
Bedeutung Autoantikörper-spezifischer Signalwege bei Pemphigus

Elias David Walter



München 2023

Aus der Anatomischen Anstalt, Lehrstuhl 1
- Vegetative Anatomie -
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Jens Waschke

Bedeutung Autoantikörper-spezifischer Signalwege bei Pemphigus

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Elias David Walter
aus Goch

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Jens Waschke
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Franziska Ruëff Prof. Dr. Edgar Meinel PD Dr. Robert Besch
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Prof. Dr. Volker Spindler
Dekan:	Prof. Dr. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	25.05.2023

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Haut	1
1.2	Schleimhaut	2
1.3	Zell-Zell Kontakte von Haut und Schleimhaut	3
1.3.1	Desmosomen	5
1.4	Pemphigus	9
1.4.1	Pemphigus vulgaris	10
1.4.2	Pemphigus foliaceus	10
1.4.3	Atypische Pemphigus-Phänotypen	12
1.4.4	Diagnose und Therapie	12
1.5	Pathomechanismen bei Pemphigus	13
1.6	Signalwege in der Pathogenese des Pemphigus	14
1.6.1	Intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationsanstieg	14
1.6.2	p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (p38MAPK)	15
1.6.3	Rous-Sarcoma-Virus-Kinase (Src-Kinase)	16
1.6.4	Epidermaler-Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)	17
1.6.5	Extrazelluläre Signalregulierte Kinase (ERK)	17
1.6.6	Cyclisches Adenosin-Monophosphat (cAMP)	18
2	Zielsetzung	19
3	Material	21
3.1	Zellen	21
3.2	Mediatoren	21
3.3	Chemikalien	22
3.4	Rezepte	24
3.5	Primär-Antikörper	26
3.6	Sekundär-Antikörper	28
3.7	Verbrauchsmaterialien	28

3.8	Geräte	29
4	Methoden	31
4.1	Zellkultur	31
4.1.1	Kryokonservierung der Zelllinien	32
4.1.2	Dsg1- und Dsg3- Expressionsmuster der Zelllinien	32
4.2	Patientenseren und Antikörperaufreinigung	33
4.2.1	Akquise und Ethik	33
4.2.2	Antikörperaufreinigung	33
4.3	Mediatoren zur Signalwegsmodulierung	34
4.4	Proteinbiochemische Methoden	34
4.4.1	Proteinextraktion und Triton-Zellfraktionierung	34
4.4.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	35
4.4.3	Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
4.4.4	Western Blot-Analyse	36
4.4.5	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest	37
4.5	Rasterkraftmikroskopie (AFM)	37
4.5.1	Desmoglein-Fc-Protein-Aufreinigung	38
4.5.2	Funktionalisierung der Messspitze und Oberfläche	38
4.5.3	Messung und Auswertung	39
4.6	Dispase-basierter Dissoziationsversuch	40
4.7	Fluoreszenz-basierte Mikroskopie	41
4.7.1	Indirekte Immunofluoreszenz	41
4.7.2	Fura-2 ratiometrische Ca^{2+} -Messung	42
4.8	CRISPR/Cas9-vermittelte Gen-Modifikation	43
4.8.1	Vektoren, Zellkultur und Transfektion	44
4.8.2	Phenol-Chloroform-DNA-Extraktion	45
4.9	Datenauswertung und Statistik	46
5	Ergebnisse	47
5.1	PV-Seren und Antikörpertiter	47
5.2	Autoantikörper-induzierte pathogene Veränderungen	48
5.3	Autoantikörper-spezifische Signalwege bei Phänotypen des Pemphigus	50
5.4	Abhängigkeiten zwischen verschiedenen Signalwegen	54
5.5	Funktionelle Relevanz der Signalwege für den Adhäsionsverlust	58
5.6	Signalmodulationen in Dsg2- und Dsg3-Knockout-Zelllinien	62
5.7	Direkte Inhibition homophiler Interaktionen	67

6 Diskussion	69
6.1 Autoantikörper-spezifische Signalwege bei Pemphigus	70
6.1.1 p38MAPK-Aktivierung	71
6.1.2 Intrazellulärer Ca ²⁺ -Einstrom	71
6.1.3 Die Src/EGFR-Aktivierung	72
6.1.4 ERK-Aktivierung	73
6.2 Signalwege bei atypischem Pemphigus	73
6.3 Korrelation direkter Inhibition mit Signalwegsaktivierungen	74
6.4 Relevanz der Signalwege für IgG-induzierten Adhäsionsverlust	75
6.5 Validierung der Signalwege in humanen <i>ex-vivo</i> -Organmodellen	76
6.6 Bedeutung von Dsg-Knockout-Zelllinien zur Evaluation der Signalwege	77
7 Zusammenfassung	81
Literaturverzeichnis	83
Abbildungsverzeichnis	111
Tabellenverzeichnis	113
Eidesstattliche Erklärung	115
Danksagung	116
Publikationsliste	119
Kongressbeiträge	123

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Haut

Die Hautdecke (lateinisch: *Integumentum commune*) ist das größte Organ des Menschen und umfasst eine Fläche von durchschnittlich 2 m^2 . Ihre Hauptaufgabe ist unter anderem durch ihre Lage als Grenzorgan zwischen Mensch und Umwelt definiert. Diese äußert sich vor allem im Schutz vor jeglichen Umweltkomponenten, der Homeostase des Wasser- und Elektrolythaushaltes, der Thermoregulation und letztlich auch der Wahrnehmung durch verschiedene ansässige Sinnesrezeptoren. Ein komplizierter mehrschichtiger Aufbau gewährleistet ihre Integrität und Funktion [1, 2].

Die Haut (*Kutis*) und die Unterhaut (*Subkutis*) bilden zusammen die Hautdecke. Die Kutis unterteilt sich wiederum in zwei Schichten: die an die Unterhaut angrenzende bindegewebige Lederhaut (*Dermis*) und die äußere epitheliale Oberhaut (*Epidermis*), welche für diese Arbeit relevant ist [1, 2].

Die Subkutis, die unterste Schicht der Hautdecke, besteht aus Fettgewebe, das durch Bindegewebssepten in Lappen und Läppchen aufgeteilt ist und dadurch die Haut an Faszie oder Periost verankert. Insgesamt dient sie als Verschiebeschicht der Hautdecke, während das Fettgewebe vor allem die Wärmeisolation vermittelt. Ihre reiche Vaskularisierung durch Gefäße, welche sich in die oberen Schichten aufteilen, gewährleistet eine suffiziente Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des gesamten Organs [1, 2].

Die Dermis ist die Verbindungsschicht der Subkutis zur Epidermis und besteht vor allem aus Kollagenfaserbündeln und elastischen Fasern. Aus diesem Grund zeichnet sie sich durch eine hohe Reißfestigkeit und Elastizität aus. Zusätzlich beinhaltet die Dermis die Gefäße und Nerven der Haut. Arteriolen sind horizontal in einen tiefen und einen oberflächlichen Plexus organisiert, die durch vertikale Gefäße miteinander verbunden sind und über Mikrozirkulation die Epidermis vom oberen Plexus aus versorgen. Die Innervation beschränkt sich auf sympathische Nerven zur Regulation der Drüsen, Haarmuskeln und Gefäße, während sensible

Fasern Mechanorezeption und Nozizeption vermitteln [1, 2].

Als oberste Schicht der Haut bildet die Epidermis die Barriere des Körpers zur Umwelt. Sie liegt einer dichten Basalmembran (dermoepidermale Junctionszone) auf und ist dort mithilfe von Hemidesmosomen verankert. Ihr zellulärer Hauptbestandteil sind Keratinozyten, welche in ihrem Lebenszyklus durch einen komplexen Prozess aus Proliferation und Differenzierung die verschiedenen Schichten der Epidermis bilden und dadurch die Integrität und Homeostase der Epidermis gewährleisten. Da der Differenzierungsprozess der Epidermis in einer Verhornung endet, ist sie das einzige Gewebe des Menschen, das als mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel klassifiziert wird [3].

An die Basalmembran grenzt die basale Epithelschicht (*Stratum basale*, SB), in der sich teilungsfähige Stammzellen befinden. Diese produzieren teilungsfreudige Vorläuferzellen, aus denen folgend postmitotische Keratinozyten hervorgehen. In diesem Stadium beginnen Keratinozyten zu differenzieren und durchwandern die weiteren Schichten der Epidermis [1, 2].

In der aufliegenden Stachelzellschicht (*Stratum spinosum*, SS) existieren nur noch einzelne proliferierende Keratinozyten. Die Zellen bilden stachelförmige Ausläufer, die mithilfe von Desmosomen ineinander verzahnt sind und die Zellhaftung der Haut garantieren.

Oberhalb des *Stratum spinosum* schließen sich drei Zelllagen keratohyalin granula-enthaltende, plattenförmige Keratinozyten an: die Körnerschicht (*Stratum granulosum*, SG) der Epidermis. Sie bilden Lamellarkörperchen, welche Lipide und Proteine enthalten und in den Interzellularspalt sezerniert werden können, um zur Wasserbarriere der Haut beizutragen [1, 2].

Die Hornschicht (*Stratum corneum*, SC) bildet die oberste Schicht der Epidermis. Tote kern- und organellose Keratinozyten (Korneozyten) können bis zu 100 Lagen bilden und stellen die äußerste Barriere der Haut dar. Diese werden im ähnlich schnellen Rhythmus abgeschilfert, wie im *Stratum basale* neue Keratinozyten gebildet werden [1, 2].

1.2 Schleimhaut

Schleimhaut (*Tunica mucosa*) kleidet die Innenfläche von Hohlorganen mit gewebsspezifisch unterschiedlicher Struktur aus. Sie dient dem mechanischem, chemischem sowie mikrobiellem Schutz, während sie trotzdem Resorptionsprozesse ermöglicht [6]. Sie zeichnet sich durch eine Epithelschicht (*Lamina epithelialis mucosae*) auf einer lockeren Bindegewebsschicht (*Lamina propria mucosae*) aus, die meistens einer dünnen Muskelschicht (*Lamina muscularis mucosae*) aufliegt [1].

In einigen Organen wie der Mundschleimhaut besteht die Epithelschicht aus mehrschichtigem Plattenepithel. Während in mechanisch hochbeanspruchten Bereichen wie der mastikatorischen Mukosa eine Verhornung auftritt und der Schichtaufbau dem der Epidermis mit SB, SS, SG, und SC entspricht (Abb. 1), ist sie in vielen Arealen wie der Wangenschleimhaut

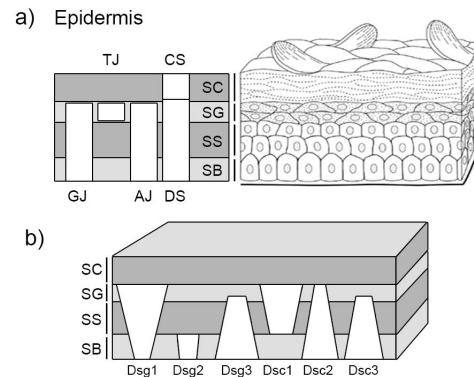


Abbildung 1: *Die Epidermis*

a) Schematische Darstellung der Epidermis mit *Stratum basale* (SB), *Stratum spinosum* (SS), *Stratum granulosum* (SG) und *Stratum corneum* (SC). Auftreten der Zell-Zell Kontakte mit Verschlusskontakten (TJ) im SG und Corneodesmosomen (CS) im SC. Adhärenzjunctionen (AJ) und Nexus (GJ) finden sich zwischen SB und SG, während Desmosomen (DS) in allen lebenden Schichten zwischen SB und SC vorhanden sind. b) Expressionsmuster desmosomaler Cadherine in den Schichten der Epidermis. Die Größe und Lokalisation der weißen Balken stellt proportional die Proteinmenge dar. Mit Genehmigung modifiziert aus Spindler und Waschke 2018 [4].

aber auch dem Ösophagus nicht keratinisiert, wodurch sie dort als mehrschichtig unverhorntes Plattenepithel klassifiziert wird. Diese ist histologisch in drei Schichten unterteilt: Auf das *Stratum basale* (SB) folgt ein *Stratum intermedium* (SI) und anschließend ein *Stratum superficiale* (SSf) (Abb. 2). Im Verlauf der Differenzierung flachen die Zellen ab und ihr Keratingehalt steigt. Gleichzeitig schrumpfen die Zellen, verringern ihre Desmosomenanzahl und schilfern letztlich ab. Während des Vorgangs bleiben die Zellkerne jedoch im Gegensatz zum verhornten Plattenepithel intakt. Durch den unterschiedlichen Differenzierungsvorgang unterscheidet sich auch der zelluläre molekulare Aufbau der beiden Gewebetypen [7, 8].

1.3 Zell-Zell Kontakte von Haut und Schleimhaut

Zell-Zell Kontakte sind mitunter die wichtigsten Elemente, um multizelluläre Organismen und dreidimensionale Gewebe zu bilden und daher essenziell für die Integrität und Morphogenese der Haut [9]. Sie ermöglichen die Kommunikation von Zellen mithilfe von Kommunikationskontakten, während Haftkontakte die Gewebe zusammenhalten und deren Architektur bestimmen. Verschlusskontakte dichten den parazellulären Bereich ab und bilden die Barriere der Gewebe aus. Viele dieser Junctionen beeinflussen sich gegenseitig und ihr Verlust kann zu schweren Erkrankungen der Haut und Schleimhaut führen [10].

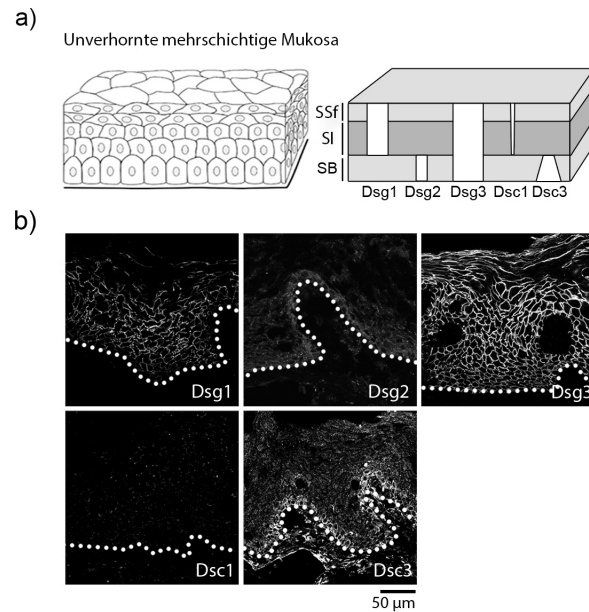


Abbildung 2: *Die Schleimhaut*

a) Schematische Darstellung des mehrschichtig ungerhornten Plattenepitels der Wangenschleimhaut mit *Stratum basale* (SB), *Stratum intermedium* (SI) und *Stratum superficiale* (SSf). Die desmosomale Komposition der Proteine ist proportional mithilfe weißer Balken dargestellt. b) Immunfluoreszenzbilder von explantierter Schleimhaut gefärbt mit Antikörpern gegen desmosomale Proteine zeigen die jeweiligen Proteinmengen und deren Lokalisation. Die gepunktete Linie stellt jeweils die Basalmembran dar ($n = 3$). Mit Genehmigung modifiziert aus Spindler und Waschke, 2018 [4] und Egu et al., 2019 [5].

Die Homeostase, Morphogenese und auch die kollektive Reaktion auf pathogene Vorgänge wie Wunden erfordert in multizellulären Verbänden parazelluläre Kommunikation und Stoffaustausch. Dazu dienen spezifische Kommunikationskontakte, die Nexus (engl.: *Gap junctions*) genannt werden. Sie bestehen aus verschiedenen Proteinen der Connexin-Gruppe, welche im Endoplasmatischen Retikulum einen Hemikanal, das Connexon, ausbilden, das anschließend in die Plasmamembran transportiert wird [11]. Dort können sie entweder den Extrazellulärraum mit dem Intrazellulärraum der Zelle verbinden oder an juxtapositionierten Connexonen einen vollständigen Kanal ausbilden, wozu sich die Plasmamembranen zweier Zellen auf ungefähr 2-4 nm annähern [12]. Eine größenregulierbare zentrale Pore ermöglicht den Austausch von Wasser, Metaboliten und anderen Ionen bis zu einer Größe von 1 Kilodalton (kDa). Mehrere Kanäle bilden zusammen die junctionale Struktur des Nexus aus. Ihre Häufigkeit steigt vom SB zum SG, wobei im SC keine Kommunikationskontakte existieren (Abb. 1)

[13].

Adhärensjunktionen (AJ) gehören der Gruppe der Haftkomplexe an. Sie bestehen charakteristisch aus zwei parallelverlaufenden, 200-500 nm langen Membranabschnitten, die ca. 20 nm voneinander entfernt liegen. Sie können als Punkte (*Punctum adherens*), Gürtel (*Zonula adherens*) oder Platten (*Fascia adherens*) auftreten und befinden sich in der erstgenannten Form gleichmäßig in allen Schichten der Epidermis (Abb. 1). Ihre Aufgabe ist die Regulierung der Zell-Zell Haftung während dynamischer Vorgänge wie Proliferation oder Extrusion, wodurch sie maßgeblich an der Homeostase und Morphogenese von epithelialen Geweben beteiligt sind [14]. Zusätzlich spielen sie eine große Rolle in der Bildung und Aufrechterhaltung von Desmosomen und Verschlusskontakten. Zwei verschiedene molekulare Komplexe gewährleisten diese Funktion: Der Nectin–Afadin-Komplex, der für die Bildung von hochorganisierten Junktionen notwendig ist, sowie der Cadherin-Catenin Komplex als adhäsive Kernkomponente. Beide Komplexe bestehen aus gewebsspezifisch unterschiedlich exprimierten Transmembranproteinen (Nectine oder Cadherine), die über Ankerproteine (Afadin oder Catenine) mit dem Aktin-Zytoskelett der Zelle verbunden sind. In Epithelien und dementsprechend der Epidermis ist vor allem Epitheliales-Cadherin (E-Cadherin) als klassisches Cadherin der AJ vorhanden [15].

Verschlusskontakte (*Zonula occludens*) sind am Apex der lateralen Membran meist oberhalb der AJ in polarisierten Geweben zu finden. In der Epidermis sind sie nur in der zweiten Zellschicht des SG vollständig ausgebildet [16] (Abb. 1). Elektronenmikroskopisch zeichnet sich ihre Struktur als zwei eng-beieinanderliegende Membranabschnitte ab, die teils miteinander fusioniert erscheinen. In Gefrierbrüchen stellen sich die Verschlusskontakte als strangartige, gitterförmige Schlussleisten dar. Ebenso wie andere Junktionen bestehen sie aus Transmembran- und intrazellulären Verankerungsproteinen. Ihre Transmembranproteine sind Claudine, Junktionale Adhäsions-Moleküle (JAM) und Occludin, während sie über Zonula Occludens (ZO) - Proteine und Cingulin an das Aktin-Zytoskelett verankert sind. Ihre Funktion kann mit einem Tor und Zaun verglichen werden, indem der parazelluläre Raum von apikal nach basal abgedichtet und damit selektiv die Permeabilität für Ionen, Moleküle und Wasser reguliert wird [1, 17].

1.3.1 Desmosomen

Desmosomen sind makromolekulare Proteinkomplexe, die vor allem in Geweben mit hoher mechanischer Belastung die Zell-Zell Haftung gewährleisten und regulieren. Ihr Name stammt aus dem Griechischen von *Desmos* (die Bindung) und *Soma* (der Körper) ab [18]. Während molekulare Unterschiede in verschiedenen Geweben existieren, ist der grundlegende Aufbau der Desmosomen konserviert. Sie haben eine charakteristische elektronenmikroskopische Darstellung, deren elektronendichten Bereiche den Interaktionsstellen der einzelnen desmosomalen

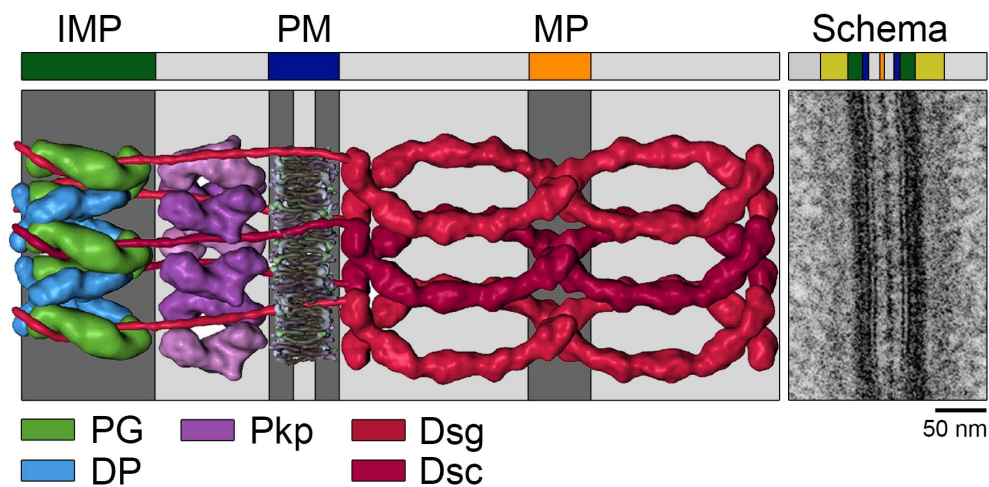


Abbildung 3: *Das Desmosom*

Schematische Darstellung der Struktur eines Desmosoms mit modellierter 3D-Struktur der desmosomalen Proteine links und elektronenmikroskopischer Ultrastruktur rechts. (Dsg und Dsc = Rot; PKP = Lila; PG = Grün; DP = Blau) Das Mesophragma (MP) ist in der schematischen Darstellung orange markiert und die Plasmamembran (PM) blau. Die innere Membranplaque (IMP) befindet sich angrenzend an die Plasmamembran und ist in grün dargestellt. Darauf folgt die äußere Membranplaque als Bindungsstelle zum Intermediärfilamentsystem in gelb. Mit Genehmigung modifiziert aus Al-Amoudi et al. 2011 [19] und Getsios et al. 2004 [20].

Proteine zugeordnet werden können (Abb. 3). Desmosomale Cadherine interagieren an ihrem extrazellulären N-Terminus und stellen die Verbindung zweier gegenüberliegender Zellen miteinander her, sodass eine elektronendichte Mittellinie (Mesophragma (MP)) sichtbar wird. Die Cadherine sind intrazellulär am C-Terminus an plasmamembran-angrenzende Plaquelproteine fixiert, wodurch die innere Membranplaque (IMP) ausgebildet wird. Die Verankerung an das Intermediärfilamentskelett ist elektronenmikroskopisch als äußere Membranplaque (ÄMP) sichtbar [19, 20].

Desmosomale Cadherine

Cadherine sind transmembrane Glykoproteine die Ca^{2+} -abhängig Zell-Zell Adhäsion vermitteln. Der Name ist daher eine Mischung aus den beiden englischen Wörtern *calcium* und *adhering*. Sie werden in vier verschiedene Subgruppen eingeteilt: Klassische Cadherine, Desmosomale Cadherine, Protocadherine und atypische Cadherine. Klassische Cadherine sind Teile der Adhärenzjunctionen und sind in der Haut vor allem durch E-Cadherin sowie im SB Plazentares-Cadherin (P-Cadherin) vertreten, während desmosomale Cadherine die

Transmembranproteine der Desmosomen darstellen [21].

Gewebespezifisch ist die Expression der verschiedenen desmosomalen Cadherine unterschiedlich. Während in vielen Geweben wie im Herzen und dem Darm ausschließlich Desmoglein (Dsg) 2 und Desmocollin (Dsc) 2 exprimiert werden, sind in den mehrschichtigen Epithelien Dsg1 - 4 sowie Dsc1 - 3 zu finden.

Die Expressionsmuster dieser Isoformen unterscheiden sich in der Haut nach Differenzierungsgrad und demnach Schicht in der Epidermis (Abb. 1). In den untersten Schichten findet man hauptsächlich Dsg3 und Dsc3, welche im Verlauf der Differenzierung abnehmen, während sich die Desmosomenkomposition in den oberen Schichten zu Dsg1 und Dsc1 verändert. Dsg2 wird vor allem in Haarfollikeln, aber auch im SB in geringer Menge, an der Membran gefunden [22]. In der mehrschichtigen unverhornten Schleimhaut befindet sich Dsg3 in allen Schichten in großer Menge, während Dsg1 ausschließlich in geringer Menge im SI und SSf detektiert werden kann. Dsg2 und Dsc3 finden sich nur im SB, während Dsc1 sporadisch in den oberen Schichten lokalisiert ist (Abb. 2). Das N-terminale Ende der Cadherine liegt im Extrazellulärraum und besteht aus fünf Ectodomänen (EC 1 - 5), die sich strukturell stark ähneln, und an jeder Kontaktstelle durch drei Ca^{2+} -Ionen stabilisiert werden [23]. Eine kurze, einfache Transmembrandomäne durchdringt die Plasmamembran und wird gefolgt von mehreren intrazellulären Domänen, die das Cadherin über Plaqueproteine am Keratinzytoskelett verankern. An diese Domänen, die für die unterschiedlichen Isoformen unterschiedlich sind, können außerdem Signalproteine binden, die dort für desmosomale Regulation verantwortlich sind [24]. Die Lokalisation der Desmogleine ist nicht nur auf Desmosomen beschränkt, sondern sie können auch in Membranabschnitten ohne Desmosomen am Aktin-Zytoskelett verankert auftreten [25]. Diesem extradesmosomalem Dsg3 wird vor allem eine Signalfunktion im Sinne eines „*Outside-in signaling*“ und die Beteiligung bei der Bildung neuer Desmosomen zugeschrieben [26].

