

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	DESMOSOMEN.....	1
1.1.1	<i>Desmosomale Cadherine und ihr molekularer Aufbau.....</i>	<i>3</i>
1.1.2	<i>Desmosomale Dynamik.....</i>	<i>5</i>
1.2	PEMPHIGUS	6
1.2.1	<i>Molekulare Aspekte der Erkrankung Pemphigus vulgaris</i>	<i>7</i>
1.2.2	<i>Pathomechanismen beim Pemphigus.....</i>	<i>8</i>
1.2.3	<i>Aktuelle Therapieoptionen zur Behandlung von Pemphigus vulgaris</i>	<i>11</i>
1.3	DER NEONATALE FC-REZEPTOR (FCRN).....	12
1.3.1	<i>Modulation der IgG-FcRn Interaktion.....</i>	<i>15</i>
1.3.2	<i>Efgartigimod (Argx113).....</i>	<i>17</i>
1.4	ZIELE DER ARBEIT	20
2	MATERIAL.....	21
2.1	TECHNISCHE GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIAL	21
2.2	CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	24
2.3	REZEPTE DER PUFFER UND LÖSUNGEN	26
2.4	KOMMERZIELLE KITS ZUR DNA-AUFREINIGUNG.....	28
2.5	ENZYME	28
2.6	PLASMID-KONSTRUKTE.....	29
2.7	SYNTHETISCHE OLIGONUKLEOTIDE.....	29
2.8	ANTIKÖRPER.....	30
2.9	MONOKLONALE PATHOGENE ANTI-DSG-3 ANTIKÖRPER.....	31
2.10	FC-FRAGMENT-DERIVATE.....	32
2.11	BAKTERIENSTÄMME.....	33
2.12	ZELLINIEN.....	34
2.13	SOFTWARE.....	35
2.14	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	35
3	METHODEN	36
3.1	BIOCHEMISCHE METHODEN	36
3.1.1	<i>Herstellung von Zelllysaten</i>	<i>36</i>
3.1.2	<i>Proteinmengenbestimmung nach Bradford</i>	<i>36</i>
3.1.3	<i>Sequentielle Detergenzextraktion</i>	<i>36</i>
3.1.4	<i>SDS-PAGE und Western Blot</i>	<i>37</i>
3.1.5	<i>Immundetektion.....</i>	<i>38</i>
3.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	38
3.2.1	<i>Klonierung der gRNAs.....</i>	<i>38</i>

3.2.1.1	Hybridisierung der Oligonukleotide.....	39
3.2.1.2	Dephosphorylierung und Restriktionsverdau des Vektors.....	40
3.2.1.3	Ligation zu pX459-Dsg3-gRNA-1, -2, -3	40
3.2.2	Transformation in kompetente Zellen	40
3.2.3	PCR (Polymerase-Kettenreaktion)	41
3.2.4	Agarosegelelektrophorese.....	42
3.2.5	Plasmidpräparation	42
3.3	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	42
3.3.1	Kultivierung von hTert- und HaCaT-Zellen.....	42
3.3.2	Passagieren und Splitten der hTert- und HaCat-Zellen	43
3.3.3	Kryokonservierung von Zellen	43
3.3.4	Transiente Transfektion von HaCaT-Zellen	44
3.3.5	Gewinnung von Einzelzellklonen	44
3.3.6	Behandlung der Zellen mit PV-Antikörpern	45
3.3.7	Behandlung der Zellen mit Efgartigimod, Fc-WT und Fc-IHH.....	45
3.3.8	Zelldissoziationsversuche.....	45
3.4	MIKROSKOPIE	46
3.4.1	Immunfluoreszenz-Mikroskopie	46
4	ERGEBNISSE	47
4.1	EXPRESSION DES MOSOMALER CADHERINE UND DES FCRN IN HUMANEN KERATINOZYTENZELLINIEN	47
4.2	CRISPR/Cas9 KNOCK-OUT VON DESMOGLEIN 3 IN HUMANEN KERATINOZYTEN...48	
4.2.1	Auswahl der Keratinozytenzelllinie	48
4.2.2	Herstellung des Vektorkonstruktes für den CRISPR/Cas9 Knock-Out von Dsg-3 49	
4.2.3	Analyse des Vektors nach Transformation in XL-1-Blue.....	49
4.2.4	Transiente Transfektion von HaCaT-Zellen und Detektion der Knock-Out Einzelzellklone.....	50
4.3	CHARAKTERISIERUNG REKOMBINANTER ANTI-DESMOGLEIN-3 ANTIKÖRPER IN HUMANEN KERATINOZYTEN.....	52
4.3.1	Effekt rekombinanter Anti-Desmoglein-3 Antikörper auf die Monolayer- Integrität.....	52
4.3.2	Charakterisierung des Pathomechanismus des rekombinanten Anti-Dsg-3 Antikörpers h4B3	56
4.3.3	Effekt rekombinanter Anti-Dsg-3 Antikörper auf die Lokalisation und Organisation von Dsg-3 in hTert-Zellen.....	58
4.4	EFFEKT VON EFGARTIGIMOD AUF DIE VON REKOMBINANTEN ANTI-DSG-3- ANTIKÖRPERN BEEINFLUSSTE ZELLADHÄSION.....	62

4.4.1	<i>Effekt von Efgartigimod auf die von h4B3/hAK23 IgG1 beeinflusste Zelladhäsion</i>	62
4.4.2	<i>Einfluss von Efgartigimod auf die Expression von Dsg-3, -1 und FcRn</i>	67
5	DISKUSSION	70
5.1	DER KNOCK-OUT VON DSG-3 MITTELS CRISPR/Cas9-SYSTEM BRACHTE KEINE STABILEN DSG-3-DEFIZIENTEN HUMANEN KERATINOZYTEN HERVOR	70
5.2	DIE REKOMBINANTEN ANTI-DSG-3 ANTIKÖRPER H4B3 UND HAK23 IgG1 FÜHREN ZU EINER AKANTHOLYSE UND BEEINFLUSSEN DIE LOKALISATION VON DSG-3 IN HUMANEN KERATINOZYTEN	72
5.3	DER REKOMBINANTE ANTI-DSG-3 ANTIKÖRPER H4B3 FÜHRT ZU EINER REDUKTION DER DSG-3-EXPRESSION	75
5.4	EFGARTIGIMOD VERBESSERT DIE DURCH H4B3/HAK23 IgG1 REDUZIERTER INTERZELLULÄRE ADHÄSION IN hTERT-ZELLEN	76
5.5	DER ANTI-DSG-3-ANTI-KÖRPER H4B3 INDUZIERT EINE FcRn DEGRADATION	78
6	ZUSAMMENFASSUNG	80
7	SUMMARY	82
8	VERZEICHNISSE	83
8.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	83
8.2	TABELLENVERZEICHNIS	86
8.3	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	87
8.4	LITERATURVERZEICHNIS	89
9	ANHANG	109
9.1	NUTZUNGSGENEHMIGUNG VON ABBILDUNGEN	109
10	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	110
11	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	111
12	DANKSAGUNG	112
13	LEBENS-LAUF	113