individueller Pemphigus vulgaris-Patienten im ELISA

Proteine	d0	d15	d23	d28	d64	d120	d162	d169	d206
Dsg3EC1-5	0,641	0,566	0,618	0,439	0,69	0,667	0,597	0,667	0,597
Dsg3EC1p	0,246	0,218	0,267	0,171	0,282	0,262	0,239	0,262	0,239
Dsg3EC1	0,449	0,39	0,446	0,301	0,534	0,491	0,407	0,491	0,407
Dsg3EC2	0,375	0,294	0,336	0,26	0,545	0,455	0,351	0,455	0,351
Dsg3EC3	0,319	0,273	0,301	0,264	0,349	0,323	0,284	0,323	0,284
Dsg3EC4	0,326	0,3	0,298	0,279	0,33	0,325	0,261	0,325	0,261
Dsg3EC5	0,204	0,18	0,193	0,191	0,206	0,198	0,174	0,198	0,174

A- gemittelte OD-Werte von Patient A gegen Desmoglein 3-Proteine im Beobachtungszeitraum, (d) Tag (vgl. Abb. 3.9 A)

Proteine	d0	d8	d15	d22	d48	d111
Dsg3EC1-5	0,915	1,16	0,987	1,136	1,044	0,96
Dsg3EC1p	0,166	0,2	0,178	0,208	0,313	0,275
Dsg3EC1	0,366	0,819	0,46	0,759	0,454	0,342
Dsg3EC2	0,177	0,271	0,201	0,242	0,333	0,295
Dsg3EC3	0,357	0,567	0,375	0,493	0,427	0,387
Dsg3EC4	0,518	0,904	0,593	0,985	0,441	0,361
Dsg3EC5	0,255	0,367	0,283	0,444	0,355	0,342

B- gemittelte OD-Werte von Patient B gegen Desmoglein 3-Proteine im Beobachtungszeitraum, (d) Tag (vgl. Abb. 3.9 B)

Tab. 8.4 A, B, C: OD-Werte für Anti-E-Tag Reaktivität (A) und IgG-Reaktivität einzelner PV-Seren (B, C) gegen native und denaturierte Desmoglein 3-Proteine im ELISA

E-Tag	Dsg3EC1-5	Dsg3EC1p	Dsg3EC1	Dsg3EC2	Dsg3EC3	Dsg3EC4	Dsg3EC5
Nativ	1,096	1,004	0,984	0,817	1,026	1,007	1,031
Urea	1,139	0,916	1,002	1,053	1,313	1,024	1,003
EDTA	1,539	1,085	1,001	1,028	1,199	1,081	1,035

A- Anti-E-Tag-Reaktivität (vgl. Abb. 3.10 A)

P325	Dsg3EC1-5	Dsg3EC1	Dsg3EC2	Dsg3EC3	Dsg3EC4	Dsg3EC5
Nativ	0,87	0,414	0,414	0,794	0,328	0,676
Urea	0,85	0,383	0,378	0,431	0,331	0,665
EDTA	0,736	0,37	0,358	0,346	0,345	0,697

B- IgG-Reaktivität von Patient P 325 (vgl. Abb. 3.10 B)

P1698	Dsg3EC1-5	Dsg3EC1p	Dsg3EC1	Dsg3EC2	Dsg3EC3	Dsg3EC4	Dsg3EC5
Nativ	0,68	0,499	0,576	0,421	0,349	0,506	0,353
Urea	0,681	0,51	0,608	0,448	0,395	0,575	0,376
EDTA	0,315	0,482	0,592	0,397	0,366	0,54	0,352

C- IgG-Reaktivität von Patient P 1698 (vgl. Abb. 3.10 C)

Tab. 8.5: IgG-Reaktivität (OD-Werte) ausgewählter Pemphigus vulgaris-Patienten gegen native/denaturierte Desmoglein 3-Proteine im ELISA