Die Interaktion zweier Cadherine und dementsprechend zweier Zellen wird über die EC 1 Domäne vermittelt, indem jeweils ein Tryptophan β -Strang zwischen den Proteinen ausgetauscht und in einer hydrophoben Tasche des jeweiligen Partnermoleküls verankert wird [27]. Jedoch können Cadherine auch an derselben Membran schwach miteinander in cis-Konformation interagieren [28]. Während zellfrei in Aggregationsversuchen Dsg1 und Dsg2 ausschließlich heterophile Bindungen mit Desmocollin eingehen konnten [29, 30], überwiegen in Studien mit Rasterkraftmikroskopie homophile Interaktionen [31, 32, 33]. Für Dsg2 wurde mit Rasterkraftmikroskopie bestätigt, dass es neben homophilen Interaktionen auch heterophile Interaktionen mit Dsc2 sowie E-Cadherin und N-Cadherin geben kann [34, 35]. Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass desmosomale Cadherine sowohl homophile als auch heterophile Bindungen eingehen können [36, 24]

Desmosomaler Plaque

Der desmosomale Plaque ist aufgebaut aus Proteinen der Armadillo- und der Plakin-Familie, welche als Ankerproteine die Cadherine an das Intermediärfilamentsystem binden. Plakoglobin (PG) und Plakophiline (PKP 1-3) sind Teil der Armadillo-Familie, die sich durch Wiederholungen einer 42 Aminosäuren langen Arm-Sequenz kennzeichnen [37].

Bei PG verbinden 12 Arm-Sequenzen einen Amino (N)- und Carboxy (C)-Terminus. Die Bindung zum flexiblen cytoplasmatischen Anteil von Dsg wird dabei durch den N-Terminus vermittelt, während für die Bindung zu Dsc weitere Arm-Sequenzen am C-Terminus zur Verfügung stehen [38, 39]. Funktionell wird PG eine Rolle im Aufbau von Desmosomen zugeschrieben, welche bei Proteinverlust zu verringerter Adhäsion und unter anderem epidermaler Spaltbildung führt [40]. Spezifischer wird vermutet, dass PG als Vorlage die Organisation der Cadherine vorgibt und anschließend als Gerüst für die weiteren desmosomalen Plaqueproteine fungiert [19]. Zusätzlich werden dem Protein Signalfunktionen zugeschrieben und es kann auch mit E-Cadherin in Adhärenzjunctionen interagieren [41].

Die zweite Gruppe der Armadillo-Proteine stellt PKP mit drei Isoformen dar. In mehrschichtigen Plattenepithelen ist die Expression der PKPs ebenfalls differenzierungsabhängig. In allen Schichten befindet sich PKP 3 gleichmäßig verteilt, während PKP 2 nur geringfügig im SB exprimiert wird und die PKP 1-Proteinmenge von suprabasal nach apikal ansteigt. Dadurch lassen sich auch in Teilen die Funktionen der verschiedenen Proteine ableiten. PKP 3 wird für den Aufbau von Desmosomen benötigt und existiert an der Membran vor der Etablierung von stabilen Desmosomen [42]. Auf der anderen Seite moduliert PKP 1 etablierte Desmosomen in ihrer Größe, Anzahl sowie Keratinverankerung über Vernetzung der desmosomalen Einzelkomponenten [43, 44].

Desmoplakin (DP) aus der Plakin-Familie stellt schlussendlich die Schlüsselverbindung zum Keratinzytoskelett dar. Auf den globulären N-Terminus, der PG und PKP bindet, folgt eine zentrale α -helikale stäbchenförmige Doppelwendel, die über den globulären C-Terminus mit dem Intermediärfilamentskelett verbunden ist [37]. Funktionell ist DP durch einen Beitrag zur Vernetzung und Stabilisierung der desmosomalen Einzelkomponenten unabdinglich für die Existenz von Desmosomen und damit für die Zelladhäsion [45].

Intermediärfilamentskelett

Das Intermediärfilamentsystem (IF) ist Teil des Zytoskeletts und unterstützt die Form und Struktur von Zellen [46]. Es reguliert mechanische Eigenschaften wie deren Steifheit und Motilität [47]. Ein zell- und organellspezifisches Expressionsmuster kennzeichnet ihre Diversität. In der Epidermis bestehen die Filamente aus Paaren verschiedener Typ 1 und Typ 2 Keratine, die ebenso wie desmosomale Cadherine differenzierungsabhängig unterschiedlich exprimiert werden. Im SB werden vor allem Keratin 5 (Typ 2) und Keratin 14 (Typ 1) exprimiert, welche

im Verlauf der Differenzierung zu Keratin 1 (Typ 2) und 10 (Typ 1) wechseln [48]. Ihre Masse macht ungefähr 17-27% aller Proteine der basalen und bis zu 50% aller Proteine der voll-differenzierten Keratinozyten aus [49]. Eine Vielzahl an Krankheiten sind mit Mutationen in Intermediärfilamentskelettgenen assoziiert, wie unter anderem die blasenbildende Hauterkrankung Epidermolysis bullosa, Kardiomyopathien oder auch neurodegenerative Erkrankungen [48, 50](<http://www.interfil.org/diseases.php>).

1.4 Pemphigus

Die bullösen Dermatosen sind eine Gruppe von Krankheiten, die durch unterschiedliche Auslöser die Zelladhäsion in verschiedenen Schichten der Haut und Schleimhaut kompromittieren und damit klinisch zu der primären Effloreszenz einer Blase (*Bulla*) führen. Die hier relevante Hauptgruppe ist die Autoimmundermatose Pemphigus mit ihren verschiedenen Phänotypen. Autoantikörper gegen die desmosomalen Cadherine Dsg1 und Dsg3 führen dabei zu Spaltbildung in der Epidermis und mehrschichtigen Mukosa [51].

Pemphigus leitet sich vom griechischen $\pi\epsilon\mu\phi\iota\xi$ (Pemphix, dt.: die Blase) ab. Erste Erwähnungen des Wortes können bereits 460-370 v. Chr. von Hippocrates als Beschreibung einer Form des Fiebers gefunden werden, wobei die Krankheit im Jahr 1791 das erste Mal mit Blasenbildung assoziiert wurde [52]. Histologisch und klinisch wurde 1953 die Gruppe der Pemphiguserkrankungen von den Pemphigoiderkrankungen abgegrenzt [53]. Die Ursache für die Blasenbildung war zu diesem Zeitpunkt jedoch unklar, sodass der Nachweis von Serumantikörpern mithilfe indirekter Immunfluoreszenz erstmals 1964 bei 13 verschiedenen Patienten mit Pemphigus vulgaris die Krankheit als Autoimmundermatose klassifizierte [54]. Als Antigen wurde später ein 130kDa großes Protein, damals Pemphigus vulgaris-Antigen (PVA), bestimmt [55], das aufgrund seiner cadherinähnlichen Struktur später Dsg3 getauft wurde [56]. Ein zweites Antigen mit einer Größe von 160kDa wurde kurze Zeit danach als Dsg1 identifiziert [57]. Diese Autoantikörper sind größtenteils vom Typ Immunglobulin G (IgG) [58].

Die Ätiologie der Erkrankung ist, wie bei vielen anderen Autoimmunerkrankungen, nicht vollständig verstanden. In der jüdischen Bevölkerung ist jedoch die Prävalenz der Krankheit deutlich erhöht, wodurch eine genetische Prädisposition angedeutet wird. Tatsächlich wurde eine genetische Assoziation mit den Humanen Leukozyten Klasse II-Antigenen (HLA) HLA-DRB1*04:02 und HLA-DQB1*05:03, sowie HLA-G und Transporter assoziierten Antigen-Prozessierungs (TAP)-Genen gefunden [59, 60, 61]. Zu den assoziierten non-HLA-Genen gehört außerdem Suppression of Tumorigenicity 18 (ST18), welches durch erhöhte Expression zur Verstärkung des Phänotypes führt [62, 63]. Unabhängig davon werden Umweltfaktoren, Infektionen, Tumore und Medikamente als Ursachen diskutiert [64]. Verschiedene Phänotypen

des Pemphigus zeigen in Abhängigkeit von ihrem aDsg1- und aDsg3-Antikörperprofil unterschiedliche histologische und klinische Charakteristika, sodass auf die häufigsten und für diese Arbeit Relevanten klinischen Phänotypen folgend genauer eingegangen wird.

1.4.1 Pemphigus vulgaris

Mit einer Inzidenzrate von 0.1-0.5 pro 100 000 Menschen ist Pemphigus vulgaris (PV) der am meisten verbreitete Phänotyp der Pemphigus-Erkrankungen. Durchschnittlich beginnt die Krankheit zwischen der 4. und 6. Lebensdekade ohne Geschlechtspräferenz [65]. Histologisch äußert sie sich in einer suprabasalen Spaltbildung, die vom Antikörperprofil abhängig ist (Fig. 4). Dabei begrenzt sich beim mukosa-dominanten Phänotypen die Blasenbildung auf die mehrschichtige unverhornte Mukosa bei Anwesenheit von anti-Desmoglein (aDsg) 3-Antikörpern, während ein mukokutaner Phänotyp mit zusätzlicher Beteiligung der Epidermis bei der Anwesenheit von sowohl aDsg3- als auch aDsg1-Antikörpern besteht [66]. Oftmals breitet sich in zeitlicher Abfolge das Antikörperprofil von aDsg3- auf zusätzlich aDsg1-Antikörper durch sogenanntes „*Epitope Spreading*“ aus, was mit Erweiterung von der mukosalen auf die mukokutane Form einhergeht [67].

Klinisch äußert sich der mukosa-dominante Pemphigus vulgaris (mPV) durch schmerzhafte Erosionen vor allem in der Mund- und Genitalschleimhaut, sowie seltener auch der Konjunktiva [65]. Außerdem können Lippen, Pharynx, Gingiva und Gaumen betroffen sein. Dadurch ist die Lebensqualität der Patienten vor allem durch gestörte Nahrungsaufnahme und beim Sprechen enorm eingeschränkt. Nebeneffekte der Erkrankung beinhalten Mundgeruch (*Foetor ex Ore*), blutigen Speichel und Speichelausfluss aus dem Mund (*Sialorrhö*) [51].

Der mukokutane Pemphigus vulgaris (mcPV) äußert sich durch suprabasale intraepidermale schlaaffe Blasen, die vor allem an Rumpf und Hornhaut zu finden sind. Im Verlauf der Krankheit können diese aufbrechen, wodurch schmerzhafte Erosionen entstehen. Unbehandelt verläuft die Krankheit aufgrund von Infektionen der Erosionen und Unterernährung meist innerhalb von 5 Jahren tödlich [51].

1.4.2 Pemphigus foliaceus

Ein weiterer Subtyp der Pemphiguserkrankungen stellt der Pemphigus foliaceus (PF) dar. Hierbei führen aDsg1-Antikörper zu superfiziellen, subkornealen flachen Blasen in der Epidermis ohne aDsg3-Antikörper und damit ohne Beteiligung der Mukosa (Abb. 4). Hauptlokalisierung der Blasen sind drüsenreiche Bereiche der Haut wie die frontale Kopfhaut, das Gesicht, die Schultern und die Brust. Im Verlauf der Krankheit leiden Patienten weiterhin unter einer plaqueartigen Verdickung des SC (Hyperkeratose) und schuppenartigen Krusten [65]. Neben der sporadischen Form existiert in Teilen Südamerikas, vor allem entlang Flussbereichen in Brasilien, eine endemische Variante (*Fogo Selvagem*, dt: wildes Feuer) [68], die durch Sti-

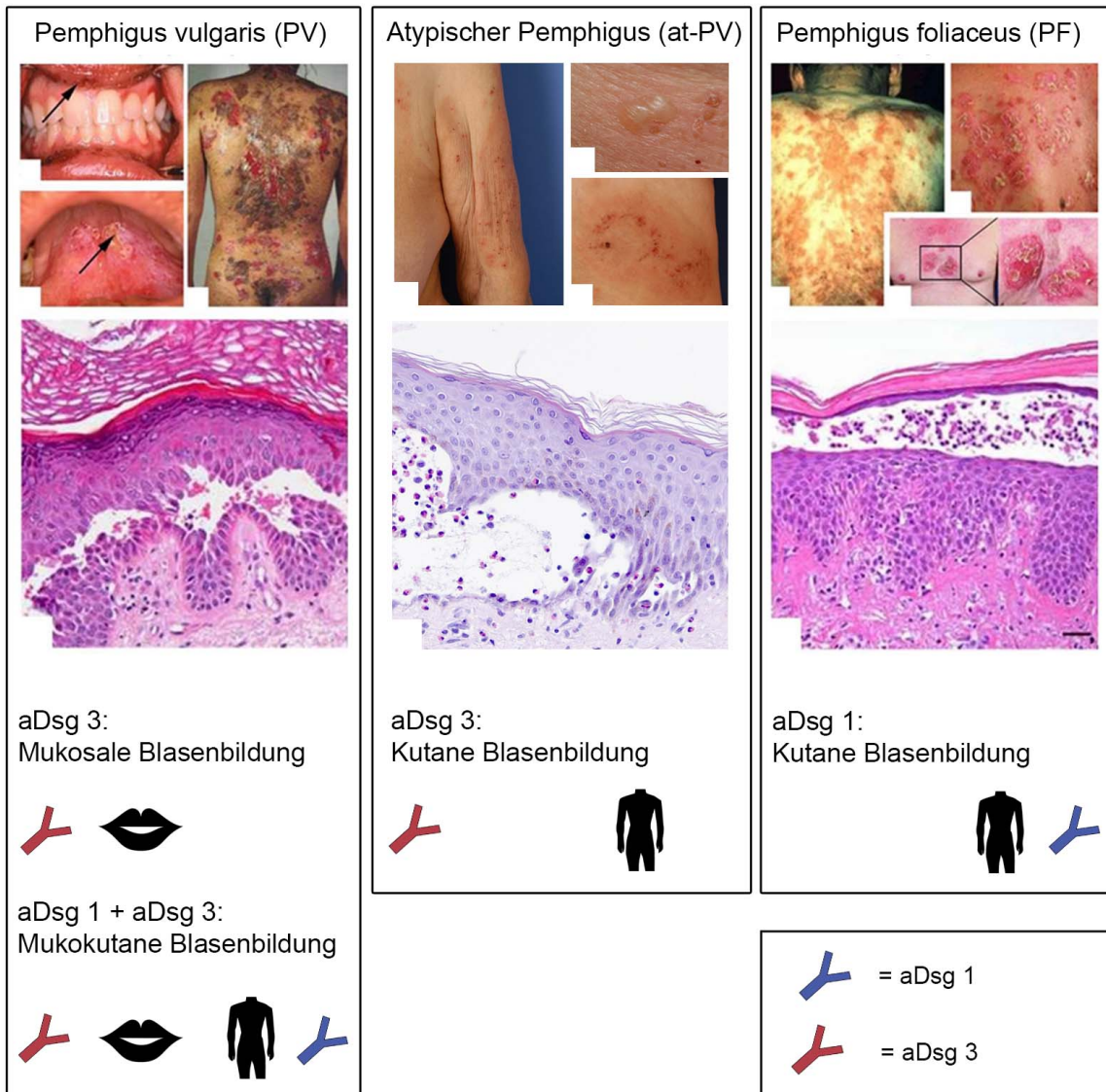


Abbildung 4: Schematische Zusammenfassung der Pemphigus-Phänotypen

Fotografische Aufnahmen von klinischen Manifestationen der verschiedenen Pemphigus Phänotypen. Mittig Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbungen läSIONALER Haut mit sichtbarer intraepidermaler Spaltbildung. Schematische Zusammenfassung des Antikörperprofils und Organspezifität der Phänotypen unten. Mit Genehmigung modifiziert aus Waschke 2008 [18] und Kneisel et al. 2011 [65].

che hämatophagischer Stechmücken wie zum Beispiel der Schwarzen Stechmücke (*Simulium nigritanum*) oder der Sandfliege (*Lutzomyia longipalpis*) ausgelöst wird. Es wird postuliert, dass genetische Prädisposition sowie Proteine des Speichels der Fliege zu einer Immunantwort gegen LJM11 mit Kreuzreaktivität gegen Dsg1 zum Ausbruch der Krankheit führen [69]. Die Symptome der beiden Typen ähneln sich stark, wobei die Prävalenz der endemischen Form eher bei Kindern und jungen Erwachsenen liegt [51].

1.4.3 Atypische Pemphigus-Phänotypen

Seltener treten bei Patienten atypische Phänotypen (atPV) auf, die nicht mit den klinischen und serologischen Charakteristika der anderen Phänotypen übereinstimmen [70, 71]. Bisher konnte jedoch noch nicht eindeutig bestimmt werden, welche Faktoren und Pathomechanismen zu diesen atypischen Varianten der Krankheit beitragen, wobei bei einigen Patienten aDsc3-Antikörper detektiert und die Pathogenität dieser Antikörper *in vitro* nachgewiesen werden konnte [72, 73, 74]. Das Auftreten von Dsc-Antikörpern bei Patienten unter Anwesenheit zusätzlicher Dsg-Antikörper scheint jedoch selten zu sein [75]. Trotz ähnlichen Titern und Reaktivitäten zu ähnlichen Extrazellulärdomänen von Dsg3 können Antikörper mit geringer Pathogenität auf Keratinozyten wirken, was ebenfalls als Auslöser für atypische Patientenfälle diskutiert wird [76]. Gleichermaßen existieren verschiedenste nicht desmosomale Autoantikörper, die zum Teil mit anderen blasenbildenden Hauterkrankungen wie Morbus Hailey-Hailey korrelieren und zur phänotypischen Ausprägung beitragen könnten [77]. Zu dieser Gruppe gehören auch mitochondriale Antikörper [78], Acetylcholinrezeptorantikörper [79] und Thyroidperoxidaseantikörper (TPO) [80]. Die Pathogenität und Beteiligung dieser Immunglobuline in der Pemphigus-Pathogenese ist jedoch noch umstritten.

1.4.4 Diagnose und Therapie

Zu der Diagnose der Pemphiguserkrankungen werden verschiedenen Charakteristika der Erkrankung histologisch und serologisch nachgewiesen [81]. Zur Bestimmung der Antikörperdeposition werden Hautbiopsien von periläsionaler Haut mittels direkter Immunfluoreszenz angefärbt. Dabei deutet ein membranähnliches Färbungsmuster in Keratinozyten der Epidermis die Anwesenheit von desmosomalen Antikörpern an. Zusätzlich können Serumantikörper auf verschiedenen Substraten wie Affenösophagus oder menschlicher Haut mittels indirekter Immunfluoreszenz und spezifischer durch Dsg3/1-enzymgekoppelte Immunadsorptionstests (ELISA) nachgewiesen werden [82]. Der Tzank-Test beschreibt die Gewinnung und den Nachweis von akantiholytischen Zellen mittels Abstrich aus offenen Blasen. Außerdem deutet ein positives Nikolsky-Zeichen die Krankheit an. Dazu wird mechanischer Druck an gesunden Bereichen der Haut appliziert, was bei Pemphigus-positiven Patienten in einer Blase resultiert [51].

Therapeutisch sind bisher keine spezifischen oder kausalen Therapien bekannt, sodass vor allem immunmodulatorisch behandelt wird. Dabei kommen hochdosierte Glukokortikoide (1,0- 1,5 mg/kg/d Prednisolon) zum Einsatz, die oft durch nicht-steroidale Immunsuppressiva ergänzt werden [83]. Längere Behandlungen durch steroidale Immunsuppression kann jedoch zu erhöhter Infektionsgefahr führen und ein medikamentös-induziertes Cushing-Syndrom sowie Diabetes mellitus auslösen [81]. Deswegen werden neue Therapieansätze entwickelt und verwendet, die auf autoreaktive B-Zellen oder direkt auf Autoantikörper abzielen [84]. Mittels Immunadsorption können zirkulierende Antikörper kurzzeitig aus dem Blut gefiltert werden, sodass eine Remission schneller eintreten kann. Neuere Studien zeigen, dass mithilfe von Rituximab, einem B-Zell-depletierenden anti-CD20 Antikörper, in Kombination mit geringerer Immunsuppression eine vollständige Remission innerhalb von zwei Jahren erzielt werden kann. Auch dabei können jedoch durch langlebige Plasmazellen und persistierende B-Zellen Rezidive auftreten [85, 84]. Schlussendlich konnte die Letalität der Erkrankung durch die verschiedenen Therapieoptionen stark reduziert werden.

1.5 Pathomechanismen bei Pemphigus

Die Pathogenese des Pemphigus ist komplex und noch nicht vollständig verstanden. Sie setzt sich aus strukturellen Veränderungen in Keratinozyten, Autoantikörper-vermittelter direkter Inhibition der Dsg-Interaktionen und zellulären Signalmechanismen zusammen, die letztlich zu zellulärem Adhäsionsverlust, intraepithelialer Spaltbildung und letztlich Blasenbildung führen [4].

Strukturelle Veränderungen der Desmosomenkomposition nach Autoantikörperkontakt wurden vermehrt untersucht, nachdem in elektronenmikroskopischen Aufnahmen nachgewiesen wurde, dass Patientenautoantikörper an die Oberfläche von Keratinozyten und spezifischer in der Desmoglea von Desmosomen binden können [86]. Zuvor hatten bereits etliche elektronenmikroskopische Bilder morphologische Auffälligkeiten von Desmosomen gezeigt [87, 88]. Durch Pemphigus-IgG wird die Desmosomenanzahl und die Größe der verbleibenden Desmosomen reduziert, der Interzellulärraum in desmosomfreien Bereichen verbreitert und die Keratinfilamentinsertionen reduziert, sodass Keratinfilamente im perinukleären Bereich konzentrieren [89, 90]. Diese Veränderungen sind ebenfalls auf Proteinebene zu beobachten. Nach IgG-Bindung fragmentieren die Immunfärbungen Dsg1 und Dsg3 an der Membran, wobei die Moleküle von desmosomfreien Abschnitten der Zellmembran zusammen mit PG depletiert werden, während parallel das periphere Keratinnetzwerk von Desmosomen retrahiert [91, 92]. Zu späteren Zeitpunkten wird Dsg3 auch von Desmosomen depletiert [93].

Folgend auf die Entdeckung, dass der Großteil der Pemphigus-Autoantikörper gegen die EC1-Domäne am Amino-Terminus der Cadherine gerichtet ist, wurde vermutet, dass sie sterisch

die Dsg-Proteininteraktionen inhibieren, wodurch Zelladhäsionsverlust und die Blasenbildung entsteht [94]. Zusätzlich konnten auch monoklonale Dsg-Antikörper aus Mausmodellen, antigen-bindende-Fragmente (Fab-Fragment) von Patientenautoantikörpern und auch rekombinante monovalente Einzelstrangantikörper die Keratinozytenadhäsion stören [95, 96, 97]. Mithilfe von Rasterkraftmikroskopie (AFM) konnte später bestätigt werden, dass aDsg3-Antikörper tatsächlich die homophile Interaktion von Dsg3 zellfrei sowie *in vitro* auf Keratinozyten hemmen können [32, 98]. Antikörper gegen Dsg1 scheinen jedoch keine homophile Dsg1 Interaktionen zu blockieren [99], während heterophile Dsg1/Dsc3-Bindungen sowie heterophile Dsg1/Dsc1-Interaktionen durch aDsg1-Antikörper reduziert werden [33, 100].

Die schichtabhängige und organspezifische Expression der Desmogleine (Abb. 1, 2) und die unterschiedlichen assoziierten Autoantikörperprofile der verschiedenen Phänotypen (Abb. 4) begründeten schließlich die Dsg-Kompensationstheorie der Pemphigus-Pathogenese [101]. Dabei wird diskutiert, dass bei PV eine suprabasale Spaltbildung durch aDsg3-Antikörper ausschließlich in der Mukosa auftritt, da dort Dsg3 in allen Schichten gleichermaßen verteilt ist, während Dsg1 zu schwach exprimiert ist, um den Funktionsverlust von Dsg3 zu kompensieren (Abb. 2). Superfizielle Spaltbildung durch aDsg1-Antikörper bei PF in der Epidermis wäre erklärbar, da Dsg3 im *Stratum granulosum* fast nicht exprimiert wird [101]. Die typische suprabasale Spaltbildung der Epidermis bei Patienten mit mukokutanem PV und sowohl aDsg3- als auch aDsg1-Antikörpern stellt diese Theorie jedoch zum Teil in Frage. Dort müsste nach dieser Theorie der Verlust von Dsg3 und Dsg1 zu sowohl suprabasaler als auch superfizieller Spaltbildung führen.

1.6 Signalwege in der Pathogenese des Pemphigus

Die strukturellen Veränderungen der Desmosomen und die schichtspezifische Spaltbildung können nicht alleine durch direkte Inhibition von Dsg-Interaktionen erklärt werden. Da zelluläre Veränderungen häufig durch Phosphorylierung und/oder Translokation von Signalproteinen und Molekülen initiiert wird, wurden verschiedene Signalwege mit der Pemphigus-Pathogenese assoziiert und bilden das Bindeglied zwischen den verschiedenen Mechanismen. Die am besten untersuchten und für diese Arbeit relevanten Signalwege werden im Folgenden näher erläutert.

1.6.1 Intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationsanstieg

Calcium-Ionen (Ca^{2+}) fungieren in Zellen als „*second messenger*“ für viele verschiedene Aufgaben wie unter anderem Differenzierung in Keratinozyten. Der Ca^{2+} -Signalweg wurde als erstes mit der Pemphigus-Pathogenese in Verbindung gebracht. Durch spezifische Ca^{2+} -Kanäle können Ionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum oder aus dem Extrazellulärraum in die

Zellen einströmen und die zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration erhöhen [102]. Darüber wird unter anderem die Bildung von AJs und Desmosomen gefördert [103, 104].

Die Expression von Plasminogenaktivator nach Kontakt mit PV-IgG erforderte die Beteiligung von intrazellulärer Signaltransduktion, aufgrund dessen der Ca^{2+} -Signalweg mit der Pemphigus-Pathogenese in Verbindung gebracht wurde [105]. Pemphigus-Autoantikörper führen zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC), wodurch der „*second messenger*“ Inositol-1,4,5-trisphosphate (IP3) gebildet wird [105, 106], welcher daraufhin innerhalb von Sekunden zu einer rapiden und transienten Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels führt. Dabei bildet sich als Nebenprodukt 1,2-Diacylglycerol (DAG) [107]. Beide Faktoren können die Protein Kinase C (PKC) langfristig aktivieren und an die Plasmamembran translozieren [108]. Die Inhibition einzelner Komponenten des Signalwegs schützt vor PV-IgG-induzierter Blasenbildung. Es wurde anfänglich vermutet, dass die anschließende Sekretion von Plasminogen-Aktivator zur proteolytischen Degradierung der desmosomalen Cadherine führt und somit die Zell-Zell Haftung schädigt. Da PV-IgGs jedoch in Plasminogenaktivator-defizienten Mäusen Blasenbildung induzieren konnten [66] und widersprüchliche Studien bezüglich Plasminogenaktivator-Inhibitoren existieren [109, 110], ist anzunehmen, dass vor allem die Translokation von PKC die entscheidende Rolle des Ca^{2+} -Einstroms darstellt [108]. Die Inhibition der PKC zeigte ebenfalls protektive Effekte auf den IgG-vermittelten Zell-Zell Adhäsionsverlust [111]. Die Analyse des Ca^{2+} -Signalwegs eröffnete das Feld der Signaltransduktion in der Pemphigus-Pathogenese, dass später auf Kinasen ausgeweitet wurde.

1.6.2 p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (p38MAPK)

Aktivierung von p38MAPK stellt eine der zentralen Signalwege in der Pathogenese des Pemphigus dar. Kinasen sind Enzyme, die Phosphate an Serin-, Threonin- oder Tyrosinreste spezifischer Zielproteine kovalent binden und dadurch unter anderem deren Proteintranslokationen, -aktivierungen und auch die Genexpression regulieren können [112]. Stimuli der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) sind vielseitig und beinhalten Hormone, Wachstumsfaktoren, Zytokine und verschiedenste umweltvermittelte Stressfaktoren. Sie werden an evolutionär hochkonservierten spezifischen Serin-x-Threonin Aminosäuremotiven phosphoryliert, wenn diese auf eine Prolin-Aminosäure folgen, und damit aktiviert [113]. Die p38MAPK gehört zu einer der drei MAPK-Hauptfamilien und stellt dabei den Kern eines dieser Signalwege dar. Sie ist vor allem Stress- und Zytokin-assoziiert und ihre Relevanz in der Pathogenese des Pemphigus wurde intensiv untersucht [114, 115, 116, 117, 118, 78, 119, 120]. Zuerst konnte eine Phosphorylierung der p38MAPK, des Hitzeschockprotein 27 (HSP27) und der Mitogenkinase 2 (MK2) in Phosphoanalysen von 2D-Gelelektrophoresen in Abhängigkeit der PV-IgG-Konzentration festgestellt werden [115]. Durch pharmakologische Inhibition konnte die IgG-induzierte Intermediärfilamentsystemreorganisation [115], die Dsg-Endozytose

[121] und letztlich die Zelldissoziation *in vitro*, sowie die Blasenbildung im passiven Transfer-Mausmodell *in vivo* verhindert werden [116]. Dies wurde ebenfalls für PF durch Phosphorylierung in Hautbiopsien bestätigt [117]. Neuere Studien zeigen außerdem, dass p38MAPK-Inhibition in humaner Epidermis *ex vivo* PV-induzierte ultrastrukturelle Veränderungen, wie Verringerung der Desmosomenanzahl sowie Desmosomengröße und die Zunahme interdesmosomaler Abstände, hemmen kann [90]. Dies gilt jedoch nicht für orale Mucosa *ex vivo* [5].

1.6.3 Rous-Sarcoma-Virus-Kinase (Src-Kinase)

Eine zweite Kinasegruppe stellen die Tyrosinkinasen dar, die an mehreren Tyrosinresten phosphoryliert werden können. Sie lassen sich in Rezeptor- und nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen aufteilen.

Im Jahr 1911 entdeckte Peyton Rous das Rous-Sarkoma-Virus, welches Bindegewebstumore induzieren kann [122]. Dieses Virus besitzt die Gensequenz einer Tyrosinkinase, die folgend virale-Sarcoma-Kinase (Src) genannt wurde. Die zelluläre Variante c-Src besitzt vier Src-Homologie-Domänen (SH1-4), die zusammen für deren Funktion verantwortlich sind. In der SH1-Domäne liegt eine Phosphorylierungsstelle am Tyrosinrest 416, wodurch die Kinasefunktion in derselben Domäne aktiviert wird. Am C-Terminus des Proteins liegt am Tyrosinrest 527 eine kinaseregulierende Phosphorylierungsstelle, welche die SH1-Domäne an die SH2 bindet und damit die Kinase deaktiviert. Die SH4-Domäne ermöglicht die Verankerung der Tyrosinkinase in der Plasmamembran und bestimmt daher ihre Lokalisation [123]. Substrate wie Kinasen und auch Integrine definieren die Beteiligung an zellulären Prozessen, die von Proliferation über Adhäsion bis hin zu Zellzyklusentscheidungen reichen und so vielseitig sind, dass umfangreiche Artikel existieren, welche diese anschaulich darstellen [124].

Die Verbindung mit der Zellmembran und mit Zelladhäsion implizierten eine potentielle Beteiligung bei der Pemphigus-Pathogenese [125], sodass in einer Studie eine IgG-induzierte Aktivierung der Kinase mit einem Aktivitätsmaximum nach 30 min festgestellt werden konnte [118]. Außerdem wurde Src im desmosomalen Interaktom identifiziert und bindet über E-Cadherin an Dsg3 [126].

Zwei verschiedene Funktionen wurden bisher im Bezug auf Desmosomen entdeckt. Zum einen wird PKP3 im Anschluss an eine Src-Aktivierung phosphoryliert, wodurch sich die Verbindung zu membrangebundenem Dsg3 trennt und schlussendlich Dsg3 in das Zytosol transloziert [127, 126]. Außerdem konnte eine Src-Phosphorylierung bei der Neuentstehung von Desmosomen an der Membran nachgewiesen werden, während die Inhibition des Signalproteins den Transfer von Dsg3 von der löslichen in die desmosomal-keratingebundene Fraktion der Zellmembran verhindert [128, 25]. Dabei spielt auch Cortactin, ein Adapterprotein des Aktin-Zytoskeletts, eine Rolle [129]. Weiterhin fördert eine Interaktion mit Keratin-6 die Wundheilung durch Deaktivierung des Signalproteins. Dabei ist die Beteiligung von PG und

anderen desmosomalen Proteinen nicht auszuschließen [130].

1.6.4 Epidermaler-Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)

Der Epidermale-Wachstumsfaktor-Rezeptor (Engl.: *Epidermal growth factor receptor* (EGFR)) gehört zu einer Gruppe von Transmembranproteinen, die als Rezeptortyrosinkinasen verschiedene Zellfunktionen wie Wachstum, Differenzierung, Motilität, Adhäsion sowie Überleben regulieren [131].

Insgesamt besteht die ErbB2-Familie aus vier strukturell ähnlichen Proteinen: EGFR (HER1), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) sowie ErbB4 (HER4). Alle Proteine besitzen eine extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne, die sich strukturell leicht unterscheidet. Durch Bindung von Liganden, wie beispielweise Wachstumsfaktoren, an diese Domäne wird eine Homo- oder Hetero-Oligomerisierung der monomeren Rezeptoren induziert, wodurch der nicht-katalytische regulatorische C-Terminus *trans*-autophosphoryliert wird, sodass anschließend der zytoplasmatische Tyrosinkinasekern aktiviert wird. Abhängig vom Dimerpartner können dadurch verschiedenste andere Signalproteine über ihre SH2-Domäne an die katalytische Domäne binden und phosphoryliert werden [132, 133]. Zusätzlich kann EGFR auch ligandenunabhängig über andere Kinasen wie Src oder p38MAPK aktiviert werden. Die fünf großen Effektorsignalwege beinhalten Ras/Raf-1/ERK, PI3Kinase/AKT/mTOR, src/NFK β , Rac1/PAK-1 sowie den Catenin-Zytoskelett-Komplex [132, 134], wodurch eine Assoziation zu Desmosomen naheliegend ist.

Mehrere Studien konnten zeigen, dass sowohl EGFR verschiedene Zelladhäsionskomponenten als auch *vice versa* Zelladhäsionskomponenten den Rezeptor beeinflussen können. So wird durch EGF-vermittelte EGFR-Aktivierung PG phosphoryliert, wodurch die Assoziation von DP am Desmosom reduziert und Zelladhäsion verringert wird [135]. Erhöhte Dsg1-Expression andererseits reduziert die EGFR-Aktivität, wodurch terminale Differenzierung gefördert wird [136].

Auch mit der Pemphigus-Pathogenese wurde der Rezeptor in Verbindung gebracht. PV-IgG Inkubation auf Keratinozyten *in vitro* führte in verschiedenen Studien zu EGFR-Aktivierung [137, 118, 120, 78]. Es konnte jedoch auch IgG-vermittelter Zelladhäsionsverlust unabhängig von EGFR-Aktivierung festgestellt werden [138]. Gleichzeitig wird durch Inhibition von EGFR die Dsg3-Depletion sowie Zytokeratinretraktion reduziert und im Mausmodell *in vivo* die Blasenbildung verhindert [120].

1.6.5 Extrazelluläre Signalregulierte Kinase (ERK)

Die Extrazelluläre Signalregulierte Kinase (ERK) ist das zentrale Signalprotein des klassischen MAPK-Signalwegs, die vor allem von extrazellulären Faktoren moduliert und unter anderem durch Wachstumsfaktoren, EGFR-Aktivierung und durch PKC über einen mehr-

schrittigen Prozess aktiviert wird [139]. ERK besteht aus zwei Proteinen, p44 (ERK1) und p42 (ERK2), die durch Phosphorylierung aktiviert werden, einen Homo- oder Heterodimer bilden und anschließend in den Zellkern translozieren, um dort verschiedenste Zielproteine und Transkriptionsfaktoren zu beeinflussen. Dadurch werden zelluläre Vorgänge wie Wachstum, Mitose und Differenzierung reguliert [140].

Auch desmosomale Proteine wurden bereits mit ERK assoziiert. Da bei Verlust von Dsg1 in den höheren Schichten der Epidermis ERK aktiviert wurde, konnte ein differenzierungsabhängiger Zusammenhang zwischen Dsg1- und EGFR-vermittelter ERK-Phosphorylierung aufgezeigt werden [136]. Der mechanistische Hintergrund ist eine Interaktion von Dsg1 mit Erbin und Shoc2, einem Zwischenschritt des MAPK-Wegs, wodurch in Keratinozyten die Vermittlung des EGFR-Signals an ERK unterbrochen wird [141]. Auf diese Art soll die Differenzierung der Keratinozyten beim Auftreten von Dsg1 weiter gefördert werden und den schichtspezifischen Aufbau von Desmosomen definieren. Die ERK-Phosphorylierung selber wurde bisher nicht mit der Pemphiguspathogenese in Verbindung gebracht. Es konnte jedoch eine IgG-induzierte Aktivierung des Signalwegs demonstriert werden, um indirekt die Aktivierung der PKC darzustellen [142]. Zusätzlich wurde sie als Zielprotein der IgG-induzierten EGFR-Aktivierung definiert [120].

1.6.6 Cyclisches Adenosin-Monophosphat (cAMP)

Cyclisches Adenosin-Monophosphat (cAMP) fungiert in Zellen als „*second-messenger*“. Konzentrationsanstieg oder -abfall sind Reaktionen auf Hormone, Wachstumsfaktoren und auch Neurotransmitter. Während alle vorherigen Signalwege die Zelladhäsion bei Aktivierung negativ beeinflussen, verstärkt cAMP diese [143]. Im Endothel ist die barriestabilisierende Rolle bereits lange etabliert. Effektoren von cAMP verstärken dort eine Polymerisation des kortikalen Aktin-Zytoskeletts und somit Verankerung des Vaskulär-endothelialen-Cadherin [144]. Im Bezug zu Desmosomen konnte auch gezeigt werden, dass adrenerge Stimulation über cAMP die Zell-Zell Haftung von Kardiomyozyten durch Reorganisation von Dsg2 in Desmosomen stärkt. Dies wird durch eine Phosphorylierung von PG vermittelt [145].

Auch bei der Pemphigus-Pathogenese ist cAMP involviert. Als Antwort auf PV-IgGs erhöht sich die cAMP-Konzentration, führt zu einer Stärkung der Keratinozytenadhäsion *in vitro* und verhindert die Blasenbildung im Mausmodell *in vivo* [143]. Bisher ist dies der einzige Signalweg, dessen Aktivierung positive Effekte auf die Zellhaftung hat und gleichzeitig durch PV-IgGs ausgelöst wird.

Kapitel 2

Zielsetzung

In den letzten 40 Jahren wurden große Schritte zum Verständnis der Pathogenese des Pemphigus gemacht. Die Aufklärung vieler verschiedener Mechanismen wie Inhibition der Cadherinbindungen, Signalmodulationen und zelluläre Strukturveränderungen konnte das Verständnis der Erkrankung grundlegend verändern.

Während weitgehend Konsens über den Beitrag von aDsg1- und aDsg3- Antikörpern zu den Pemphigus-Phänotypen besteht, sind jedoch Mechanismen und Signalwegsmodulationen im Zusammenhang mit verschiedenen Antikörperprofilen und Phänotypen in Studien bisher vernachlässigt worden. Dabei stellt sich außerdem die Frage, welche Mechanismen sich in atypischen Varianten der Erkrankung unterscheiden und für die Entstehung verantwortlich sind. Auch die unterschiedlichen Lokalisationen der Blasen lassen sich nicht vollkommen durch die Desmoglein-Kompensationstheorie erklären, da dort durch Auftreten von aDsg1- und aDsg3-Autoantikörpern in der Theorie nicht nur suprabasale, sondern auch superfizielle Spaltbildung bei PV-Patienten auftreten müsste. Deswegen stellen wir hier die Hypothese auf, dass abhängig von den verschiedenen Autoantikörpern gegen Dsg3 und Dsg1 unterschiedliche zelluläre Signalmechanismen ausgelöst werden und zu den verschiedenen Pemphigus Phänotypen beitragen. Erstes Ziel dieser Arbeit ist dementsprechend, die in zahlreichen Studien einzeln untersuchten Signalmodulationen der Erkrankung in verschiedenen Patienten zu bestimmen und dem Phänotyp sowie dem Antikörperprofil zuzuordnen.

Außerdem ist der Zusammenhang zwischen den verschiedenen Signalwegen ungeklärt. Da sich viele der Signalwege gegenseitig beeinflussen, stellt sich die Frage, ob auch bei Pemphigus Abhängigkeiten zwischen den verschiedenen Signalwegen bestehen. Dabei ist auch die Relevanz der einzelnen Signalwegsaktivierungen für den PV-IgG-vermittelten Haftungsverlust undeutlich. Daher werden pharmakologische Inhibitoren der Signalwege verwendet, um gegenseitige Abhängigkeiten sowie funktionelle Effekte der Signalwege zu beleuchten. Zusätzlich wurde in Keratinozyten mit der CRISPR/Cas9-Technologie Dsg3-depletiert, um Abhängigkeiten von Antikörpern gegen Desmogleine zu untersuchen.

Zusammenfassend soll das Sammelsurium an Signalmechanismen der Pemphigus-Pathogenese miteinander in einen sinnvollen Zusammenhang zu den klinischen Phänotypen gebracht werden.

Kapitel 3

Material

3.1 Zellen

Name	Zellart, Gewebe, Spezies	Hersteller
HaCaT	Keratinocyten, Epidermis, Mensch	Petra Boukamp, Heidelberg, Deutschland [146]
NHEK	Keratinocyten, Epidermis, Mensch	Promocell, Heidelberg, Deutschland
CHO	Ovarialzellen, Chinesischer Hamster	American Type Culture Collection (ATCC)

Tabelle 1: Zelllinien mit Zellart, Organsystem und Spezies sowie Bezugsquelle.

3.2 Mediatoren

Mediator	Hersteller	Zielprotein	Konzentration
SB202190	Merck Millipore, Billerica, USA	p38MAPK	30 μM (1h)
pp2	Merck Millipore, Billerica, USA	Src-Familie	10 μM (1h)
Bim-X	Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland	PKC	1 μM (1h)
U0126	New England Biolabs, Ipswich, USA	MEK 1/2 (ERK)	5 μM (1h)
BAPTA	Merck Millipore, Billerica, USA	Ca ²⁺ -Chelation	200 μM (4h)
Erlotinib	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, USA	EGFR	2,5 μM (1h)

Tabelle 2: Inhibitorische Mediatoren verschiedener Signalwege mit ihren Bezugsquelle und Zielproteinen. Neben der Konzentration ist die Vorinkubationsdauer in Klammern angegeben.

3.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Aceton	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Acrylamid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Aprotinin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Citronensäure Monohydrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
cComplete™ Protease Inhibitoren	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
D+ Glucose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dispase-II	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DMEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanolamin.HCL	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fura 2-AM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Fetales Kälber Serum (FKS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Glycin	VWR, Radnor, USA
H ₂ O ₂	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
HBSS-Pulver	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
HCL	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
KCl	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Keratinocyte Growth Medium 2	Promocell, Heidelberg, Deutschland
KH ₂ PO ₄	VWR, Radnor, USA
Leupeptin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Lipofectamin-2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Luminol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Magermilch	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MES	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Chemikalie	Hersteller
Methanol	VWR, Radnor, USA
MgCl ₂	Carl Roth, Karlsruhe, Darmstadt
Thiazolyl Tetrazolium Bromide (MTT)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NaCl	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
NaCNBH ₃	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NaF	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaOH	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Normal Goat Serum (NGS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
N-Propyl-Gallat (NPG) - Glycerol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Opti-MEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
p-Cumarsäure (PCA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Pepstatin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Phenylmethanesulfonyl Fluoride (PMSF)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phenol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pluronic F1	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Prestained Protein Ladder (PPL)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Streptomycinsulfat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Supplementary-Mix	Promocell, Heidelberg, Deutschland
Triethylamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tween 20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Trypsin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tabelle 3: Chemikalien verwendet für Rezepte und Experimente mit jeweiliger Bezugsquelle.

3.4 Rezepte

Methode	Bezeichnung	Zusammensetzung
Allgemein	PBS	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,36 g Na ₂ HPO ₄ , 0,2 g KH ₂ PO ₄ , 1 l Aqua dest.
	HBSS	4,92 g HBSS, 0,18 g NaHCO ₃ , 500 ml Aqua dest.
Zellkultur	Kulturmedium	10 % FKS, 50 µg Streptomycin, 50 U/ml Penicillin G in DMEM
	Einfriermedium	20 % FKS, 10 % DMSO in DMEM
Western Blot	SDS-Extraktionspuffer	25 mmol/l HEPES, 2 mmol/l EDTA, 25 mmol/l NaF, 1 % SDS, pH 7,6
	Triton-Extraktionspuffer	0.5 % Triton X-100, 50 mmol/l MES, 25 mmol/l EGTA, 5 mmol/l MgCl ₂ , pH 6,8
	Elektrophorese-Puffer	30 g Tris, 144 g Glycin, 10 g SDS, auffüllen mit Aqua dest. auf 2 l
	Blot-Puffer	15,15 g Tris, 73,2 g Glycin, 11 MeOH, 5 g SDS, auffüllen mit Aqua dest auf 5 l
	Laemmli-Puffer (3x)	2,27 g Tris, 6 g Tris, 37,8 g Glycin, 0,02 g Bromphenolblau, 100 ml Aqua dest., pH 6,9
	Sammelgel	1,55 ml Aqua dest., 0,3 ml Polyacrylamidlösung, 0,65 ml Tris Puffer (0,5 mol/l, pH 6,8), 25 µl SDS (10 %), 11,25 µl APS (10 %), 5,625 µl TEMED
	Trenngel (10 %)	2,025 ml Aqua dest., 1,675 ml Polyacrylamidlösung, 1,25 ml Tris Puffer (1,5 mol/l, pH 8,8), 0,05 ml SDS (10 %), 22,5 µl APS (10 %), 11,25 µl TEMED
	TBS-T	2,42 g Tris-Base (20 mmol/l), 0,05 % Tween 20 8 g NaCl (137 mmol/l), 1 l Aqua dest., pH 7,6

Methoden	Bezeichnung	Zusammensetzung
Western Blot	ECL Lösung I	500 μ l Luminol-Lösung (250 mmol/l in DMSO), 220 μ l PCA-Lösung (90 mmol/l in DMSO), 5 ml 1 mol/l Tris-HCL, auffüllen mit Aqua dest. auf 50 ml
	ECL Lösung II	32 μ l H ₂ O ₂ , 5 ml 1 mol/l Tris-HCL, auffüllen mit Aqua dest. auf 50 ml
	Stripping-Puffer	25 mmol/l Glycin, 1 % SDS, pH 2
AFM	Ethanolamin (1 M)	0,976 g Ethanolamin.HCL, 10 ml Ampuwa, pH 9,6
	NaCNBH ₃ (1 M)	32 mg NaCNBH ₃ , 50 μ l 100 mM NaOH, 450 μ l Ampuwa
Ca ²⁺ Messungen	Messpuffer	140 mM NaCl, 3.6 mM KCl, 2.6 mM CaCl ₂ (H ₂ O) ₂ , 0.5 mM NaH ₂ PO ₄ (H ₂ O) ₂ , 2 mM NaHCO ₃ , HEPES and 5 mM D+ Glucose
DNA-Extraktion	Elutionspuffer	10 mM Tris-HCl, pH 8.5
	Extraktionspuffer	Phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) pH 7.8-8.2

Tabelle 4: Rezepte für Reagenzien verwendet bei verschiedenen Methoden mit ihren Bezeichnungen und Bestandteilen.