Serum Nr	EC 1-5-N	EC 1-5-U	EC 1-5-E	EC1p-N	EC1p-U	EC1p-E	EC1-N	EC1-U	EC1-E	EC2-N	EC2-U	EC2-E	EC3-N	EC3-U	EC3-E	EC4-N	EC4-U	EC4-E	EC5-N	EC5-U	EC5-E
P23	0,6505	0,679	0,49				0,8185	0,87	0,747	0,7575	0,81	0,615	0,597	0,279	0,1675						
P87	0,687	0,4585	0,397				0,6285	0,504	0,525	0,4325	0,353	0,324	0,603	0,286	0,238	0,4795	0,463	0,448			
P104	0,9355	0,8305	0,757										0,49	0,2355	0,131	0,691	0,3645	0,6015	0,5245	0,4945	0,394
AC115	1,067	0,951	0,9985				0,5875	0,653	0,9225	0,5365	0,767	0,686	0,391	0,288	0,225				0,5905	0,5595	0,782
P204	0,924	0,769	0,771										0,4795	0,273	0,1805				0,9085	0,8415	0,7855
P206	1,02	0,7275	0,791	0,5395	0,465	0,4515	0,885	0,578	0,5825	0,8925	0,859	0,6535	0,512	0,258	0,4095	0,595	0,583	0,6155			
P237	0,76	0,771	0,6325				0,442	0,4985	0,3935				0,622	0,267	0,159	0,667	0,202	0,625			
P247	1,0115	0,8345	0,7295	0,4965	0,603	0,5815	1,1175	1,005	1,0645	0,73	0,6665	0,6185	0,794	0,456	0,391	0,571	0,8955	0,5345	0,8125	0,751	0,8635
P251	0,9595	1,101	0,8035				0,616	0,672	0,681										0,91	0,915	0,978
P325	0,8705	0,85	0,736				0,414	0,3835	0,37	0,414	0,378	0,358	0,794	0,431	0,346				0,6765	0,665	0,6975
P463	1,0945	1,2615	1,1335				0,6165	0,624	0,6135	0,547	0,513	0,4805	0,826	0,452	0,3465				0,901	1,002	1,107
P565	1,4955	1,6455	1,089				0,5005	0,459	0,4335							0,417	0,4285	0,361			
P646	0,8185	0,431	0,3915													0,6165	0,3905	0,675			
P709	0,934	0,8335	0,6845				0,488	0,5075	0,6035	0,457	0,4255	0,4015	0,4205	0,427	0,3505	0,397	0,458	0,3265	0,5155	0,4955	0,486
P717	0,7595	0,6115	0,5715				0,7	0,7475	0,8085	0,5365	0,5815	0,5995	0,4135	0,494	0,444	0,5625	0,523	0,6655			
P823	0,9065	0,9815	0,7465				0,866	0,829	0,876	0,458	0,4345	0,465				0,3785	0,376	0,3555	0,7915	0,758	0,77
P1154	0,807	0,428	0,4175				0,521	0,5885	0,6665										0,6895	0,799	0,816
P1729	0,869	0,4605	0,4805																		
P236	0,82	0,8605	0,81	0,4965	0,603	0,5815	0,475	0,5395	0,539	0,389	0,4835	0,5085	0,511	0,74	0,6195	0,6835	0,4655	0,7805			
P240	0,8505	0,8805	0,945				0,5665	0,633	0,5965							0,7575	0,501	0,822	1,4735	1,5005	1,431
P187	0,8985	0,814	0,6655	0,601	0,6	0,532	0,7095	0,673	0,6715	0,557	0,7425	0,563	0,773	0,917	0,67	0,785	0,6805	0,8795	0,434	0,5995	0,4865
P201	0,765	0,603	0,561				0,6315	0,5995	0,5875	0,5725	0,465	0,413				0,393	0,3395	0,3645			
P1698	0,68	0,618	0,315	0,499	0,5105	0,482	0,576	0,608	0,592	0,4215	0,4485	0,379				0,506	0,575	0,5405			
P1739	0,5655	0,491	0,44				0,7385	0,8615	0,9065	0,65	0,8095	0,8575	0,388	0,4735	0,595	0,9385	1,313	1,1915			
P34	0,517	0,5655	0,5155				0,5815	0,548	0,5275	0,5285	0,5615	0,5635	0,4	0,4145	0,4275	0,5505	0,5565	0,556			

Die Tab. gibt die OD-Werte eines Kollektivs von 25 Pemphigus vulgaris-Patienten gegen native (-N) sowie mit durch Urea (-U) und EDTA (-E) denaturierte Desmoglein 3 (Dsg3)-Proteine (EC-Konstrukte) wieder. Es wurde jeweils nur der OD-Wert eines Serums gegen ein rekombinantes Protein unter denaturierenden Bedingungen bestimmt, wenn das Serum eine IgG-Reaktivität unter nativen Bedingungen aufwies. (vgl. Abb. 3.11)