3.5 Primär-Antikörper

Zielprotein (anti-)	Hersteller	Anwendung/Konzentration	Spezies
phospho-p38MAPK (Thr180/Tyr182)	Cell Signaling Technologies, Cambridge, England	WB: 1:1000	Kaninchen/ polyklonal
p38 MAPK	Cell Signaling Technologies, Cambridge, England	WB: 1:1000	Kaninchen/ polyklonal
phospho-Src (Tyr416)	Cell Signaling Technologies, Cambridge, England	WB: 1:1000	Kaninchen/ polyklonal
Src	Cell Signaling Technologies, Cambridge, England	WB: 1:1000	Kaninchen/ polyklonal
p-EGFR (Tyr875)	Cell Signaling Technologies, Cambridge, England	WB: 1:1000	Kaninchen/ polyklonal
EGFR	Cell Signaling Technologies, Cambridge, England	WB: 1:1000	Kaninchen/ polyklonal
phospho-ERK (E-4)	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland	WB: 1:1000	Kaninchen/ polyklonal
p44/42 MAPK (ERK1/2)	Cell Signaling Technologies, Cambridge, England	WB: 1:1000	Kaninchen/ polyklonal
Dsg1 (p126)	Progen, Heidelberg, Deutschland	WB: 1:200	Maus/ monoklonal
Dsg2 (10G11)	Acris, Herford, Deutschland	WB: 1:1000 IF: 1:100	Maus/ monoklonal
Dsg3 (5H10)	Novus Biological, Littleton, USA	WB: 1:1000	Maus/ monoklonal

Zielprotein (anti-)	Hersteller	Anwendung/Konzentration	Spezies
Dsg3 (AK23)	Biozol, Eching, Germany	Experimentelle Kondition 75 $\mu\text{g/ml}$	mouse/ monoklonal
Dsg3	Biozol, Eching, Germany	WB: 1:1000	rabbit/ polyklonal
Dsg3 (5G11)	Invitrogen, Carlsbad, USA	IF: 1:200	Maus/ monoklonal
Dsc3	Progen, Heidelberg, Deutschland	WB: 1:200	Maus/ monoklonal
GAPDH	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland	WB: 1:1000	Maus/ monoklonal
α -Tubulin	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland	WB: 1:1000	Maus/ monoklonal
PG (PG 5.1)	Progen, Heidelberg, Deutschland	WB: 1:1000 IF: 1:100	Maus/ monoklonal
Desmoplakin I/II (H-300)	Santa Cruz, Dallas, USA	WB: 1:1000	Maus/ monoklonal
Desmoplakin I/II (NW-6)	Kathleen Green, Northwestern University	IF: 1:100	rabbit/ polyklonal
E-Cadherin	BD Transduction Heidelberg, Germany	WB: 1:1000 IF: 1:100	Maus/ monoklonal

Tabelle 5: Verwendete Primär-Antikörper zur Proteindarstellung in Western Blots (WB) und Immunofluoreszenzfärbungen (IF) mit dem jeweiligen Hersteller, der Anwendung, Konzentration sowie Spezies.

3.6 Sekundär-Antikörper

Antikörper	Hersteller	Anwendung/Konzentration	Konjugation
Ziege-anti-Maus	Dianova, Hamburg, Deutschland	IF 1:600	Cyanin 3
Ziege-anti-Kaninchen	Dianova, Hamburg, Deutschland	WB: 1:10000	Peroxidase
Ziege-anti-Maus	Dianova, Hamburg, Deutschland	WB: 1:10000	Peroxidase
Ziege-anti-Human	Dianova, Hamburg, Deutschland	IF: 1:600	Peroxidase

Tabelle 6: Verwendete Sekundär-Antikörper zur Primär-Antikörperdarstellung mit Bezugsquelle, Anwendung in Immunfluoreszenzfärbungen (IF) oder Western Blots (WB), Konzentration und Konjugat.

3.7 Verbrauchsmaterialien

Methode	Produkt	Hersteller
Zellkultur und Allgemeines	Pipetten; CellStar	Greiner, Kremsmünster, Österreich
	Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
	Peha-Soft	Hartmann, Heidenheim, Deutschland
	Zellkulturgefäße	Greiner, Kremsmünster, Österreich
	Zellkulturflaschen	Greiner, Kremsmünster, Österreich
	Kryoröhrchen	VWR, Radnor, USA
	Falkons	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Western Blot	Nitrocellulosemembran	Life Technologies, Carlsbad, USA
	Pierce-BCA-Protein-Assay-Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Methode	Produkt	Hersteller
Fluoreszenz- mikroskopie	Deckgläschen (Glas)	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
	Objektträger (Glas)	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
	μ -Slide 8-Well (Glas)	Ibidi, Martinsried, Deutschland
AFM	MLCT-Feder	Bruker, Billerica, USA
	Mica-Platten	SPI-Supplies, West Chester, USA
	PEG-Linker	Hermann Gruber Labor, Linz, Österreich
ELISA	cAMP Enzyme-Immunoassay-Kit	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tabelle 7: Verwendete Verbrauchsmaterialien der verschiedenen Methoden und ihre Bezugsquelle.

3.8 Geräte

Methode	Gerät	Hersteller
Zellkultur & Allgemeines	Herasafe, KS12	Thermo Fisher, Waltham, USA
	Kühlzentrifuge, 5430R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	FA-45-24-11-Kit	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Rettilino 420R	Hettich, Kirchlingern, Deutschland
	SUB AQUA 34 PLUS	Grant Instruments, Royston, England
	CoolCell™ LX	Corning, Corning, USA
	CO ₂ Inkubator, C150 (E2)	Binder, Tuttlingen, Deutschland
	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
	Infinite M200 PRO	Tecan, Männedorf, Schweiz
	pH 120	Hanna Instruments, Woonsocket, USA
	Eppendorf Pipettenset	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Kern KB Waage	Balingen-Frommern, Deutschland
	ALC 80.4	Acculab, Bradford, USA
Axio Vert A1	Carl Zeiss, Jena, Deutschland	
Fluoreszenz- -Mikroskopie	Konfokalmikroskop, TCS SP5	Leica, Mannheim, Germany
	63x NA 1.4 PL APO	Leica, Mannheim, Germany
	Fluoreszenzlampe HXP 120 C	LEJ, Jena, Deutschland
	Axio Observer A1	Carl Zeiss, Jena, Deutschland

Method	Gerät	Hersteller
Fluoreszenz -Mikroskopie	EC-Plan-Neofluar, 63x	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
	Monochromator Polychrome V	Till Photonics, Planegg, Deutschland
	CoolSNAP-Hq2	PHOTOMETRICS, Tucson, USA
	Fura-2 Filterset	AHF, Tübingen, Deutschland
Western Blot	Sonifier 250	Branson, Danbury, USA
	Heizblock, HBT-2-132	HLC, Bovenden, Deutschland
	Glasplatten	BioRad, München, Deutschland
	Mini-PROTEAN	BioRad, München, Deutschland
	PowerPac TM	BioRad, München, Deutschland
	FluorchemE	Protein Simple, San Jose, USA
	Rotator Genie	Scientific Industries, Bohemia, USA
	ES-300 Folienschweissgerät	GEHO, Heidgraben, Deutschland
AFM	NanoWizard [®] 3	JPK-Instruments, Berlin, Germany
Dispase	Finnpipette TM Novus (1 ml)	Thermo Scientific, Waltham, USA
	Stemi 508	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
	Canon EOS 600D	Canon, Krefeld, Deutschland

Tabelle 8: Geräte verwendet für verschiedene Methoden und jeweilige Hersteller

Kapitel 4

Methoden

4.1 Zellkultur

Die epidermale Keratinozyten-Zelllinie HaCaT (Engl.: *human adult low calcium elevated temperature*) in dieser Studie hauptsächlich als Modell verwendet [146]. Diese Zellen stammen von einem 62-jährigem adultem Spender aus dem nicht-tumorigenen Randgebiet eines Melanoms und immortalisierten spontan aufgrund einer Polyploidierung. Sie zeigen einen leicht veränderten Phenotyp im Vergleich zu primären Keratinozyten, behalten aber im Gegensatz zu vielen Tumorzelllinien ihre vollständige Differenzierungsfähigkeit. Sie bilden eine intakte Epidermis bei Transplantation auf Nacktmäuse und zeigen keine Invasivität in angrenzende Gewebe. Zusätzlich sind sie aufgrund ihrer einfachen Kulturbedingungen ideal als Modell für Untersuchungen an epidermalen Keratinozyten. Die Zelllinie wurde in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM) unter Zugabe von 10% fetalem Kälber Serum (FKS) sowie 50 μg Streptomycin und 50 U/ml Penicillin in einer T75 Zellkulturflasche steril im Inkubator bei 5% CO_2 , 95% Luftfeuchtigkeit und 37 °C gehalten. Die zentralen Versuche der Studie wurden in primären normalen humanen epithelialen Keratinozyten (NHEK), isoliert aus Vorhaut adulter Spender, wiederholt. Die Zellen wurden von Promocell bezogen und nach Herstellerangaben in Keratinozyten-Wachstumsmedium mit Supplementary-Mix ebenfalls bei 5% CO_2 , 95% Luftfeuchtigkeit und 37°C kultiviert. Jeden zweiten Tag wurde das Medium bei allen Zellen durch frisches Medium ausgetauscht. Nach Erreichen eines konfluenten Zellverbundes wurden die Zellen passagiert oder für Experimente ausgesät. Da HaCaT-Zellen in hoher Ca^{2+} -Konzentration kultiviert werden, wurden zuerst Ca^{2+} -Ionen von extrazellulären Peptidbindungen durch Waschen mit 0,05% Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) in Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) für 20 min cheliiert, da ansonsten keine Zellvereinzelung möglich ist. Primäre Keratinozyten werden in niedriger Ca^{2+} -Konzentration gehalten, sodass dort das Medium nur kurz mit PBS abgewaschen wurde. Anschließend wurden die extrazellulären Peptidbindungen durch eine Trypsinlösung (0,05% (w/v) Trypsin, 0,02% (w/v) EDTA in

PBS) für 3-5 min bei 37° C gespalten und die Zellen durch auf- und abpipetieren vereinzelte. Die Trypsinreaktion wurde bei HaCaT Zellen durch Medium gestoppt. NHEK-Zellen wurden durch Zentrifugation bei 280 G über 3 min sedimentiert, die Trypsinlösung abpipetiert und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Splitverhältnis von 1:3 in neuen T75-Kulturflaschen passagiert oder in Gefäßen mit 24-Vertiefungen für Experimente ausgesät. Da NHEK-Zellen nur unter hohen Ca^{2+} -Bedingungen differenzieren und Desmosomen ausbilden, wurde dem Kulturmedium 1,8 mM Ca^{2+} in Form von CaCl_2 24 h vor Durchführung der Experimente hinzugefügt.

4.1.1 Kryokonservierung der Zelllinien

Zellen wurden zur Lagerung in flüssigem Stickstoff bis zur Verwendung kryokonserviert. Damit Eiskristalle die Zellen nicht schädigen, wurden sie nach dem Vereinzeln aus der Zellkulturflasche in Falkons überführt und mithilfe einer Zentrifuge bei Raumtemperatur (RT) für 5 min bei 280 G sedimentiert und in 1 ml Einfriermedium (FKS mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)) resuspendiert. Kryoröhrchen wurden in Einfrierboxen (Corning® CoolCell™ LX Cell Freezing Container) über Nacht eingefroren und danach in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff überführt.

Beim Auftauen wurden die Zellen in Medium resuspendiert und anschließend für 5 min bei 280 G zentrifugiert, um schädliches DMSO zu entfernen. Das Sediment wurde in eine T75-Zellkulturflasche mit Medium überführt und die Zellen wie zuvor beschrieben kultiviert.

4.1.2 Dsg1- und Dsg3- Expressionsmuster der Zelllinien

Zu Beginn wurden die Proteinmengen der desmosomalen Pemphigus-Antigene Dsg1 und Dsg3 in den verschiedenen Zelllinien unter den experimentellen Kulturkonditionen mithilfe von Western Blot-Analysen verglichen. HaCaT-Zellen wurden unter 1,8 mM Ca^{2+} -Bedingungen kultiviert, sodass sie 24 h nach Erreichen von Konfluenz verwendet werden konnten. NHEKs wurden nach Konfluenz für 24 h mit 1,8 mM Ca^{2+} inkubiert, um die Bildung von Desmosomen und Differenzierung zu induzieren und anschließend mithilfe von SDS-Lysepuffer lysiert. Beide Zelllinien exprimieren Dsg3 und Dsg1. Dementsprechend können sowohl aDsg1- als auch aDsg3-Antikörper mit den Zellen reagieren und spezifische Veränderungen unter den verwendeten Kulturkonditionen induzieren.

4.2 Patientenseren und Antikörperaufreinigung

4.2.1 Akquise und Ethik

Patienten mit den verschiedenen Pemphigus-Phänotypen wurden aus den Dermatologischen Kliniken der Universitäten in Lübeck (Prof. Dr. Dr. Enno Schmidt), Marburg (Prof. Dr. Michael Hertl und Prof. Dr. Rüdiger Eming) und Würzburg (Prof. Dr. Matthias Goebeler), akquiriert. Die Pemphiguserkrankung wurde serologisch, histologisch, sowie klinisch nachgewiesen. Schriftliche Einverständniserklärungen zur wissenschaftlichen Verwendung der Blutproben wurden in den jeweiligen Kliniken unterschrieben. Die Verwendung wurde von Ethikkommissionen der Universität zu Lübeck (AZ: 12-178), der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg (# 159/06) und der Universität Marburg (AZ: 20/14) genehmigt.

4.2.2 Antikörperaufreinigung

Zelluläre Bestandteile des Vollbluts wurden nach Ablauf der Gerinnung durch Zentrifugation bei 2000 G für 15 min und RT sedimentiert und Serumüberstände abgenommen. Zusätzlich wurde Vollblut von drei gesunden Freiwilligen demselben Prozedere unterzogen, zusammengeführt und als Kontrollgruppe verwendet. Serumantikörpertiter gegen Dsg1 und Dsg3 wurden mithilfe von kommerziellen klinischen Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) (EUROIMMUN ELISA, Euroimmun, Basel, Deutschland) zur Diagnostik der Pemphigus-Erkrankungen in der dermatologischen Klinik der LMU München bestimmt (Dr. Miklos Sardy) (Tab. 9). AK23, ein pathogener monoklonaler aDsg3-Autoantikörper aus einem Pemphigus Mausmodell [95], wurde kommerziell bezogen (Biozol) und als monoklonale Vergleichskondition verwendet.

Da in Blutserum eine hohe Anzahl verschiedener Proteine vorkommen, hier jedoch die IgG-vermittelten Mechanismen untersucht werden sollten, wurden alle Seren zu IgG-Fractionen durch Säulenaffinitätschromatographie aufgereinigt. Protein G, ein Zellwandprotein der Bakteriengattung *Streptococcus* bindet mit hoher Affinität das kristallisierbare Fragment (Engl.: *fragment crystallisable* (Fc)) eines Antikörpers. Dabei reagiert es vor allem mit humanen IgG Subklassen, jedoch nicht mit dem Fc-Fragment humaner IgA- oder IgM- Antikörper. Für die Aufreinigung wurde in eine 5 ml Säule eine Fritte zur Fassung von 200 μ l Protein G gekoppelte Agarose positioniert. Die Agarose wurde mit 20 ml Hanks-gepufferter Salzlösung (Engl.: *Hanks' Balanced Salt Solution* (HBSS)) gründlich in der Säule gespült und anschließend 2 ml Patientenseren hinzugegeben. Das Agarose-Serumgemisch wurde durch eine zweite Fritte abgeschlossen und die Säule für 2 h auf einem Rotator bei RT langsam gedreht, um die Bindung der IgG Antikörper an Protein G zu vermitteln. Die nicht-gebundenen Proteine wurden durch Spülen mit 20 ml PBS entfernt und die gebundenen Antikörper mithilfe von 3 ml 20 mM Natriumcitrat mit einem pH-Wert von 2,4 von der Agarose in ein Eppendorf-Röhr-

chen mit 30 μl 2 M Natriumcarbonat eluiert, sodass das Natriumcitrat gepuffert wurde. Die Antikörpermischung wurde in ein Konzentrierungsröhrchen mit einer Porengröße von 30000 überführt und 10 min bei 20000 G zentrifugiert. Die Antikörper bleiben dabei in der Filtermembran hängen und wurden mithilfe von 1 ml 37° C warmem PBS gelöst. Die IgG-Fraktion des Patientenserums wurde daraufhin in 50 μl aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80° C gelagert.

4.3 Mediatoren zur Signalwegsmodulierung

Um die Relevanz der verschiedenen Signalwege in der Pemphigus Pathogenese zu definieren, wurden spezifische inhibitorische Mediatoren der Signalproteine verwendet. Alle Mediatoren wurden eine Stunde auf konfluenten Zellrasen bei 37° C vorinkubiert, um eine suffiziente Inhibierung des Signalweges vor Applikation der IgG-Fraktionen zu gewährleisten. Die verwendeten Konzentrationen und Zielproteine der Mediatoren finden sich im Materialteil (Tab. 2).

4.4 Proteinbiochemische Methoden

4.4.1 Proteinextraktion und Triton-Zellfraktionierung

Damit die Expression und Modulation verschiedener Proteine in Zellen untersucht werden können, müssen Proteine zuerst aus den Zellen extrahiert werden. Durch Verwendung verschiedener Puffer mit unterschiedlichen Lösungskapazitäten kann bei der Triton-Zellfraktionierung der Proteinpools in eine lösliche und unlösliche Fraktion separiert werden. Da Triton ein ungeladenes neutrales Detergent ist, befinden sich in der löslichen Fraktion hauptsächlich zytosolische und in der Membran freie Proteine, während in der unlöslichen Fraktion unter anderem zytoskelettal-verankerte Proteine und dementsprechend desmosomale Moleküle zurückbleiben.

Das Zellmedium wurde nach Erreichen von ca. 90 % Konfluenz für 24 h durch 300 μl frisches Medium ersetzt. Vor der Versuchsdurchführung wurden die Extraktionspuffer mit Proteaseinhibitoren zur Verhinderung von Proteindegradation vorbereitet. Dazu wurde dem Triton-Extraktionspuffer jeweils 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin, Pepstatin und Aprotinin sowie 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und dem SDS-Extraktionspuffer ein Proteaseinhibitorcocktail (cCompleteTM Protease Inhibitor Cocktail) zugegeben. Mediatoren und IgG-Fraktionen wurden entsprechend des experimentellen Aufbaus bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Medium mit einem elektrischem Absauger entfernt, der Zellverbund mit kaltem sterilem PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen und folgend 50 μl des Triton-Extraktionspuffer hinzugegeben. Die Zellkulturplatte mit Pufferlösung wurde 10 min auf Eis inkubiert, um gleichmäßig alle Triton-löslichen Proteine aus den Zellen zu gewinnen. Danach wurde der

Zellverbund vom Boden der Kulturplatte mithilfe eines Zellschabers abgetragen und das Zell- und Puffergemisch in ein Mikroreagenzgefäß überführt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 14.000 G konnte der Überstand vorsichtig abgenommen und als Triton-lösliche Proteinfraktion verwendet werden. Das zurückgebliebene Sediment wurde anschließend in 50 μ l SDS-Extraktionspuffer resuspendiert, um die restlichen Triton-unlöslichen Proteine zu gewinnen. Zellysate ohne Zellfraktionierung wurden ausschließlich in SDS-Extraktionspuffer hergestellt. Anschließend wurde zur Zerstörung der Zellmembran das SDS-Extrakt mit einem Ultraschallstab durch 15 Pulse sonifiziert. Die beiden Fraktionen wurden bis zur weiteren proteinbiochemischen Verwendung bei -20° C eingefroren.

4.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration der Lysate wurde nach jeder Lysatherstellung kolorimetrisch mithilfe von Bicinchoninsäure (BCA) bestimmt [147]. Dazu wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit nach Herstellerangaben verwendet. Bei der Methode wird einer Proteinprobe Cu^{2+} hinzugefügt, welche sich an Peptidbindungen anlagern und bei alkalischem pH-Wert zu Cu^{1+} reduziert werden. Daraufhin bildet Cu^{1+} einen Komplex mit BCA, wodurch ein linearer Farbumschlag proportional zur Proteinkonzentration entsteht. Ein Albuminstandard mit einer linearen Verdünnungsreihe von 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bis 2 mg/ml Albumin im verwendeten Lysepuffer wurde parallel auf die Probenplatte aufgetragen. Photometrisch wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 582 nm durch einen Mikroplattenleser (Infinite M200, Tecan, Schweiz) gemessen und die Proteinkonzentration durch das Abgleichen mit dem Proteinstandard quantifiziert.

4.4.3 Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine können mithilfe einer Natriumdodecylsulfat (Engl.: *Sodiumdodecylsulfate (SDS)*)-*Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)* nach Laemmli entsprechend ihrer molekularen Größe aufgetrennt werden [148]. Durch das ungeladene Tensid SDS wird die Eigenladung der Proteine überdeckt, sodass die Proteinladung nicht mit der Größenauftrennung interferiert.

Spezifischer wurde das Proteinlysate mit gleicher Menge Laemmli-Puffer und 50 mmol/l Dithiothreitol zur Unterbrechung der Disulfidbrückenbindungen durch reduzierende Thiolverbindungen gemischt und für 5 min in einem Thermoblock bei 95° C erhitzt, um die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine aufzubrechen. Für die Auftrennung wurde ein Polyacrylamidgel gegossen. Dazu wird durch radikalische Polymerisation das Acrylamid mit N,N-Methylenbisacrylamid quervernetzt, wodurch ein Gel mit konzentrationsabhängiger Porengröße entsteht. Ammoniumperoxodisulfat (APS) dient der Initiation und Tetramethylethylendiamin (TEMED) der Katalyse der Reaktion. Die Komponenten für ein Trenngel (10 %) wurden gemischt und zwischen zwei Glasplatten gegossen (Bio-Rad). Dabei wurde Platz für

ein Sammelgel (5 %) gelassen, welches nach Auspolymerisation des Trenngels hergestellt und, zusammen mit einem Probenkamm mit 10 oder 15 Zinken, der Kammer hinzugefügt wurde. Die auspolymerisierten Gele wurden in eine Gelelektrophoresekammer mit Elektrophorese-Puffer eingespannt und die Proben gleichmäßig mit 10 μg Probenprotein in die Taschen des Sammelgels aufgetragen. Einer leeren Tasche wurde ein Größenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder) hinzugefügt, wodurch die verschiedenen Proteingewichte parallel farblich markiert wurden. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung, in diesem Fall 120 V, wandern die Proteine aufgrund ihrer negativen Ladung durch das Gel zur Anode der Elektrophoresekammer. Die molekulare Größe der Proteine definiert die Laufgeschwindigkeit durch die Gelporen, wodurch ein Größengradient der Proteine im Trenngel von groß (langsam) nach klein (schnell) erzielt wird.

4.4.4 Western Blot-Analyse

Die Western Blot-Analyse stellt die Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran und anschließende semiquantitative Immundetektion der Proteine und ihrer Modulationen mithilfe von Antikörpern dar. Das Standardprotokoll zur Übertragung von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen wurde hier verwendet [149].

Das Gel der Elektrophorese wurde zusammen mit einer Nitrozellulosemembran im Wet-blot Tanksystem (Biorad) eingespannt, der Tank mit Blot-Puffer gefüllt und für 90 min an eine Stromstärke von 350 mA angeschlossen, um einen vollständigen Proteintransfer zu gewährleisten. Nach erfolgreichem Transfer wurden proteinfreie Membranabschnitte in 5 % (w/v) BSA in Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween 20 (TBS-T) für 1 h bei RT auf einem Schüttler geblockt. Primär-Antikörper wurden entsprechend des jeweiligen Verdünnungsverhältnisses bei 4° C über Nacht rotierend inkubiert und überschüssiger Antikörper am nächsten Morgen dreimalig für 5 min in TBS-T von der Membran gewaschen. Meerrettichperoxidase-gekoppelte Sekundär-Antikörper gegen die Spezies des Primär-Antikörpers wurden anschließend für 1 h im entsprechenden Verdünnungsverhältnis bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBS-T zur Entfernung von Antikörperüberschüssen wurde eine verstärkte Chemilumineszenzreaktion (Engl.: *Enhanced Chemiluminescence* (ECL)) durch die Peroxidase katalysiert, indem ECL-Lösung I und II in gleichen Teilen für 1 min inkubiert wurden. Dabei wird das Substrat Luminol durch Oxidation mithilfe von H_2O_2 auf einen hochenergetischen Zustand angeregt. Bei Relaxation emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 450 nm, welches mithilfe eines automatischen Chemilumineszenzdetektors (Fluorchem E, ProteinSimple) detektiert wurde. Die Farbdichte entspricht dabei der relativen Antikörper- und dementsprechend Proteinmenge.

Die Densitometrie der Western Blot-Banden wurde mit der Gelanalysefunktion in ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, USA) durchgeführt [150]. Dazu wurde jede Spur

markiert und im resultierendem Histogramm der Hintergrund der jeweiligen Bande abgetrennt. Die dadurch entstandene Fläche der Bande entspricht der Farbdichte und dementsprechend der Proteinmenge. Jedes Protein wurde auf eine Ladekontrolle bezogen. Während für phospho-spezifische Antikörper das jeweilige Gesamtprotein verwendet wurde, wurde für alle anderen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) oder α -Tubulin genutzt.

4.4.5 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest

Der enzymgekoppelte Immunadsorptionstest (Engl.: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*, ELISA) stellt ein immunologisches Nachweisverfahren zur quantitativen Bestimmung von Proteinen, Viren, Enzymen oder auch Toxinen dar. Dazu werden Antikörper an Mikrotiterplatten kovalent gebunden und in mehreren Schritten über verschiedene Fluoreszenz- oder Lumineszenzmethoden visualisiert [151].