Lebenslauf

Zur Person:

Familienname:	Svoboda
Vorname:	Vera
Geburtsdatum:	22.04.1982
Geburtsort:	Herne

Schulische Laufbahn:

1992 – 2001	Schiller-Gymnasium, Bochum
07/98 – 08/98	Senior High School, Oudtshoorn, Südafrika
06/01	„Karl von Frisch Abiturientenpreis“ des Verein deutscher Biologen für „hervorragende Leistungen im Fach Biologie“

Hochschullaufbahn:

Seit 10/01	Philipps-Universität Marburg, Studium der Humanmedizin
08/03 – 09/03	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04/08 – 05/08	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Famulaturen:

03/04	Wilhelminenspital, Wien, Österreich Abteilung für Innere Medizin, Prof. Dr. med. M. Kneussl
09/04	Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spanien Abteilung für Allgemeinchirurgie, Prof. Dr. med. A. Naranjo
08/05	Sunnybrook Health Science Centre, Toronto, Kanada Abteilung für Dermatologie, N.Shear, MD
03/06	Praxis Dr. R. Viand, Bochum Kardiologie

Praktisches Jahr:

08/06 – 11/06	Universitätsklinikum der Philipps-Universität Marburg Abteilung für Innere Medizin, Prof. Dr. med. B. Maisch, Prof. Dr. med. T. Gress
12/06 – 03/07	Universitätsklinikum der Philipps-Universität Marburg Abteilung für Dermatologie, Prof. Dr. med. M. Hertl
04/07 – 07/07	Spital Bülach, Bülach, Schweiz Abteilung für Chirurgie, Dr. med. B. Muff

Dissertation:

01/05 – 04/07	Experimentelle Doktorarbeit in der Universitätsklinik für Dermatologie, Marburg unter Betreuung von Prof. Dr. med. M. Hertl und Dr. rer. nat. R. Müller
07/07-10/07	Niederschrift der Dissertation

Veröffentlichungen:

Wissenschaftliche Zeitschriften:

1) Müller R, Svoboda V, Wenzel E, Gebert S, Hunzelmann N, Müller HH, und Hertl M (2006). IgG reactivity against non-conformational NH_2-terminal epitopes of the desmoglein 3 ectodomain relates to clinical activity and phenotype of pemphigus vulgaris. *Exp Dermatol* 15, 606-614.

2) Müller R, Svoboda V, Wenzel E, Müller HH, und Hertl M (2008). IgG against extracellular subdomains of desmoglein 3 relates to clinical phenotype of pemphigus vulgaris. *Exp Dermatol* 17, 35-43.

Sonstige:

1) Zweite Koautorschaft beim Poster für die Tagung der Arbeitsgemeinschaft dermatologische Forschung (ADF) in Aachen 2006, Abstract in *Exp Dermatol* 15, 200: 040

2) Posterpräsentation auf dem 36th Meeting der European Society for Dermatological Research (ESDR) in Paris 2006, (Zweite Koautorin), Abstract in *J Invest Dermatol* 126, Supp 3, 24: 128

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herren in Marburg:

Albert, Alfke, Arnold, Aumüller, Aziz, Bach, Bals, Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Becker, Behe, Behr, Berger, Berndt, Bernhardt, Bertalanffy, Besedovsky, Beyer, Bien, Brilla, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut,Diedrich, Dittrich, Dodel, Dominguez, Donner-Banzhoff, Duda, Eilers, Engenhart-Cabillic, Effendy, Eisele, Elsässer, Eschenbach, Fehmann, Feuser, Friederich, Fuchs, Fuchs-Winkelmann, Fuhrmann, Garn, Garten, Gemsa, Gerdes, Geus, Golenhofen, Göke, Görg, Gotthardt, Gotzen, Graul, Greger, Gress, Grimm, Griss, Grunder, Grezeschik, Groß, Gudermann, Hackenberg, Hadji, Hadewig, Happle, Hasilik, Hebebrand, Heeg, Heidenreich, Hellinger, Hellwig, Hertl, Hess, Hesse, Herzum, Hilgermann, Höffken, Hofmann, Hofstaetter, Höltermann, Hörle, Hörsch, Hoyer, Huffmann, Joseph, Jacob, Jungclas, Kaffarnik, Kälble, Kalinowski, Kann, Kern, Klaus, Kleine, Klenk, Klingmüller, Klose, Koch, Köhler, König, Koolman, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroh, Knoll, Kroll,
Kuhlman, Kuhn, Kühnert, Lammel, Lang, Lange, Lehmann, Lennartz, Lill, Lippert, Liss, Loff, Löffler, Lohoff, Lorenz, Ludwig, Lürs, Maier, Maisch, Mann, Mandic, Mennel, Mittag, Moll, Moosdorf, Müller, Mutters, Netter, Neubauer, Neurath, Noll, Nüsing, Oertel, Pagenstecher, Pieper, Pfeiffer, Pohlen, Prinz, Quante, Radsak, Remschmidt, Renz, Richter, Roeper, Röhm, Rose, Rosenow, Rothmund, Rupp, Sahmland, Schäfer H, Schäfer J, Schäfer M, Schmid, Schmidt, Schmitt, Schmitz-Moormann, Schnabel, Schneider, Schrader, Schreiber, Schuermann, Schüffel, Schultz, Schumacher, Schwarz, Seifart, Seitz, Sekundo, Sesterhenn, Seyberth, Sommer, Sprinzl, Steiniger, Stiletto, Stinner, Strassmann, Strempel, Sturm, Sure, Suske, Tebbe, Teymoortash, Thomas, Vedder, Vogelmeier, Vohland, Voigt, Wagner H-J, Wagner U, Walthers, Weber, Weihe, Wennemuth, Werner, Wesemann, Westermann, Wiegandt, Wilke, Wirth, Wolf, Wulf, Wündisch, Zielke.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Planung, Durchführung und Fertigstellung dieser Promotionsarbeit unterstützt haben.

Mein Dank gilt insbesondere

- Herrn Prof. Dr. Michael Hertl, dem ich nicht nur herzlich für seine stete Unterstützung in jeglicher Hinsicht und sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit danken möchte, sondern auch dafür, dass er allgemein mein Interesse an der Dermatologie durch Ermöglichung der Teilnahme an der ESDR 2006 sowie im klinischen Alltag während meines PJ-Wahltertials gefördert hat.
- Herrn PD Dr. Garn möchte ich für die Übernahme des Korreferats danken.
- Herrn Dr. Ralf Müller gilt mein besonderer Dank für die ausgezeichnete kontinuierliche Betreuung, geduldige Erklärungen und Unterstützung bei der Durchführung der vielfältigen Labormethoden während der gesamten Promotion.
- Herrn PD Dr. Hans-Helge Müller danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der ELISA Daten.

Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern der Hautklinik, die mir während meiner Arbeit mit Rat und Tat geholfen haben.

Mein Dank gilt Elke Wenzel für ihre fachkundige Unterstützung während der Versuchsdurchführungen.

Ich danke Eva Podstawa und Susanne Schwietzke für unzählige wertvolle technische Tipps während der Laborarbeit sowie Sonja Wolff-Franke und Angela Nagel für ihre kollegiale Hilfe im Labor und anregende fachliche Diskussionen.

Insbesondere gilt mein Dank meinen Eltern Dorothea und Dr. Armin Svoboda, die mir das Medizinstudium ermöglichen und mich in jeglicher Hinsicht unterstützen, sowie meinem Bruder Hanno Svoboda für seine bereitwillige Hilfe in allen „Computerangelegenheiten“.

Des Weiteren möchte ich meinem Freund und meinen Freundinnen für „moralische Unterstützung“ in allen Zeiten herzlich danken.

Wesentliche Anteile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

1. Müller R, Svoboda V, Wenzel E, Gebert S, Hunzelmann N, Müller HH, und Hertl M (2006). IgG reactivity against non-conformational NH_2-terminal epitopes of the desmoglein 3 ectodomain relates to clinical activity and phenotype of pemphigus vulgaris. *Exp Dermatol* 15, 606-614.

2. Müller R, Svoboda V, Wenzel E, Müller HH, und Hertl M (2008). IgG against extracellular subdomains of desmoglein 3 relates to clinical phenotype of pemphigus vulgaris. *Exp Dermatol* 17, 35-43.