In diesem Fall wurde zur quantitativen Analyse der cAMP-Konzentration ein kommerzieller kompetitiver Enzym-Immunoassay erworben (CA-200, Sigma-Aldrich) und nach Herstelleranleitung verwendet. HaCaT-Zellen wurden dazu nach Erreichen von Konfluenz und nach Versuchsaufbau-entsprechender Behandlung mit PBS gewaschen und anschließend mithilfe von 0.1 M Salzsäure (HCl) lysiert. Das Zellysate wurde nach Abschaben vom Plattenboden mit der Pipettenspitze in ein Reaktionsgefäß überführt und anschließend bei 600 G für 10 min bei RT zentrifugiert, um Zellreste zu sedimentieren. Der Überstand wurde zur Analyse verwendet und das Sediment verworfen. Gleichzeitig wurde ein cAMP-Konzentrationsstandard hergestellt. Probenüberstand und Standard wurden auf die Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen hinzugefügt, an dessen Boden ein polyklonaler cAMP-Antikörper kovalent immobilisiert ist. Ein alkalische-Phosphatase-gekoppeltes cAMP wurde anschließend aufgetragen, welches kompetitiv zum zellulären cAMP an den Antikörper bindet. Nach einem Waschschrift wurde p-Nitrophenylphosphat hinzugefügt, um als Substrat der Alkalischen Phosphatase konzentrationsabhängig einen gelben Farbumschlag auszulösen. Die Intensität der Gelbfärbung verhält sich invers sigmoidal zur cAMP-Konzentration und wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm mithilfe des Mikroplattenlesers bestimmt. Die Standardkurve ermöglicht durch Abgleichung die Ermittlung der cAMP-Konzentration in den Proben.

4.5 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Mittels Rasterkraftmikroskopie (Engl.: *Atomic Force Microscopy*, AFM) kann die Topografie von Oberflächen verschiedenster Objekte in hoher Nanometerauflösung bestimmt und die erhobenen Daten in Hinsicht auf Elastizität und Steifheit der Objekte ausgewertet werden. Eine Blattfeder mit einer Spitze tastet dafür die zu untersuchende Oberfläche ab. Ein Laser wird auf den vorderen Anteil der Blattfeder gerichtet und von dort auf einen photodiode De-

tektorschirm projiziert. Dieser detektiert über Spannungsunterschiede zum Mittelpunkt des Detektors die genaue Auslenkung der Blattfeder auf zwei Achsen. Die zurückgelegte Distanz wird während der Messung gegen die Auslenkung der Feder aufgetragen, sodass spezifische Kurven für die Annäherung und Rückzug der Feder entstehen.

Bei der Annäherung an eine Oberfläche entstehen nur leichte Schwingungen in der Blattfeder ohne Auslenkung, sodass sich in der Annäherungskurve eine Basislinie abzeichnet. Sobald die Feder die Oberfläche berührt (Kontaktpunkt) wird sie stark ausgelenkt und die Kurve steigt auf der Auslenkungsachse in der Annäherungskurve bis zu einem definierten maximalen Wert (Setpoint, Standard: 0,4 V). Dort verharrt die Blattfeder für eine spezifizierte Zeit (Engl.: *Extend Delay*) und der Rückzug der Feder wird initiiert. Die Auslenkung und dadurch die Rückzugskurve sinkt bis die Blattfeder den Kontaktpunkt erreicht hat. Sobald die Oberfläche nicht mehr berührt wird, wird die Blattfeder nicht mehr ausgelenkt und die Rückzugskurve bildet erneut eine Basislinie. Funktionalisierung der Oberflächen und Messspitzen durch Proteine ermöglichen in der Rasterkraftmikroskopie die Detektion spezifischer Protein-Protein-Interaktionen und deren Eigenschaften. Binden zwei Proteine aneinander, wird die Feder beim Rückzug über die Basislinie hinaus zurückgehalten und ins Negative ausgelenkt, bis die Proteininteraktion abrupt abreißt. Dieses spezifische Muster definiert ein Bindungsereignis und kann in der Rückzugskurve bestimmt werden. Zusätzlich ist die zum Abbriss benötigte Kraft (pN) gleich der Bindungskraft der Protein-Protein-Interaktion.

4.5.1 Desmoglein-Fc-Protein-Aufreinigung

Zur Messung der homophilen Interaktion wurden Fc-gekoppelte extrazelluläre Domänen der desmosomalen Cadherine Dsg 1 und 3 verwendet [99]. Mithilfe von immortalisierten Zellen aus chinesischen Hamster Ovarien (Engl.: *Chinese Hamster Ovary*, CHO) können durch Transfektion spezifische Proteine exprimiert und korrekt gefaltet sowie posttranslational modifiziert werden [152]. Diese Proteine werden von den Zellen ins Medium sezerniert, sodass sie mittels Säulenchromatographie über den Fc-Teil isoliert werden können (Siehe Kapitel 4.2).

Hier wurden CHO-Zellen verwendet, die stabil entweder extrazelluläre Domänen von Dsg1 oder Dsg3 mit gekoppelten Fc-Teil exprimieren und dauerhaft sezernieren. Das Medium wurde 24 h vor der Aufreinigung durch immunglobulindefizientes Medium ersetzt, um Proteinverunreinigungen zu verhindern. Anschließend wurde das Medium gesammelt und der Säulenchromatographie unterzogen. Die aufgereinigten Proteine wurden daraufhin zur Funktionalisierung der Rasterkraftmikroskop-Spitze und des Glimmers verwendet.

4.5.2 Funktionalisierung der Messspitze und Oberfläche

Als Oberfläche wurde ein Muskovit-Glimmerblatt (SPI-Supplies) verwendet. Dieses Mineral aus der Gruppe der Schichtsilikate kann aufgrund seiner kristallinen Struktur durch mecha-

nische Spaltung eine ultraglatte Oberfläche bilden. An Silanogruppen auf dieser Oberfläche wurden mithilfe von Ethanolamin durch spontane Veresterung amino-reaktive Gruppen gebunden, welche anschließend mit rekombinanten Proteinen funktionalisiert wurden. Ähnlich verläuft die Veresterung bei Messfedern aus Siliziumnitrat (Si_3N_4) (MLCT, Bruker) [153].

Ethanolamin wurde vor der Beschichtung frisch vorbereitet. Dazu wurden 4,95 g Ethanolamin.HCL in 9 ml DMSO bei 50°C gelöst. Dem Ethanolamingemisch wurden getrocknete Molekularsiebkügelchen hinzugegeben und anschließend für 2 h in einen Exsikkator mit geschlossenem Kompressor platziert, um jegliches Wasser zu entziehen. Messspitzen und Glimmer wurden zweimalig für 5 min in Chloroform gewaschen und danach gründlich an der Luft getrocknet, bevor sie über Nacht in dem Ethanolamingemisch zur Funktionalisierung platziert wurden. Am nächsten Tag wurde ein Polyethylenglykol-Verbinder (PEG-Linker) an die generierte funktionelle Aminogruppe gekoppelt, um rekombinanten Proteinen später während der Messung die Möglichkeit der Reorientierung zu geben. Dadurch kann die Bindungseffizienz der Proteine auf bis zu 25 % gesteigert werden [154]. Außerdem entsprechen die physikalischen Eigenschaften der PEG-Linker dem einer Feder und folgen dementsprechend dem Hookeschem Gesetz, wodurch der typische Kurvenverlauf der Protein-Proteininteraktionen entsteht [155]. Als PEG-Linker wurde heterobifunktionelles Acetal-PEG-N-Hydroxysuccinimid mit 18 nm Länge verwendet, bei dem die N-Hydroxysuccinimgruppe mit hoher Affinität an die Aminogruppe der vorherig funktionalisierten Oberflächen bindet. Vor der Linkerbindung wurden die Objekte zweimalig in DMSO für 3 min gewaschen und danach drei mal für 3 min in 100 % Ethanol gereinigt. Der PEG-Linker wurde in $600\ \mu\text{l}$ Chloroform und $30\ \mu\text{l}$ Triethylamin gelöst und für 2 h in einem luftdichten Gefäß zu Messspitzen und Glimmer hinzugegeben. Die Acetalgruppe des Linkers wurde für 5 min mithilfe von 1 % Zitronensäure zu einer Aldehydgruppe transformiert. Auf die Spitzen und Glimmer wurde $50\ \mu\text{l}$ des gewünschten rekombinanten Proteins mit einer Konzentration von $0,15\ \text{mg/ml}$ pipettiert. Durch Zugabe von Natriumcyanoborhydrid wurde die Aldehydgruppe des Linkers durch Imin-Reduktion zu einer reaktiven Aminogruppe transformiert, die daraufhin die Lysinreste des Fc-Fragment der rekombinanten Proteine kovalent binden kann. Abschließend wurde $2,5\ \mu\text{l}$ 1 M Ethanolamin (pH 9,6) zugegeben, um die Reaktion zu stoppen. Die Spitzen und Glimmer wurden auf Parafilm in einer Petrischale in HBSS bei 4°C gelagert und innerhalb von 10 Tagen verwendet.

4.5.3 Messung und Auswertung

Die Messungen wurden auf einem NanoWizard®3 AFM (JPK-Instruments) mit der Software SPMControl v4 (JPK Instruments) durchgeführt. Dazu wurde ein beschichteter Glimmer mithilfe eines A-Silikons auf einen Objektträger geklebt und ein Silikonring als hydrophobe Barriere um den Glimmer platziert. In den Silikonring wurden $300\ \mu\text{l}$ 37°C warmes HBSS gegeben, damit die Proteine ihre natürliche Struktur bewahren. Für die Messung wurde die

pyramidale D-Feder eines MLCT-Trägers verwendet, die mit einer Klammer auf der Glashalterung des AFM befestigt wurde. Der Laser wurde zentral auf die Spitze der Blattfeder positioniert und mittig auf dem Messdetektor ausgerichtet.

Vor der Messung wurde eine Kalibrierung der Messfeder durchgeführt. Zur Bestimmung der Sensitivität wurde die *Hard-surface-Contact*-Methode verwendet. Dabei wird die Federspitze auf den Glimmer gedrückt und die Auslenkung der Blattfeder gemessen. Die resultierende Steigung der Kurve im Kontaktbereich entspricht der Sensitivität der Feder. Weiterhin wurde durch Schwingen der Feder in der Messflüssigkeit über Wärmetauscher die spezifische Federkonstante kalibriert [156]. Die nominale Federkonstante der D-Feder liegt bei 0,03 N/m.

Die Messungen wurden im Kraftspektroskopie-Modus (FS-Modus) des AFM durchgeführt. Die Zuggeschwindigkeit wurde auf 1 $\mu\text{m/s}$, die Verweildauer auf 0.1 s und die Zuglänge auf 0,3 μm eingestellt. Die Messung wurde in einem Raster mit 10 x 10 Messpunkten in einem 25 x 25 μm Areal durchgeführt und fünf mal wiederholt, sodass letztlich 500 Einzelmessungen durchgeführt wurden. Daraufhin wurde für 1 h die jeweilige Versuchskondition inkubiert. Nach Entfernung des Inkubationsmediums wurde die Messung in 300 μl frischem HBSS unter denselben Spezifikationen wiederholt. Die Messkurven wurden nach Bindungsereignissen ausgewertet und ihre Anzahl pro Messung als Bindungsfrequenz definiert. Die Bindungsfrequenz nach der IgG-Inkubation wurde letztlich auf die Bindungsfrequenz vor der Messung bezogen und als relative Bindungsfrequenz dargestellt.

4.6 Dispase-basierter Dissoziationsversuch

Dissoziationsversuche können funktionell die Zell-Zelladhäsion durch Applikation von mechanischen Scherkräften überprüfen [157]. Dazu wurden Zellen in Kulturplatten mit 24 Vertiefungen bis zur Konfluenz kultiviert und folgend mit den verschiedenen Mediatoren und Patientenserum je nach Versuchsaufbau inkubiert. Anschließend wurde der Zellverbund kurz mit PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Mithilfe von Dispase-II, einer sanften neutralen Metalloproteinase, können N-terminal neutrale Peptidbindungen unspezifisch gespalten werden, ohne die Zellmembran anzugreifen. Da diese vor allem in Kollagentypen vorkommen, löst sich der Zellverbund von der Kulturplatte mit intakter interzellulärer Haftung. Dispase-II wurde für 20 min bei 37° C inkubiert. Danach wurde die Dispase mit 350 μl HBSS substituiert. Mechanische Scherkräfte wurden auf den Zellrasen mithilfe einer elektrischen Pipette durch zehnmaliges auf und abpipettieren ausgeübt, wodurch der Zellrasen fragmentiert. Die Anzahl der Fragmente korreliert mit der Zell-Zelladhäsion. Zur Darstellung der Fragmente wurden 10 μM 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromid (MTT) für 10 min inkubiert. Die Farbe des Tetrazoliumsalzes verändert sich von Gelb nach Lila abhängig der Glykolyseleistung der Zellen. Die Fragmente wurden anschließend unter

einem Binokular gezählt und mit einer Canon EOS600D fotografiert.

4.7 Fluoreszenz-basierte Mikroskopie

Im Jahr 1852 beschrieb George Gabriel Stokes das Phänomen der Fluoreszenz [158]. Dabei handelt es sich um die Fähigkeit einiger Stoffe, Photonen einer spezifischen Wellenlänge (λ) zu absorbieren, wodurch Elektronen des Stoffes in einen angeregten hochenergetischen aber instabileren Zustand versetzt werden. Ein Teil der Energie wird unter anderem durch Vibration verbraucht, sodass bei Relaxation in den Ursprungszustand Photonen mit geringerer Energie und demnach größerer Wellenlänge emittiert werden. In der Fluoreszenzmikroskopie kann Licht mit spezifischer Exzitationswellenlänge ($Ex\lambda$) emittiert und dadurch fluoreszierende Farbstoffe (Fluorophore) angeregt und Photonen der resultierenden Emissionwellenlänge ($Em\lambda$) mithilfe von Detektoren aufgenommen werden.

Auch lebende Organismen können Proteine mit fluoreszierenden Eigenschaften exprimieren. Das grüne fluoreszierende Protein (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* wurde im Jahr 1952 durch Osamu Shimomura entdeckt und isoliert [159]. Durch die Entschlüsselung der Kristallstruktur konnten seitdem durch genetische Mutationen weitere Proteine mit unterschiedlichen Fluoreszenzspektren hergestellt werden, zu denen das verstärkte gelbe fluoreszierende Protein (Engl: *enhanced yellow fluorescence protein* (EYFP); $Ex\lambda$: 513 nm, $Em\lambda$: 527 nm) zählt [160]. Durch genspezifische Fusionierung an ein Protein-von-Interesse können diese ohne Färbung in der Fluoreszenzmikroskopie in Zellen dargestellt werden. Hier wurde eine HaCaT Keratinozytenzelllinie verwendet, welche durch Transfektion und Einzelzellklonierung stabil ein Plasmid mit EYFP-fusioniertem humanem Zytokeratin-5 (CK5) exprimiert [161]. Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Reinhard Windoffer and Dr. Nicole Schwarz zur Verfügung gestellt (Institut für molekulare und zelluläre Anatomie, RWTH Aachen). Ihre Kulturbedingungen sind kongruent zu normalen HaCaT-Keratinozyten.

4.7.1 Indirekte Immunfluoreszenz

In der indirekten Immunfluoreszenz werden Proteine mithilfe von Antikörpern dargestellt. Die Antigen-bindende Domäne eines Primär-Antikörpers bindet in Zellen an das Epitop des zu untersuchenden Proteins. Anschließend kann ein speziesspezifischer Sekundär-Antikörper mit gekoppeltem Fluorophor die Fc-Region des Primär-Antikörper binden und durch ein Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden.

Im Detail wurden die zu untersuchenden Zellen bis zur Konfluenz auf Deckgläsern (\varnothing 12 mm) kultiviert und anschließend je nach experimentellem Aufbau behandelt. Danach wurde der Zellrasen kurz mit 37° C PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Mithilfe von 2 % Formaldehyd wurden die Zellen für 10 min fixiert, sodass keine Proteindegradierung statt-

finden kann. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 1% Triton-X100 5 min permeabilisiert, um Lipide aus der Membran zu lösen und eine Antikörperpenetration in die Zelle zu ermöglichen. Die Deckgläser wurden auf beschriftete Objektträger überführt und unspezifische Antikörperbindungsstellen für 1 h mithilfe einer Mischung aus Rinderserumalbumin (BSA) und normalem Ziegen Serum (NGS) bei RT geblockt. Danach wurde der Primär-Antikörper je nach Spezifikation in PBS verdünnt (Tab. 5), 30 μ l wurden pro Deckgläschen appliziert und über Nacht bei 4° C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am Folgetag wurde der ungebundene Primär-Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Anschließend wurde ein Cyanin 3 (cy3)-konjugierter Sekundär-Antikörper gegen die Spezies des Primär-Antikörpers in PBS verdünnt (Tab. 6) und jeweils 30 μ l auf jedem Deckglas für 1 h bei RT inkubiert. Cy3 ist ein synthetischer organischer Farbstoff mit einer Anregung bei einer Wellenlänge von 540 nm und einer Emission von 570 nm. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS wurde das Deckgläschen kurz mit destilliertem Wasser gespült um Salzreste zu entfernen, und daraufhin mit n-Propylgallat auf einem Objektträger eingedeckelt, um das Bleichen der Fluorophore zu verhindern [162]. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Leica SP5.II Konfokalmikroskop durch ein 63x NA 1,4 Ölobjectiv mit der Software LAS AF 3.3 (Leica) aufgenommen. EYFP wurde durch einen Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 514 nm und Cy3 mit einem Helium-Neon-Laser mit 550 nm angeregt. Die Emissionsspektren wurden dem Fluorophor entsprechend eingestellt, auf Überlappungen überprüft und durch einen Photomultiplizierer (PMT) pro Kondition an drei verschiedenen Stellen pro Experiment mit denselben Einstellungen aufgenommen. Zur Analyse der Zytokeratinretraktion wurde das Fluoreszenzintensitätsprofil mittig über der Zellgrenze mithilfe von ImageJ erstellt und der Abstand zwischen den Intensitätsspitzen gemessen.

4.7.2 Fura-2 ratiometrische Ca^{2+} -Messung

Fluoreszierende Farbstoffe können auch verwendet werden, um Ca^{2+} -Konzentrationsveränderungen in lebenden Zellen nachzuweisen. Diese Farbstoffe verändern über Chelation ihre Exzitationswellenlänge wodurch ratiometrisch in hoher temporaler Auflösung jegliche Veränderung des intrazellulären Calciumspiegels detektiert werden kann. Fura2-AM ist einer der effektivsten Farbstoffe. Das Acetylmethylester (AM) neutralisiert den Farbstoff und macht ihn somit membrangängig. Intrazellulär wird durch Hydrolyse der Ester abgespalten und dadurch der Farbstoff aktiviert. In der Ca^{2+} -ungebundenen Form hat er eine Exzitationswellenlänge von 320 nm welche auf 380 nm in der gebundenen Form steigt, die Emissionswellenlänge bleibt unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentration bei 500 nm.

Zellen wurden in speziellen, für Lebendzellmikroskopie entwickelten, μ -Kulturplatten (μ -Slide, Ibidi) mit dünnem # 1,5 Polymerdeckglas als Boden und 8 Vertiefungen ausgesät. Sobald die Zellen Konfluenz erreichten, wurde das Medium kurz mit PBS vom Monolayer abgewaschen.

Danach wurden die Zellen für 20 min mit einer Mischung aus 0,4 % (v/v) Fura2-AM und 0,4 % (v/v) Pluronic F127 in Messpuffer bei 37° C inkubiert. Pluronic F126 fördert das Dispergieren des Acetylmethylesters, sodass die Zellen gleichmäßig geladen werden. Der Messpuffer wurde erneut ausgetauscht und die Kulturplatte für 20 min bei 37° C platziert, wodurch der Acetylmethylester gleichmäßig von den Zellen hydrolysiert wird. Die Messungen wurden mit einem 63x EC-Plan-Neofluar Ölobjektiv auf einem Axio Observer A1 invertiertem Mikroskop (Carl Zeiss) durchgeführt. Ein Polychrom V Monochromator (Till Photonics) wurde zur Illumination der Proben verwendet. Das Emissionsspektrum wurde durch einen Fura-Filterset (AHF) gefiltert und mithilfe der Software Metafluor (Molecular Devices) und einer CoolSNAP-Hq2 CCD Kamera (Photometrics) aufgenommen, während die Probe bei 340 und 380 nm mit Rücksicht auf Phototoxizität für 10 ms jede Sekunde belichtet wurde. Fünf Einzelzellen wurden in Metafluor markiert. Nach Messbeginn wurde für 20 sek eine Intensitätsbasislinie etabliert. Anschließend wurde bei laufender Messung das entsprechende IgG hinzupipettiert. Die relative intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration lässt sich durch den Quotienten aus der Emissionsintensitäten bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm durch die Emissionsintensitäten bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm berechnen.

4.8 CRISPR/Cas9-vermittelte Gen-Modifikation

Die Desoxyribonukleinsäure (Engl.: *Deoxyribonucleic acid*, DNA) ist der Bauplan des Körpers und bildet die Basis für die Transkription und anschließende Translation von Proteinen. Gene können durch Modifikationen an der DNA außer Gefecht gesetzt werden (Engl.: *Knockout*), wodurch das assoziierte Proteine nicht mehr synthetisiert wird. Diese Methoden waren sehr aufwendig, bis die Gensequenzen CRISPR (Engl.: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) und das CRISPR-assoziierte (Cas) Protein in Bakterien entdeckt und dessen Funktionsweisen erforscht wurden [163]. Dabei handelt es sich um ein adaptives Abwehrsystem, das sich Infektionen merken und DNA von z.B. Bakteriophagen bei erneutem Kontakt mithilfe einer molekularen Schere zerstören kann. Zwei verschiedene Bestandteile werden dazu benötigt: Zum einen die molekulare Schere Cas9, die mit zwei Bindungsstellen für jeweils einen der beiden DNA-Stränge als Endonuklease fungiert und die DNA zerschneidet; zum anderen eine Vorlage die in Form von Ribonukleinsäuren (RNA) aus der CRISPR-Gensequenz transkribiert wird (CRISPR-RNA, crRNA) und mithilfe der sogenannten tracrRNA an Cas9 bindet. Diese Vorlage besteht aus 20 Basen komplementär zum DNA-Strang des Zielgens und wird am 3' Ende durch eine drei Basen lange, für die spezifische Cas-definierte *Protospacer Adjacent Motif* (PAM)-Sequenz eingeleitet. Dadurch legt sich die Cas9 von 3' nach 5' an die Ziel-DNA an und löst einen Doppelstrangbruch (DSB) ungefähr 3-4 Basen nach der PAM-Sequenz aus. Dieser Mechanismus kann zur Modifikation von DNA verwendet werden, indem

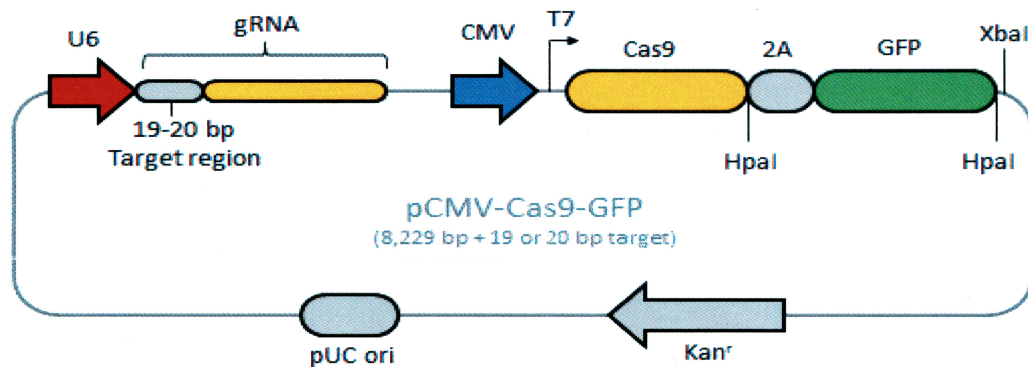


Abbildung 5: *Cas9*-Vektoraufbau.

Die Vektoren besitzen als Replikationsursprung eine pUC-ori-Region, welche die Vervielfältigung in *Escherichia coli* ermöglicht. Die RNA-Promotorregion U6 beginnt die Transkription der gRNA, die Kombination aus crRNA und tracrRNA. Synthese der Cas9, welche durch einen 2A selbstspaltenden Linker mit einem Grün-Fluoreszierendem Protein (GFP) gekoppelt ist, wird durch einen Cytomegalovirus (CMV)-Promoter begonnen. Durch den Linker werden beide Proteine unabhängig voneinander nach der Translation gefaltet und existieren dadurch in der Zelle separat. T7, HpaI, und XbaI stellen Restriktionsstellen im Vektor dar. Letztlich wird über die Kan^r-Sequenz eine Kanamycin-Resistenz zur Antibiotikaselektion in die Zelle integriert. Reproduziert mit Genehmigung von Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland.

alle Komponenten mithilfe von bakteriellen Vektoren in eukaryotische Zellen transfiziert werden. Die DNA der Zelle wird an der crRNA homologen Gensequenz geschnitten und zelluläre Reparaturmechanismen versuchen, den DSB zu beheben. Zu diesen Reparaturmechanismen zählen nicht-homologe Endverknüpfungen (Engl.: *non-homologous end-joining*, NHEJ) und homologie-gerichtete Reparaturen (Engl.: *homology-directed repair*, HDR). Beide Vorgänge sind fehleranfällig und können dementsprechend zur Veränderung der Gensequenz führen. Ist die Basenpaardeletion nicht durch drei teilbar entsteht eine Leserasterverschiebung, wodurch ein Knockout erzielt wird.

4.8.1 Vektoren, Zellkultur und Transfektion

Jeweils zwei Vektoren mit passenden crRNA-Sequenzen für Dsg1, Dsg2 und Dsg3 wurden ausgesucht und bestellt (Sigma-Aldrich) (Fig. 5). Eine chimerische gRNA, bestehend aus crRNA und tracrRNA, bestimmt das Schnittziel der Cas9 [164]. HaCaT Keratinozyten wurden frisch bei Cell Line Services (CLS) bestellt und in Passage 32 verwendet. Für jedes Plasmid wurden zwei Mulden einer Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen ausgesät und bei un-

gefähr 80 % Konfluenz mithilfe von Lipofectamin-2000 (Invitrogen) mit dem jeweiligen Plasmid nach Herstellerangaben transfiziert. Auf den Zellen wurde jeweils 2 ml DMEM-Medium vorgelegt. Der Transfektionsansatz wurde vorbereitet, indem jeweils 4 μg DNA und separat 10 μl Lipofectamin-2000 in jeweils 250 μl Opti-MEM gelöst wurden. Nach einer 5 min Inkubationsperiode bei RT wurden beide Mixturen vorsichtig vermischt und zum vorgelegten Medium der Zellen hinzugegeben. Nach 6 h wurde das Medium durch frisches DMEM-Medium ersetzt. Erfolgreich-transfizierte Zellen exprimieren nach der Transfektion Cas9-GFP, wodurch anhand des Fluoreszenzsignals Einzelzellkulturen hergestellt werden können, in denen ein Doppelstrangbruch induziert wurde. Dazu wurden GFP-positive Zellen 24 h nach der Transfektion durch einen FACSaria III (BD Transduction) Zell-Sortierer auf jeweils einzelne Mulden von fünf Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen nach ihrer Größe und Fluoreszenzintensität sortiert, um vitale transfizierte Klone zu garantieren. Dadurch entstanden ca. 20-48 vitale Zellklone pro Plasmid mit potentiell Gen-Knockout. Jeden dritten Tag wurde das Medium gewechselt und bei Bedarf wurden die Zellklone auf eine größere Zellkulturplatte expandiert bis ein T25 Zellkulturgefäß erreicht wurde. Der Erfolg wurde anschließend durch die Abwesenheit der jeweiligen Proteine mithilfe von Western Blot-Analyse und Immunfärbung bestimmt. (Siehe Kapitel 4.4, 4.7.1)

4.8.2 Phenol-Chloroform-DNA-Extraktion

Um die genaue Genmodifikation zu identifizieren, wurde genomische DNA aus den verschiedenen Zellklonen isoliert und mittels Sanger-Sequenzierung analysiert. Dazu wurden HaCaT-Zellen und genmodifizierte Klone bis zur Konfluenz in einer Kulturplatte mit 24 Vertiefungen kultiviert und mithilfe von 200 μl SDS lysiert. Danach wurden 200 μl des Extraktionspuffers (Tab. 3.4) hinzugefügt und für eine Minute gevortext. Nach einer Zentrifugation bei 19.000 G für 5 min bilden sich drei Phasen: unten eine unpolare Chloroform-Phenol-Phase (Extraktionspuffer), welche hauptsächlich RNA beinhaltet; oben eine polare wässrige Phase, die vor allem DNA enthält, und dazwischen eine Interphase, die hauptsächlich Proteine aufweist. Nach der Auftrennung wird die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut mit 200 μl Extraktionspuffer aufgefüllt, um die DNA weiter aufzureinigen. Dieser Schritt wurde ein drittes mal wiederholt, sodass die proteinreiche Interphase nicht mehr existierte. Danach wurde die wässrige Phase erneut abgehoben und zur Ethanol-Präzipitation der DNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt, um die DNA in Elutionspuffer zu überführen und vom Chloroform zu reinigen. Ammoniumacetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) wurde bis zu einer Konzentration von 0.75 M zusammen mit 20 μg Glycogen hinzugegeben. Durch Applikation der 2.5x Menge 100% Ethanol wurde die Dielektrizitätskonstante der Lösung herabgesetzt, wodurch sich das Ammoniumsalz (NH_4) an das Phosphat-Rückgrat (PO_3^-) der DNA bindet und folglich ausfällt. Danach wurde die Mischung über Nacht bei -20°C inkubiert und am nächsten Tag

bei 19.000 G und 4° C zentrifugiert, um die DNA zu sedimentieren. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und verworfen. 300 μ l 80 % Ethanol wurde auf dem Sediment hinzugeführt und kräftig vermischt. Nach erneuter Abnahme des Überstandes wurde dieser Schritt ein weiteres Mal wiederholt, um restliche Salze von der DNA zu waschen. Letztlich wurde das Ethanol entfernt, die DNA bei RT zum Trocknen platziert und mit 100 μ l Elutionspuffer gelöst.

Das Primerdesign und die Sequenzierung wurden von Eurofins (München, Deutschland) geplant und durchgeführt. Dazu wurden Primer entwickelt, welche die Schnittstelle mit ungefähr 500 bp umschneiden. Mittels Polymerase-Kettenreaktion wurden die Abschnitte vervielfältigt und danach mittels Sanger-Sequenzierung analysiert. Die Auswertung wurde mithilfe der Online-Software Benchling (<https://www.benchling.com/>) durchgeführt. Alle Allele bei heterozygoten Veränderungen wurden per Hand auseinandergerechnet und graphisch dargestellt.

4.9 Datenauswertung und Statistik

Abbildungen wurden mithilfe von Photoshop CC (Adobe Systems, San Jose, USA) erstellt. Daten wurden in Excel (Microsoft, Redmond, USA) zusammengeführt und in Graphen dargestellt. Statistische Signifikanz wurde entweder mit einseitigem oder zweiseitigem ANOVA in Graphpad Prism (Graphpad Software, LaJolla, USA) ermittelt. Der einseitige ANOVA wurde mithilfe von Dunn-Šidak Korrektur korrigiert, während für zweiseitige Fishers-LSD-Test verwendet wurde. Repetitionen sind bei den jeweiligen Experimenten angegeben und statistische Signifikanz wurde für eine Überschreitungswahrscheinlichkeit (p) der Nullhypothese kleiner als 0.05 angenommen.

Kapitel 5

Ergebnisse

5.1 PV-Seren und Antikörpertiter

Um die Signalwegsaktivierungen unterschiedlicher Pemphigus-Varianten zu vergleichen, wurden Patienten mit aktiver Erkrankung und typischer klinischer sowie serologischer Präsentation der Phänotypen aquiriert. Alle IgG-Fraktionen zeigten im aDsg1- und aDsg3-ELISA typische Verteilung der Dsg-Antikörper respektiv zu ihren Phänotypen (Tab. 9). Jeweils eine mukosale PV-IgG- und eine PF-IgG-Fraktion zeigten hohe Werte über 1600 U/ml, während sich die restlichen IgG-Fraktionen zwischen 160 und 270 U/ml befanden.

ELISA Score			
	anti-Dsg3 (U/ml)	anti-Dsg1 (U/ml)	Phänotyp
c-IgG	-	-	gesunde Kontrollgruppe
m-PV-IgG	2391.0	-	mukosal
m-PV-IgG 2	162.9	-	mukosal
at-PV-IgG	153.4	-	atypisch kutan
mc-PV-IgG	225.5	218.8	mukokutan
mc-PV-IgG 2	172.5	154.8	mukokutan
mc-PV-IgG 3	153.8	172.5	mukokutan
PF-IgG	-	1645.0	kutan
PF-IgG 2	-	266.4	kutan
PF-IgG 3	-	215.3	kutan

Tabelle 9: Verwendete Patienten-IgG-Fraktionen mit ihren jeweiligen Bezeichnungen, ELISA-Werten und Krankheitsphänotypen

Der atypische Phänotyp zeigte klinisch flache Blasen am Integument ohne Beteiligung der Mukosa mit aDsg3-Antikörpertitern von 153,4 U/ml und aDsg1-Antikörpertitern unter dem Grenzwert von 20 U/ml. Fotografische Aufnahmen der atypischen klinischen Manifestation sind in der Einleitung zu finden (Abb. 4). Die Blasenbildung beschränkte sich in histologischen Aufnahmen von Patientenbiopsien auf die suprabasale Epidermis ohne Beteiligung der Mukosa (Abb. 4). Als Vergleichskondition wurde AK23, ein monoklonaler aDsg3-Autoantikörper aus einem Pemphigus-Mausmodell, in einer Konzentration von 75 $\mu\text{g/ml}$ verwendet, um Ergebnisse auf aDsg3-Antikörper einzugrenzen.

Neben aDsg1- und aDsg3-Antikörpern können auch weitere IgGs in den Fraktionen vorkommen, welche zelluläre Veränderungen induzieren können. Zur Darstellung wurden Antikörperprofile der IgG-Fraktionen in Form eines Immunoblots erstellt (Daten hier nicht aufgeführt). Dazu wurden auf einem Western Blot mit HaCaT-Zelllysaten die IgG-Fraktionen als Primär-Antikörper verwendet und mit einem monoklonalen aDsg3-Antikörper verglichen. Die Reaktivitäten der IgG-Fraktionen mit den Keratinozytenproteinen wurden durch einen HRP-gekoppelten Ziegenantikörper gegen humanes IgG visualisiert, während für AK23 ein HRP-gekoppelter anti-Maus-Ziegenantikörper verwendet wurde. Die Anwesenheit einer Vielzahl an Antikörpern zeigte sich durch Banden auf verschiedenen Proteingrößen mit unterschiedlicher Ausprägung bei den verschiedenen Konditionen. Bei m-PV-IgG, at-PV-IgG und zu einem geringeren Maße auch bei mc-PV-IgG waren Banden auf Höhe der aDsg3-Vergleichskondition detektierbar. Da Proteine für die Gelelektrophorese hitzedenaturiert und dadurch konformationelle Epitope reduziert wurden, konnte mithilfe von AK23 keine spezifische aDsg3-Bande detektiert werden [95].

5.2 Autoantikörper-induzierte pathogene Veränderungen in kultivierten Keratinozyten

Zwei der charakteristischen strukturellen Kennzeichen der Pemphigus-Pathogenese stellen die Dsg3-Depletion und Zytokeratin-Retraktion dar. Zur Darstellung dieser Mechanismen wurden die respektiven IgG-Fraktionen für 24 h auf CK5-YFP exprimierenden HaCaT-Zellen inkubiert. Unter Kontrollbedingungen zeigte sich das Dsg3-Signal linear entlang der Membran (Abb. 6 a). Bei allen pathogenen IgG-Fraktionen konnten Fragmentierungen der Dsg3-Färbung detektiert werden, jedoch zu unterschiedlicher Stärke. Während AK23 und PF-IgG die geringste Fragmentierung zeigten, war die Fragmentierung am stärksten bei Inkubation mit at-PV-IgG sowie mc-PV-IgG ausgeprägt (Abb. 6 b-f).

Das CK5-Signal zeigte unter Kontrollbedingungen ein filamentäres Netz, das eng am Dsg3-Signal anlag (Abb. 6 g). Durch die Inkubation der IgG-Fraktionen entfernte sich das Keratinnetz von der Dsg3 Färbung und dementsprechend der Membran (Abb. 6 o-r).

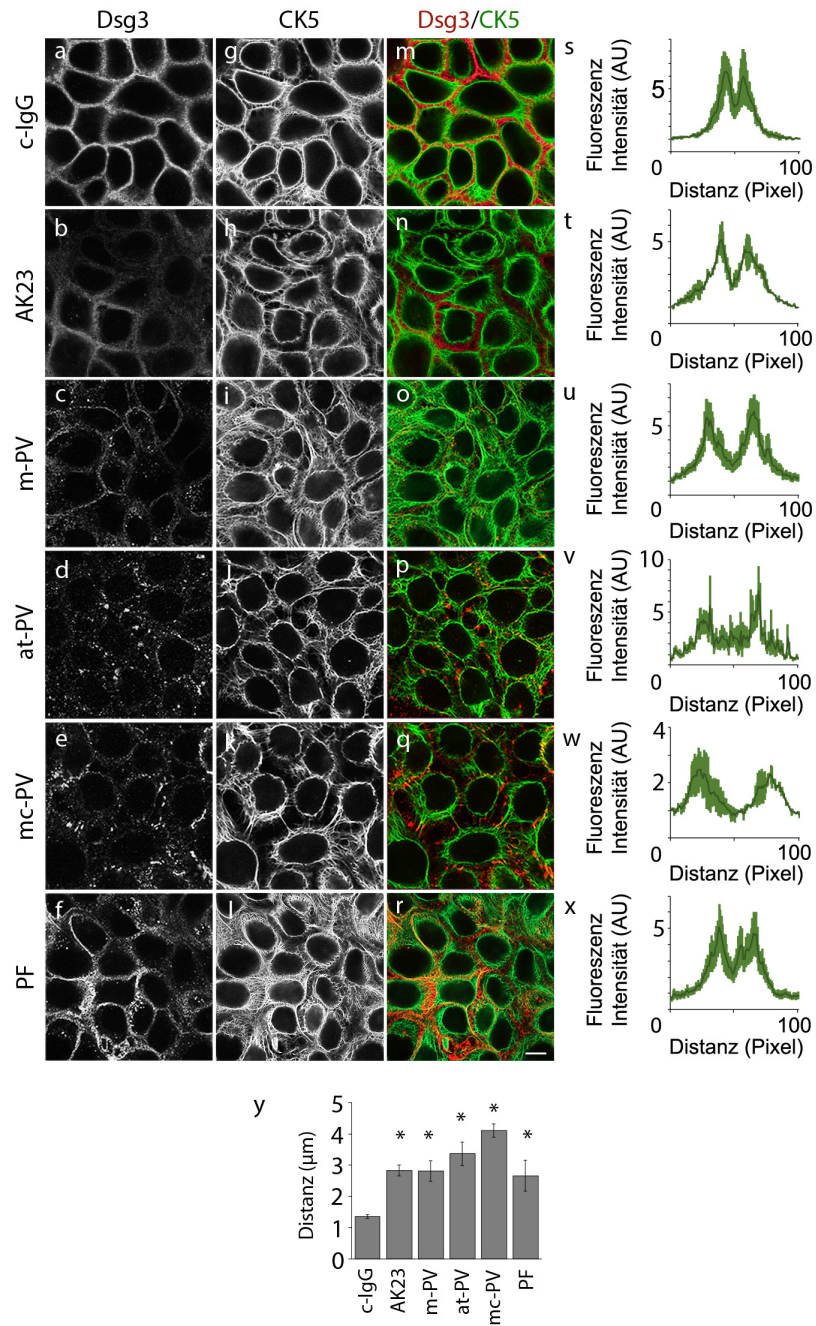


Abbildung 6: *Desmoglein 3-Depletion und Zytokeratin-Retraktion*

Representative Aufnahmen von CK5-YFP exprimierenden HaCaT-Zellen mit Dsg3-Immundefärbung nach Inkubation der verschiedenen IgG-Fractionen für 24 h. Dsg3-Färbung (a-f) und CK5-Expression (g-l) mit der assoziierten Überlagerung beider Signale (m-r) (Maßstab = 10 µm). Die Fluoreszenzintensität der CK-5-Expression über eine Distanz von 100 Pixeln zentral auf der Membran (g-x). Auswertung der Distanz zwischen den Intensitätsmaxima (y) (n = 4, * p < 0,05 vs. c-IgG). Modifiziert aus Walter et al., 2017 [165].

Um diese Retraktion zu quantifizieren, wurde mithilfe von ImageJ eine Linie mit einer Länge von 100 Pixeln zentral über die Dsg3-Färbung gezeichnet und die Intensität des CK5-Signals entlang dieser Linie bestimmt (Abb. 6 s-x). Die Entfernung der Intensitätsmaxima repräsentiert die Ausprägung der Keratinretraktion (Abb. 6 y). Nach Inkubation mit allen IgG-Fractionen inklusive at-PV erhöhte sich die Distanz, während sich die Retraktion am ausgeprägtesten bei mc-PV-IgG Behandlung darstellte. Zusammen mit dem Adhäsionsverlust in Dispase-basierten Dissoziationsversuchen wird dadurch die Pathogenität aller IgG-Fractionen mit den typischen strukturellen Veränderungen nachgewiesen (siehe Kapitel 5.5).

5.3 Autoantikörper-spezifische Signalwege bei verschiedenen klinischen Phänotypen des Pemphigus

Zunächst wurden die bekanntesten Signalwege der Pemphigus-Pathogenese auf ihre Aktivierung bei den verschiedenen Phänotypen analysiert.

Dazu wurde die Phosphorylierung und damit Aktivierung von p38MAPK, Src und ERK mithilfe von phospho-spezifischen Antikörpern in Western Blot-Analysen nach Inkubation der verschiedenen IgG-Fractionen bestimmt. HaCaT-Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend das Medium gewechselt. Am nächsten Tag wurden die IgG-Fractionen für 30 min hinzugefügt und Proteine anschließend mithilfe der Triton-Fraktionierung extrahiert. Eine Aktivierung von p38MAPK konnte nach Inkubation mit allen Pemphigus-IgG-Fractionen in der löslichen Zellfraktion nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte eine Src-Aktivierung nach Inkubation mit AK23, m-PV-IgG, mc-PV-IgG sowie at-PV-IgG in der zytoskelettalen Fraktion, aber nicht durch PF-IgG mit aDsg1-Antikörpern, detektiert werden und dementsprechend unter Konditionen, in denen aDsg3-Antikörpern vorhanden waren. Andererseits zeigte sich eine ERK-Aktivierung in der löslichen Fraktion nur bei Inkubation von mc-PV-IgG und PF-IgG und somit nach Inkubation von Fraktionen mit aDsg1-Antikörpern (Abb. 7).

Als einer der schnellsten Signalwege der Pemphigus-Pathogenese und PKC-Aktivatoren wurde die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration mithilfe der Fura-2 ratiometrischen Fluoreszenzmessung an lebenden Zellen in Echtzeit dargestellt. Für 20 sek wurde eine Basislinie definiert und anschließend bei laufender Messung die jeweilige Kondition hinzugefügt. Die Ca^{2+} -Konzentration wurde 40 sek nach Zugabe berechnet. Innerhalb von wenigen Sekunden löste mc-PV-IgG und PF-IgG einen rapiden Ca^{2+} -Influx aus, der anschließend in einen langsameren transienten Einstrom umschlug. Durch Inkubation mit AK23, m-PV-IgG sowie at-PV-IgG, das heißt in Bedingungen in denen nur Autoantikörper gegen Dsg3 vorhanden waren, wurden keine signifikanten Veränderungen in der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ausgelöst (Abb. 8).

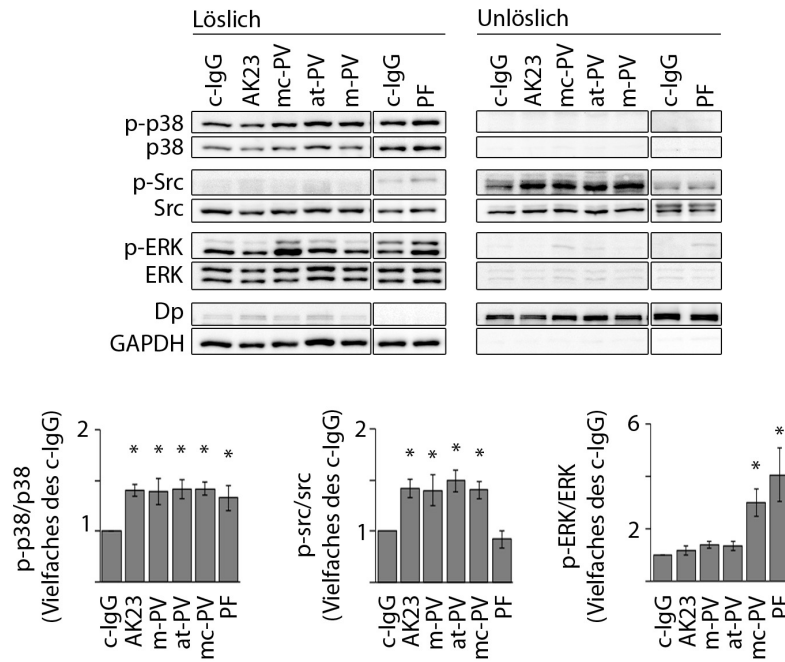


Abbildung 7: *p38MAPK-, Src- und ERK-Aktivierung nach Inkubation mit IgG-Fraktionen*
 Representative Western Blot-Analysen der Aktivierung von p38MAPK, Src, und ERK nach Inkubation mit den verschiedenen IgG-Fraktionen für 30 min mit densitometrischen Quantifizierungen der Phosphorylierung. (n = 5-14, * p < 0.05 vs. c-IgG) Modifiziert aus Walter et al., 2017 [165].

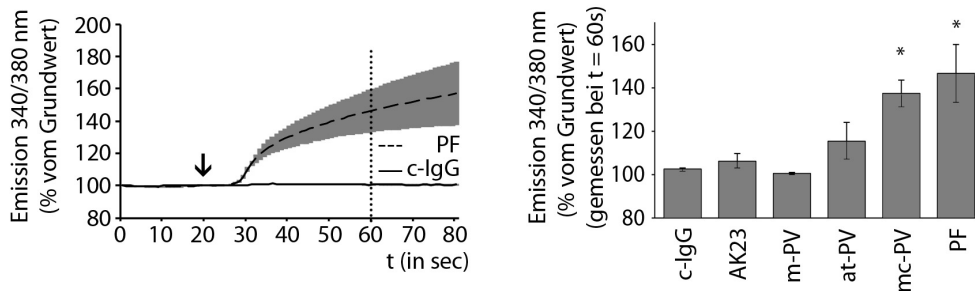


Abbildung 8: *Ca²⁺-Einstrom bei Inkubation von IgG-Fraktionen*
 Durch ratiometrische Fluoreszenzmessungen bestimmte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration in HaCaT-Zellen, während der Inkubation mit verschiedenen IgG-Fraktionen. Repräsentativer Graph (links) und Auswertung der Ca²⁺-Konzentration (rechts). Der Pfeil markiert den Zugabezeitpunkt bei 20 sek und die gestrichelte Linie den Auswertungszeitpunkt bei 60 sek (n = 3, * p < 0.05 vs. c-IgG). Modifiziert aus Walter et al., 2017 [165].

Letztlich wurde der adhäsionsstabilisierende cAMP-Signalweg mithilfe eines ELISA analysiert. Dazu wurde auf einem konfluenten HaCaT-Zellrasen für 6 h die jeweilige IgG-Fraktion inkubiert und anschließend die cAMP-Konzentration bestimmt. Es konnte eine signifikante Erhöhung des cAMP-Spiegels nach Inkubation mit m-PV-IgG und mc-PV-IgG festgestellt werden. Nach AK23, at-PV-IgG oder PF-IgG verblieb die cAMP-Konzentration vergleichbar mit c-IgG (Abb. 9). Dadurch erscheint der Signalweg entweder nur durch manche aDsg3-Antikörper oder durch nicht-Dsg-Autoantikörper aktiviert zu werden.

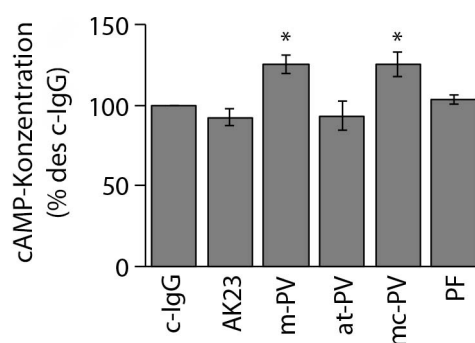


Abbildung 9: cAMP-Konzentration nach Inkubation mit verschiedenen IgG-Fraktionen

ELISA-Messungen der cAMP-Konzentration in HaCaT-Zellen nach Inkubation der IgG-Fraktionen für 6 h (n = 4, * p < 0.05 vs. c-IgG). Modifiziert aus Walter et al., 2017 [165].

Um vorherige Ergebnisse zu bestätigen, wurden die Signalaktivierung mit jeweils einer weiteren IgG-Fraktion der typischen Pemphigus-Phänotypen wiederholt. Zunächst wurde die Pathogenität der IgG-Fraktionen mithilfe von Dissoziationsversuchen in HaCaT-Zellen überprüft. Nach Inkubation der IgG-Fraktionen für 24 h konnte eine Fragmentierung des Zellrasens durch alle Pemphigus-Autoantikörper im Vergleich zu c-IgG beobachtet werden, wodurch die Pathogenität der zweiten Gruppe IgG-Fraktionen nachgewiesen wird (Abb. 10). Folgend wurde die ERK- und p38MAPK-Phosphorylierung sowie der Ca^{2+} -Einstrom unter denselben Versuchsbedingungen wie zuvor mit Inkubation von mc-PV2-IgG, m-PV2-IgG und PF2-IgG analysiert. Auch in der zweiten Gruppe führten alle Pemphigus-Autoantikörper im Vergleich zu c-IgG zu einer starken p38MAPK-Aktivierung, während ERK-Phosphorylierung und Ca^{2+} -Einstrom ebenfalls wie zuvor nur durch mc-PV-IgG und PF-IgG induziert wurden (Abb. 11). Die Immortalisierung von Zellen wird durch Mutationen ermöglicht, welche die zelluläre Division verändern und Zellseneszenz verhindern [166]. Dadurch wird jedoch Differenzierung, Signalwege und auch Zellkontakte modifiziert. Deswegen wurden die Signalwegsanalysen als nächstes in primären NHEK durchgeführt, um die Ergebnisse unter physiologischeren Bedingungen zu bestätigen.

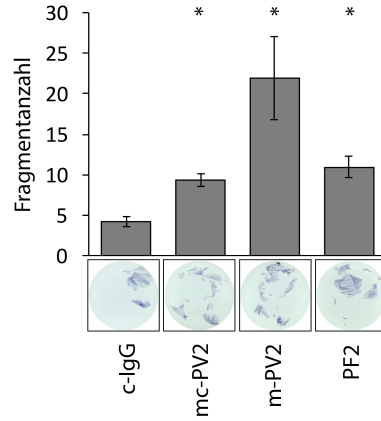


Abbildung 10: Zelladhäsionsverlust durch Inkubation mit zusätzlichen IgG-Fraktionen
 Dissoziationsversuche in HaCaT-Keratinocyten Inkubation für 24 h mit c-IgG, mc-PV2-IgG, m-PV2-IgG sowie PF2-IgG (n = 3, * p < 0.05). Modifiziert aus Walter et al., 2017 [165].

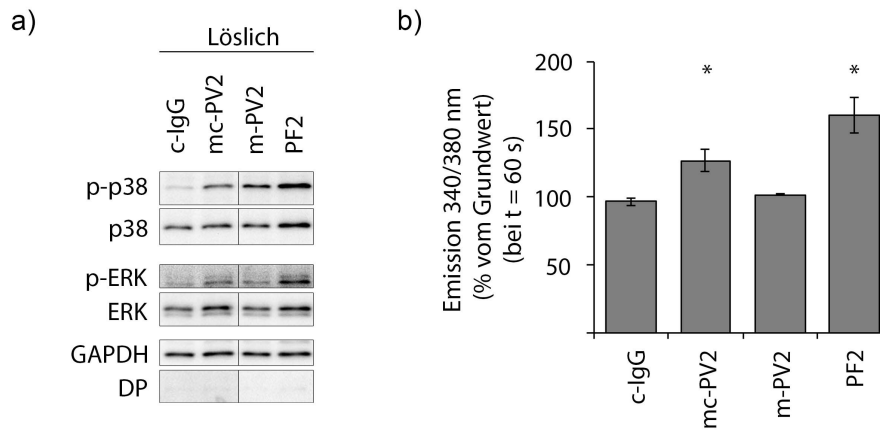


Abbildung 11: Signalwegsmodulation durch zusätzliche IgG-Fraktionen.

a) Representative Western Blot-Analyse der löslichen Fraktion von HaCaT-Zellen, die für 30 min mit c-IgG, mc-PV2-IgG, m-PV2-IgG und PF2-IgG inkubiert wurden. (n = 3) b) Fura-2 Ca²⁺-Konzentrationsmessung in HaCaT-Keratinocyten (n = 3, * p < 0.05). Modifiziert aus Walter et al., 2017 [165].

Genauso wie zuvor wurde die erste Gruppe der IgG-Fractionen auf dem Zellrasen inkubiert, nachdem die Differenzierung der NHEK für 24 h mit $1.8 \mu\text{M Ca}^{2+}$ induziert wurde. Die Ergebnisse bestätigten die vorherigen Versuche in HaCaT-Zellen, indem p38MAPK durch alle IgG-Fractionen, Src durch AK23, m-PV-IgG, at-PV-IgG sowie mc-PV-IgG, und ERK nur durch Antikörperfraktionen mit Dsg1-Antikörpern aktiviert wurde (Abb. 12 a).

Auch die Ca^{2+} -Messungen bestätigten in NHEK die in HaCaT-Zellen gewonnenen Ergebnisse. IgG-Fractionen mit aDsg1-Antikörpern, mc-PV-IgG und PF-IgG, bewirkten nach 40 sek eine signifikanten Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Abb. 12 b).

Zusammenfassend ergeben sich spezifische Aktivierungsmuster der Signalproteine durch die verschiedenen Pemphigus-Phänotypen in sowohl HaCaT als auch NHEK. Durch alle Autoantikörperfraktionen und auch durch AK23 wurde p38MAPK aktiviert. Zusätzlich führten IgG-Fractionen mit aDsg3-Antikörpern zu Src-Aktivierung, während Fraktionen mit aDsg1-Antikörpern sowohl eine ERK-Aktivierung als auch einen Ca^{2+} -Einstrom induzierten.

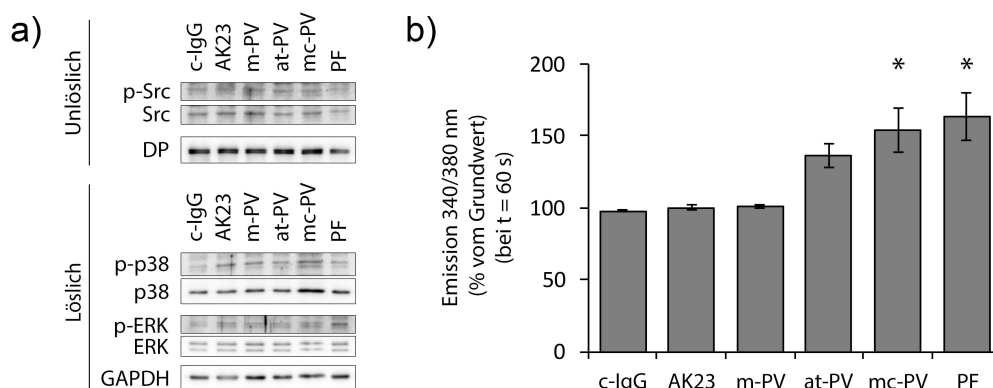


Abbildung 12: *Signalwegsmodulation in primären Keratinozyten*

a) Representative Western Blot-Analyse von NHEK-Zellen, welche mit IgG-Fractionen für 30 min inkubiert wurden ($n = 3$). b) Auswertung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in NHEK-Zellen nach IgG-Inkubation für 40 sek ($n = 3$, * $p < 0.05$). Modifiziert aus Walter et al., 2017 [165].

5.4 Abhängigkeiten zwischen verschiedenen Signalwegen

Zelluläre Signalwege sind in Kaskaden mit verschiedenen Affektor- und Effektorproteinen organisiert. Die Signaltransduktion kann zum einen direkt von einem Signalprotein zum anderen erfolgen, jedoch ist auch eine indirekte Aktivierung reaktiv auf zelluläre Veränderungen möglich. Um Abhängigkeiten zwischen den verschiedenen Signalproteinen mit phänotypischer Aktivierung zu überprüfen, wurden spezifische pharmakologische Mediatoren verwendet, um einzelne Signalwege zu inhibieren und den Effekt auf die Aktivierung anderer Signalwege zu

bestimmen (Tab. 2).

Als Mediatoren wurde für ERK der MEK-Inhibitor UO126, für Src der Src-Familien-Kinase Inhibitor PP2, sowie für EGFR der selektive EGFR-Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib verwendet. Außerdem wurde mithilfe von Bisindolylmaleimide-X hydrochlorid (Bim-X) die PKC-Signaltransduktion verhindert und durch BAPTA-AM intrazelluläres Ca^{2+} cheliiert. Vor Applikation der verschiedenen IgG-Fraktionen wurden die jeweiligen Mediatoren entsprechend ihrer Konzentration und Vorinkubationsdauer auf HaCaT-Zellen inkubiert (Tab. 2). Als Kontrollkondition der Mediatoren wurde das Transportmedium (Vehicle) der Mediatoren, DMSO, verwendet. Danach wurden die verschiedenen IgG-Fraktionen für 30 min hinzugegeben, die Lysate mithilfe der Triton-Fraktionierung hergestellt und anschließend mithilfe von Western Blots analysiert.

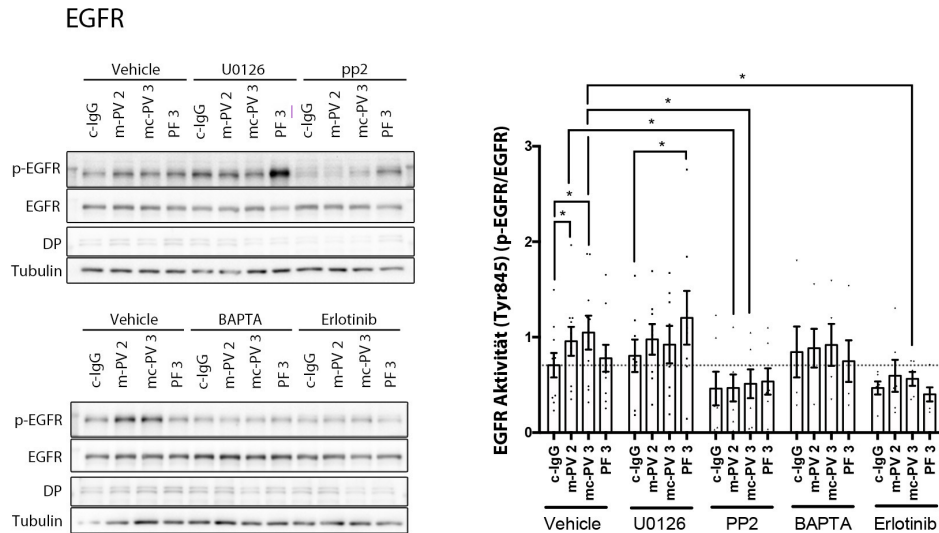


Abbildung 13: EGFR-Aktivierung in Abhängigkeit von U0126, PP2, BAPTA und Erlotinib EGFR-Aktivität nach Inhibition verschiedener Signalwege mithilfe von U0126, PP2, BAPTA und Erlotinib und Inkubation der verschiedenen IgG-Phänotypen für 30 min. (Links) Representative Western Blot-Analyse. (Rechts) Densitometrische Quantifizierung der EGFR-Aktivität. ($n \geq 6$, * $p < 0.05$) Modifiziert aus Walter et al., 2019 [167].

Die EGFR-Aktivierung wurde bereits mehrfach in Abhängigkeit von Src in der Pemphigus-Pathogenese beschrieben. Daher wurde hier zuerst die EGFR-Aktivierung an der Src-abhängigen Tyrosin 845-Phosphorylierungsstelle untersucht (Abb. 13). Unter Kontrollkonditionen führte m-PV 2-IgG und mc-PV 3-IgG zu einer signifikanten Aktivierung von EGFR. Nach Inhibition von Src durch PP2 konnte die basale Aktivität leicht reduziert, aber auch die Aktivierung durch m-PV 2-IgG und mc-PV 3-IgG unterbunden werden. Interessanterweise wurde durch Inhibition von ERK die EGFR-Phosphorylierung durch PF 3-IgG deutlich erhöht, obwohl

der Rezeptor in Kontrollkonditionen nicht aktiviert wurde. Ca^{2+} -Inhibition durch BAPTA veränderte alle EGFR-Aktivierungen, sodass anzunehmen ist, dass die Funktionalität von EGFR durch Ca^{2+} reguliert wird. Zusätzlich wurde die Effektivität von Erlotinib als EGFR-Inhibitor bestätigt, da durch Inkubation die Aktivierung von EGFR durch mc-PV-IgG signifikant reduziert wurde. Zusammenfassend konnte eine Src-abhängige EGFR-Phosphorylierung durch m-PV-IgG sowie mc-PV-IgG Konditionen gezeigt werden. Weiterhin besteht eine etablierte Signalkaskade aus EGFR und ERK, die bereits mit Desmosomen und spezifischer DSG1 assoziiert ist [141]. Daher wurde mit den vorherigen Inhibitoren ERK untersucht. PF 3-IgG und mc-PV 3-IgG induzierten, ähnlich wie zuvor in der Kontrollkondition, eine signifikante Steigerung der ERK-Aktivität. Während ERK nach Inkubation von PF 3-IgG zusammen mit U0126, PP2 oder BAPTA weiterhin aktiviert wurde, reduzierte sich die Aktivität bei mc-PV 3-IgG. Nur die EGFR-Inhibition mithilfe von Erlotinib konnte die PF 3-IgG-induzierte Aktivierung von ERK verhindern, wodurch eine Abhängigkeit der beiden Signalproteine angedeutet wird.

Vorherige Ergebnisse zeigten, dass ERK-Phosphorylierung und Ca^{2+} -Influx ausschließlich nach Behandlung mit Autoantikörperfraktionen detektierbar waren, welche aDsg1-Antikörper enthalten. Da ERK auch über die PKC- und dementsprechend Ca^{2+} -Signaltransduktion moduliert werden kann [112][142], wurde diese Abhängigkeit mithilfe des PKC-Inhibitors Bim-X überprüft. Dazu wurde eine Stunde vor der Zugabe der IgG-Fraktionen der Inhibitor auf dem konfluenten HaCaT-Zellrasen inkubiert. Als Kontrolle zum Mediator wurde ein DMSO-Vehicle in derselben Verdünnung wie der Mediator verwendet. Die Lysate wurden nach Inkubationen ohne Zellfraktionierung mit SDS-Lysepuffer hergestellt und die ERK-Phosphorylierung anschließend mithilfe von Western Blot-Analysen untersucht. Zwar wurde die basale Aktivität nach Inkubation von c-IgG durch Bim-X leicht verringert, jedoch konnte immer noch eine signifikante Aktivierung durch PF-IgG festgestellt werden (Abb. 15). Dementsprechend erscheint die PF-IgG und mc-PV-IgG induzierte ERK-Phosphorylierung unabhängig vom intrazellulären Ca^{2+} -Einstrom und der folgenden PKC-Aktivierung zu sein. Zusätzlich wurde beschrieben, dass Ca^{2+} intrazellulär durch Aktivierung von EGFR freigesetzt werden kann [168]. Daher wurden Fura2-Messungen auf HaCaT-Zellen durchgeführt, nachdem sie für 1 h mit Erlotinib inkubiert worden waren (Abb. 16).

Ähnlich wie zuvor konnte bei Inkubation mit mc-PV 3-IgG und PF 3-IgG eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration gemessen werden. Mit EGFR-Inhibition durch Erlotinib war ebenfalls ein Einstrom bei mc-PV 3-IgG sowie PF 3-IgG auf ein ähnliches Niveau wie unter Kontrollkonditionen detektierbar, wodurch sich keine Abhängigkeit von Ca^{2+} und EGFR abzeichnet.

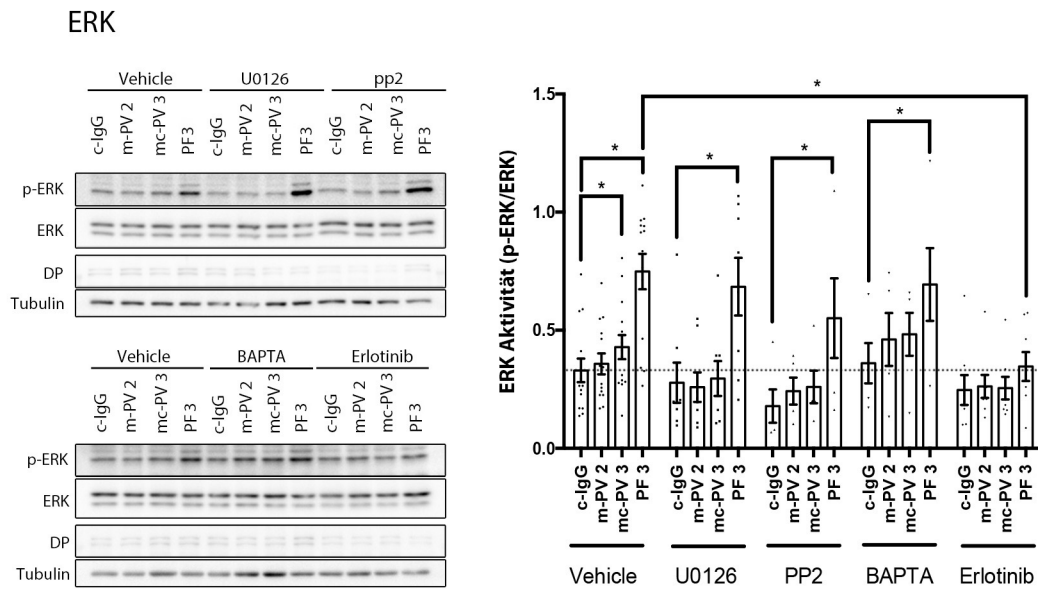


Abbildung 14: ERK-Aktivierung in Abhängigkeit von U0126, PP2, BAPTA und Erlotinib
 Representative Western Blot-Analyse von HaCaT-Zellen inkubiert mit pharmakologischen Inhibitoren und IgG-Fractionen. Die Quantifizierung der ERK-Aktivität ist rechts dargestellt (n ≥ 6, * p < 0.05). Modifiziert aus Walter et al., 2019 [167].

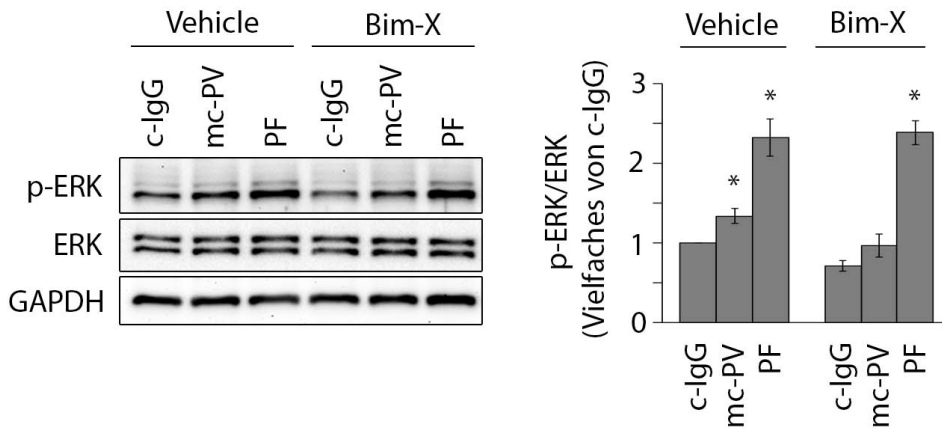


Abbildung 15: ERK-Aktivierung in Abhängigkeit von PKC
 Representative Western Blot-Analyse zur Darstellung der ERK-Phosphorylierung nach PKC-Inhibition mithilfe von Bim-X und folgender Inkubation der IgG-Fractionen für 30 min auf der linken Seite und densitometrische Auswertung der ERK-Phosphorylierung auf der rechten (n = 4, p < 0.05 vs. respektives c-IgG). Modifiziert aus Walter et al., 2017 [165].

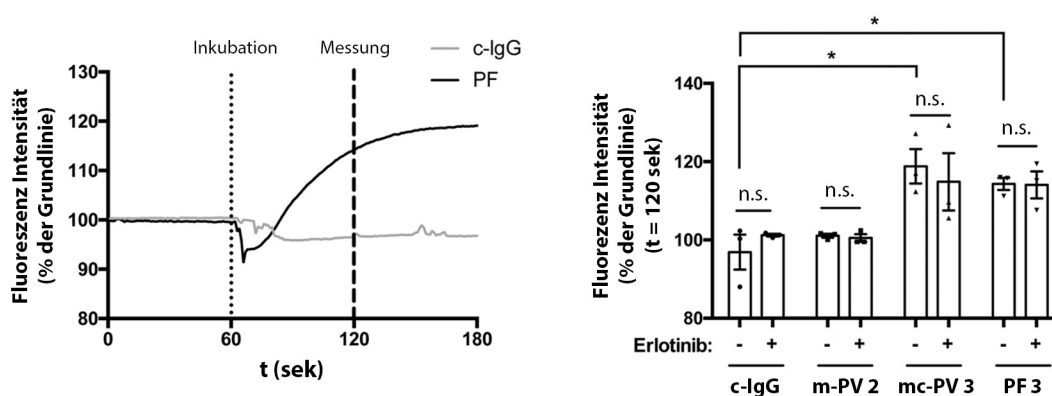


Abbildung 16: Abhängigkeit des Ca^{2+} -Einstroms von EGFR-Aktivierung

Auswertung der Fura2-Messungen zur Bestimmung des Ca^{2+} -Einstroms nach Inhibition von EGFR durch Erlotinib für 1 h. Die respektive IgG-Fraktion wurde nach 60 sek hinzugegeben und die Messung nach 120 sek ausgewertet ($n = 3$, $* p < 0.05$). Modifiziert aus Walter et al., 2019 [167].

5.5 Funktionelle Relevanz der Signalwege für den Adhäsionsverlust

Als nächstes stellte sich die Frage, welche funktionelle Relevanz die verschiedenen Signalwege für die Pemphigus-Pathogenese und spezifischer den Zelladhäsionsverlust haben. *In vivo* wurde bereits gezeigt, dass Inhibition von p38MAPK, PKC oder Tyrosinkinase die Blasenbildung verhindern können [116, 169, 170, 111]. Dabei wurde jedoch weder auf unterschiedliche klinische Phänotypen Rücksicht genommen, noch verschiedene Signalwege gleichzeitig evaluiert.

Die Mediatoren wurden wie zuvor auf dem HaCaT-Zellrasen vorinkubiert, um eine suffiziente Inhibition zum Zeitpunkt der IgG-Zugabe zu gewährleisten. Nach Präinkubation des p38MAPK-Inhibitors SB202190 und des PKC-Inhibitors Bim-X wurden die IgG-Fraktionen für 24 h inkubiert. Anschließend wurden Dispase-assoziierte Dissoziationsversuche durchgeführt, um die Zelladhäsion zu bestimmen.

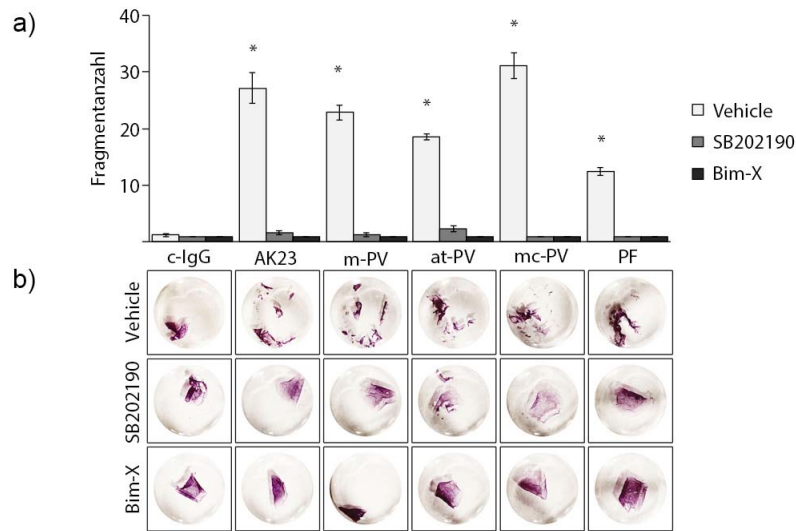


Abbildung 17: Funktioneller Beitrag der p38MAPK- und PKC-Aktivierung zum Autoantikörper-vermittelten Zelladhäsionsverlust

a) Dispase-Dissoziationsversuche nach IgG-Inkubation für 24 h mit Präinkubation des p38MAPK-Inhibitors SB202190 und des PKC-Inhibitors Bim-X für 1h (n = 4, * p < 0.05 vs. das jeweilige c-IgG). b) Representative Fotos der Konditionen. Modifiziert aus Walter et al., 2017 [165].

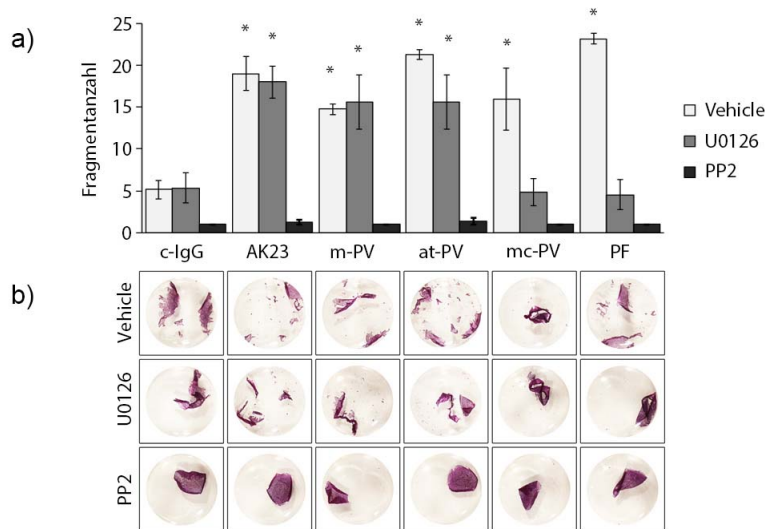


Abbildung 18: Funktioneller Beitrag der ERK- und Src-Aktivierung zum Autoantikörper-vermittelten Zelladhäsionsverlust

a) Dispase Assay nach IgG-Inkubation für 2 h mit Preinkubation des ERK-Inhibitors U0126 und des Src-Inhibitors PP2. (n = 4, * p < 0.05 vs. das jeweilige c-IgG). b) Representative Fotos der Konditionen. Modifiziert aus Walter et al., 2017 [165].

Alle Pemphigus-IgG-Fraktionen zeigten eine signifikante Fragmentierung des Zellrasens. Parallel konnte durch Inhibition von p38MAPK und PKC der IgG-vermittelte Zelladhäsionsverlust vollständig verhindert werden, sodass nach Applikation von mechanischem Scherstress der Zellrasen intakt verblieb (Abb. 17). Inhibition der ERK-Aktivität durch UO126 für 24 h zeigte toxische Effekte auf die Keratinozyten. Ebenso zeigte die Src-Inhibition durch PP2 nach 24 h keinen Effekt. Deswegen wurden die IgG-Fraktionen bei diesen beiden Inhibitoren jeweils nur für 2 h inkubiert. Selbst in diesem kurzen Zeitraum zeigten alle pathogenen IgG-Fraktionen sowie AK23 im Vergleich zu c-IgG einen Adhäsionsverlust. Interessanterweise wurde nur bei den aDsg1-Antikörper-enthaltenden IgG-Fraktionen des mc-PV- und PF-Patienten der Adhäsionsverlust durch ERK-Inhibition verhindert, also spezifisch unter Konditionen, in denen ERK durch die Autoantikörper aktiviert wurde. Auf der anderen Seite war PP2 unter allen Bedingungen protektiv und erhöhte sogar leicht die basale Zelladhäsion nach c-IgG Inkubation, jedoch ohne statistische Signifikanz (Abb. 18).

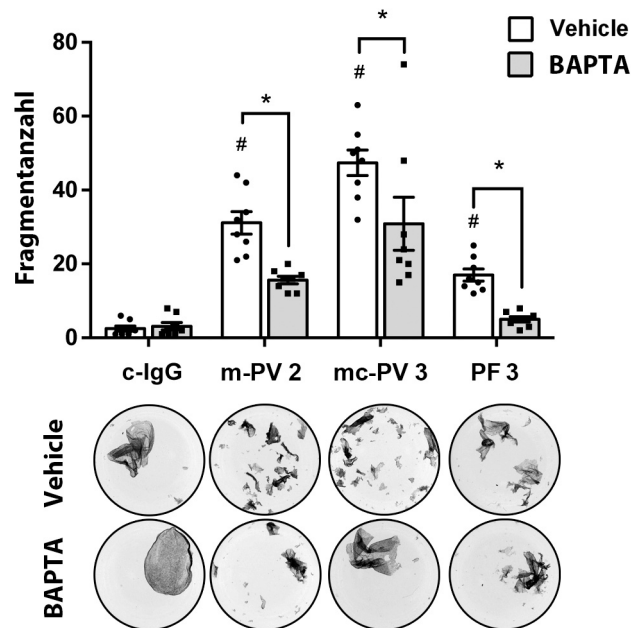


Abbildung 19: Funktioneller Beitrag des Ca^{2+} -Einstroms zum Zelladhäsionsverlust

Dispase-Dissoziationsversuche von HaCaT-Zellen inkubiert mit BAPTA für 4 h mit anschließender Applikation der IgG-Fraktionen für 2 h ($n = 6$, * $p < 0.05$, # $p < 0.05$ vs. Vehicle c-IgG). Modifiziert aus Walter et al., 2019 [167].

Mithilfe von BAPTA wurde erneut intrazelluläres Ca^{2+} cheliiert, um den Einfluss des Signals auf den IgG-vermittelten Zelladhäsionsverlust in Dissoziationsversuchen zu messen (Abb. 19). Dazu wurde nach Vorinkubation des Mediators für 4 h die IgG-Fraktion für 2 h hinzugegeben. Auch durch m-PV 2-IgG, mc-PV 3-IgG und PF 3-IgG erhöhte sich die Anzahl der Zellfragmente signifikant unter Kontrollkonditionen. Durch BAPTA konnte die Fragmentierung des Zellverbundes jeweils um ungefähr 50 % verringert werden. Unabhängig vom Ca^{2+} -Influx wurde die Zelladhäsion resistenter gegenüber des IgG-vermittelten Zelladhäsionsverlust, da auch bei Inkubation von m-PV 2-IgG weniger Fragmente beobachtet wurden, obwohl kein Ca^{2+} -Einstrom durch die IgG-Fraktion induziert wurde.

Zusätzlich wurde dasselbe Experiment mit Erlotinib durchgeführt, um die funktionelle Relevanz der EGFR-Signaltransduktion zu evaluieren. Nach Inkubation mit Erlotinib für 1 h wurde für 2 h die jeweilige IgG-Fraktion hinzugefügt. Erneut konnte durch alle pathogenen IgG-Fractionen ein signifikanter Anstieg der Zellverbundfragmente beobachtet werden. Durch EGFR-Inhibition reduzierte sich die Fragmentierung des Zellrasens nach Inkubation mit m-PV 2-IgG und mc-PV 3-IgG und dementsprechend nur unter Konditionen, in denen EGFR durch die IgG-Fraktion aktiviert wurde (Abb. 20).

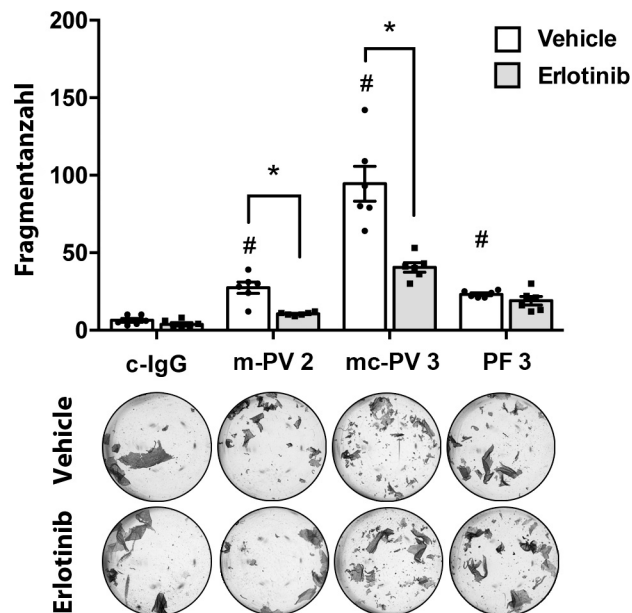


Abbildung 20: Funktionelle Relevanz der EGFR-Aktivierung beim Zelladhäsionsverlust
Dissoziationsversuch nach EGFR-Inhibition für 2 h mit Erlotinib und folgender IgG-Inkubation für 2 h. (n = 5, * p < 0.05, # p < 0.05 vs. Vehicle c-IgG) Modifiziert aus Walter et al., 2019 [167].

5.6 Signalmodulationen in Dsg2- und Dsg3-Knockout-Zelllinien

Alle vorherigen Ergebnisse stellen nur korrelative Verbindungen der aktivierten Signalwege zu den Isoformen Dsg1 und Dsg3 anhand der Autoantikörperprofile dar. Um Aussagen zur autoantikörperspezifischen Signalaktivierung zu treffen, wurden Desmoglein-Knockout-Zelllinien mithilfe von CRISPR/Cas9 generiert. Dazu wurden Plasmide mit jeweils zwei Zielsequenzen für Desmoglein 1, 2 und 3 ausgewählt und separat in HaCaT-Keratinozyten transfiziert. Nach Einzelzellklonierung wurde die Gensequenzen der Zellklone mithilfe einer Sanger-Sequenzierung bestimmt und anschließend analysiert.

Zum einen resultierte die Einzelzellklonierung in einem Dsg3-Zellklon (Δ Dsg3) mit zwei unterschiedlichen Deletionen in Exon 5 von Dsg3, welche in einem Allel 34 Basenpaare (bp) und im anderen Allel 2 bp umfasste; zum anderen zeigte ein Dsg2-Zellklon (Δ Dsg2) eine homologe Deletion von 4 bp im Exon 5 von Dsg2. Alle Mutationen erzeugten in allen Allelen einen Leserasterschub und folglich Genknockout (Abb. 21). Leider zeigten alle lebensfähigen Dsg1-Zellklone eine Wildtypgensequenz im Bereich der gRNA, sodass kein Dsg1-Knockout-Klon generiert werden konnte. Unpublizierte Ergebnisse von unserer und anderen Arbeitsgruppen (Kathleen Green, Chicago, Persönliche Kommunikation) legen nahe, dass ein Proteinverlust von Dsg1 in Keratinozyten nie lebensfähig ist. Als nächstes wurde der Knockout auf Proteinebene mit Immunfärbungen (Abb. 22) sowie Western Blot-Analysen (Abb. 23) bestätigt und gleichzeitig die Proteinexpression desmosomaler Proteine charakterisiert. Durch Immunfärbungen wurde eine lineare membranständige Dsg3-Färbung in WT- sowie Δ Dsg2-Zellen sichtbar, während in Δ Dsg3-Zellen kein spezifisches Dsg3-Signal detektiert werden konnte, wodurch der Proteinverlust von Dsg3 in Δ Dsg3-Zellen bestätigt wurde.

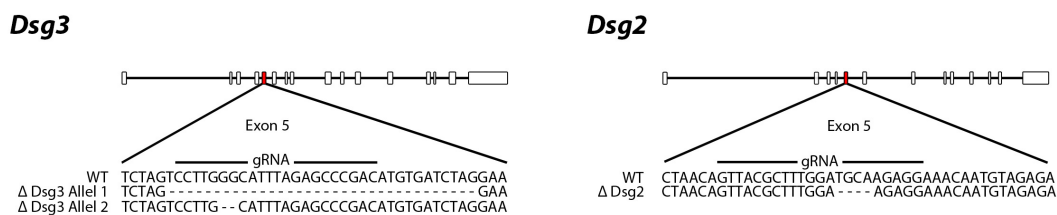


Abbildung 21: Genanalyse der WT-, Dsg3- und Dsg2-Knockout-Zellenlinien

Sanger-Sequenzierung und Analyse genomischer DNA der verschiedenen Zellklone mit schematischer Darstellung der Intron- und Exonstruktur von Dsg2 und Dsg3 sowie der gRNA-Lokalisation und der Cas9-induzierten Deletion. Modifiziert aus Walter et al., 2019 [167].

Auch Dsg2 zeigte eine membranständige, aber eher punktuelle Färbung in WT-Zellen, die in Δ Dsg3-Zellen mit einer vergleichbaren Lokalisation, aber einem stärkerem Signal auftrat. Der Proteinverlust von Dsg2 wurde in Δ Dsg2-Zellen bestätigt, in denen kein spezifisches Dsg2-Signal detektiert werden konnte. PG, DP sowie E-Cad zeigte vergleichbare Membranfärbungen mit ähnlichen Signalstärken in allen Zelllinien.

In Western Blot-Analysen konnte ebenfalls durch vollständige Abwesenheit der jeweiligen Proteine der Knockout von Dsg3 und Dsg2 bestätigt werden (Abb. 23). Interessanterweise wurde ein signifikanter Anstieg von Dsg2 in Δ Dsg3-Zellen und *vice versa* ein signifikanter Anstieg von Dsg3 in Δ Dsg2-Zellen detektiert, wodurch eine Kompensation durch die jeweils andere Isoform angedeutet wird. Dsg1-Proteinmengen, ebenso wie PG, Dsc3 und E-Cadherin, waren in allen Zelllinien unverändert.

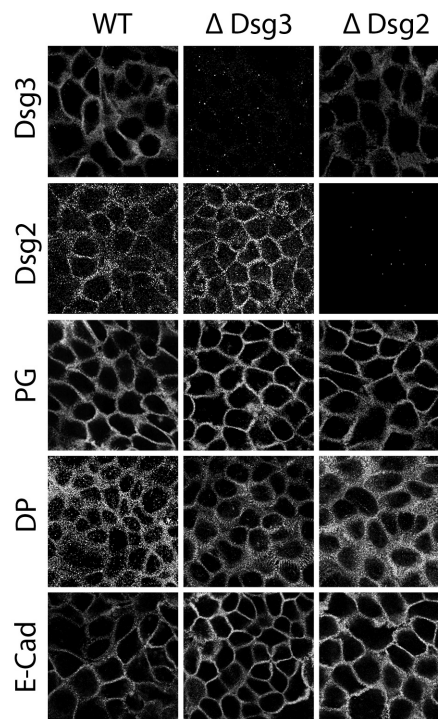


Abbildung 22: Immunfärbung zur Charakterisierung der Δ Dsg3- und Δ Dsg2-Knockout-Zellklone

Representative Aufnahmen von Dsg3-, Dsg2-, PG-, DP- sowie E-Cad-Immunfärbungen zur Bestätigung der Deletion der jeweiligen Dsg-Isoformen und Charakterisierung von Lokalisationsveränderungen der Desmosom-assoziierten Proteine. (n=4) Modifiziert aus Walter et al., 2019 [167].

Dissoziations-Experimente mit den verschiedenen Zellklonen zeigen basal einen signifikanten Anstieg der Zellfragmente in Δ Dsg3-Zellen und dementsprechend einen Adhäsionsverlust. In Δ Dsg2-Zellen hingegen wurde basal keine Veränderung der Adhäsion detektiert (Abb. 24 a). Dadurch wird die unterschiedliche Bedeutung der desmosomalen Cadherine für die Zelladhäsion von Keratinozyten verdeutlicht.

Als nächstes wurden die IgG-Fractionen der unterschiedlichen Patienten auf den Knockout-Zelllinien appliziert, für 24 h inkubiert und erneut mithilfe von Dissoziationsversuchen die Veränderungen der Zelladhäsion bestimmt. In WT-Zellen wurde die Fragmentanzahl durch m-PV 2-IgG, mc-PV 3-IgG sowie PF 3-IgG signifikant erhöht. In Δ Dsg3-Zellen konnte jedoch nur noch PF 3-IgG eine signifikante Erhöhung der Zellfragmente bewirken, wohingegen durch m-PV 2-IgG- sowie mc-PV 3-IgG-Inkubation der Adhäsionsverlust vollständig durch Abwesenheit von Dsg3 verhindert wurde. Dadurch wird die Pathogenität und Bedeutung der aDsg3-Antikörper für beide PV-Subtypen untermalt. Auf der anderen Seite reagieren Δ Dsg2-Zellen sensibler auf mc-PV3-IgG; sichtbar durch die signifikant erhöhte Zellverbundfragmentierung im Vergleich zu WT-Zellen mit mc-PV 3-IgG. Diese Ergebnisse bestätigen, dass Dsg2 eine Kompensationsfunktion bei Dsg3-Verlust einnehmen kann [171, 172].

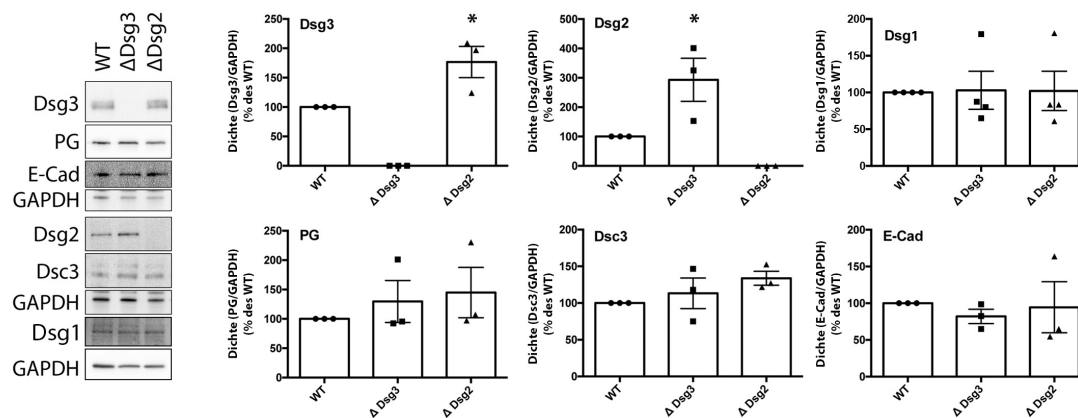


Abbildung 23: Western Blot-Analyse zur Charakterisierung der Δ Dsg3- und Δ Dsg2-Zellklone. Charakterisierung der Proteinmengen von Dsg3, Dsg2, Dsg1, PG, Dsc3 sowie E-Cad in den verschiedenen Zelllinien. Representative Western Blot-Aufnahmen mit densitometrischer Quantifizierung der Proteinmengen (n = 3-4, * p < 0.05) Modifiziert aus Walter et al., 2019 [167].

Zuletzt wurden die Autoantikörper-assoziierten Signalwege in den verschiedenen Knockout-Zellen untersucht. Dazu wurde derselbe Versuchsaufbau wie zuvor mit IgG-Inkubationen für 30 min verwendet. Nach Zellyse mithilfe von Triton-Fraktionierung wurde in Western Blot-Analysen die Phosphorylierung von EGFR, ERK, und p38MAPK evaluiert. Leider konnten für p38MAPK sowie EGFR keine eindeutigen Ergebnisse aufgrund von sehr starken Schwankungen in den Knockout-Zellen erzielt werden. Die Ergebnisse sind aus diesem Grund hier nicht aufgeführt. ERK-Phosphorylierung hingegen zeigte in WT-Zellen die übliche leichte Aktivierung durch mc-PV 3-IgG und starke Aktivierung durch PF 3-IgG. In beiden Knockout-Zelllinien persistierte die Aktivierung durch PF 3-IgG, während sie sich bei mc-PV 3-IgG erhöht, aber statistisch nicht signifikant darstellte (Abb. 25). Zusätzlich wurde auch die Ca^{2+} -Konzentration in den Knockout-Zelllinien während PF-Inkubation evaluiert. Ähnlich wie zuvor war der IgG-abhängige Ca^{2+} -Einstrom auch weiterhin in ΔDsg2 - und ΔDsg3 -Zellen vorhanden (Abb. 26). Insgesamt erscheinen die beiden Signalwege ERK und Ca^{2+} unabhängig von Dsg2 oder Dsg3 zu sein und können dementsprechend durch aDsg1-Antikörper ausgelöst werden.

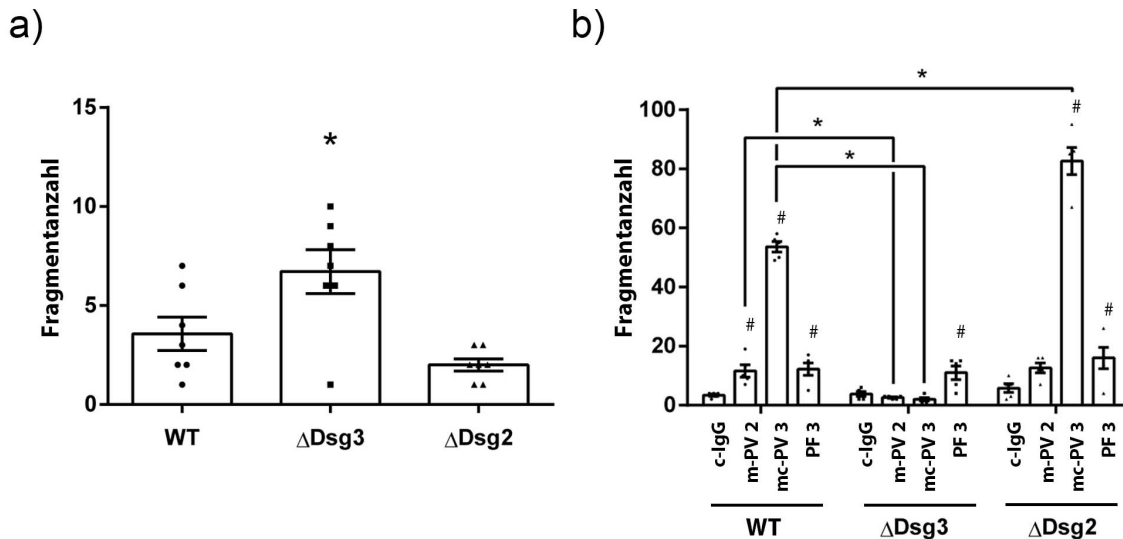


Abbildung 24: Zelladhäsionsveränderungen in ΔDsg3 - und ΔDsg2 -Zellen

a) Basale Zelladhäsion der verschiedenen Zelllinien in Dissoziationsversuchen ($n = 7$, $* p < 0.05$ vs WT). b) Zelladhäsionsverlust in ΔDsg3 - und ΔDsg2 -Zellen nach Inkubation mit verschiedenen IgG-Fractionen für 24 h ($n = 5$, $* p < 0.05$ vs respektiver WT, $\# p < 0.05$ vs respektives c-IgG). Modifiziert aus Walter et al., 2019 [167].

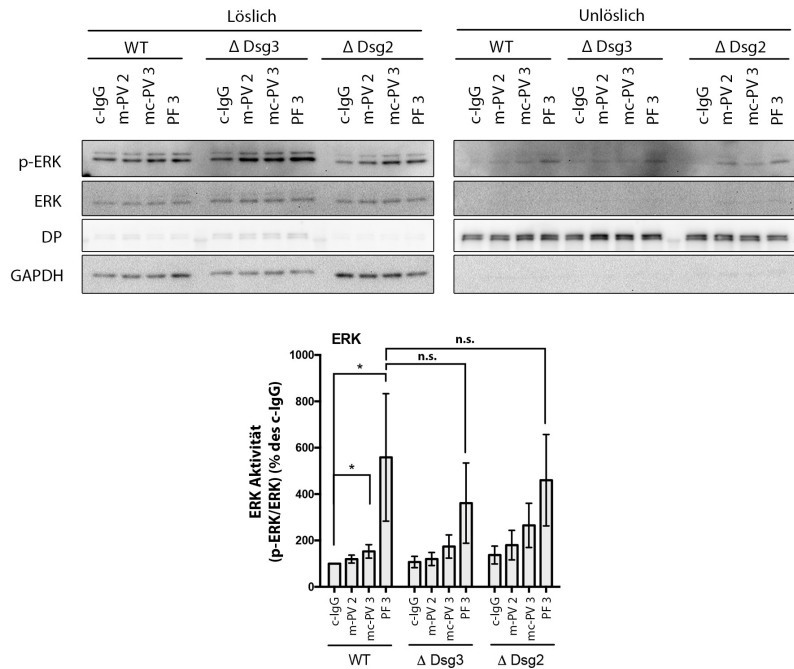


Abbildung 25: *ERK-Aktivität in Dsg-Knockout-Zellen nach IgG-Inkubationen*

Representative Western Blot-Analyse einer Triton-Fraktionierung von HaCaT-WT und -Dsg-Knockout-Zellen nach Inkubation von c-IgG, m-PV 2-IgG, mc-PV 3-IgG sowie PF 3-IgG für 30 min. Dazugehörige densitometrische Analyse der ERK-Aktivität ($n = 9$, $*p < 0.05$). Modifiziert aus Walter et al., 2019 [167].

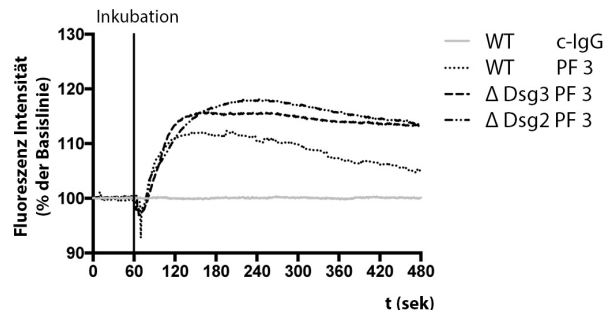


Abbildung 26: *PF-induzierter Ca²⁺-Einstrom in Dsg-Knockout-Zellen*

Representative Fura2-Messung in HaCaT-WT- und -Dsg-Knockout-Zellen mit Inkubation von entweder c-IgG oder PF 3-IgG nach 60 sek ($n = 3$). Modifiziert aus Walter et al., 2019 [167].

5.7 Direkte Inhibition homophiler Interaktionen

Es ist bereits bekannt, dass Pemphigus-IgGs die homophilen Interaktionen von Dsg3 nicht aber von Dsg1 inhibieren können [99]. Dabei ist aber immer noch umstritten, ob Signalaktivierungen durch Pemphigus-Autoantikörper als sekundäre Effekte entstehen oder auch ohne direkte Inhibition primär ausgelöst werden können. Zusätzlich sollte hier untersucht werden, ob über Unterschiede in der direkten Inhibition der atypische Phänotyp begründet werden kann.

Daher wurde die inhibitorische Wirkung der Antikörperfraktionen auf homophile DSG3-Interaktionen in zellfreien AFM-Versuchen untersucht (Abb. 27). Dazu wurde zuerst die Bindungswahrscheinlichkeit der beschichteten Glimmer-Tip-Kombination bestimmt und anschließend für 1 h die respektive IgG-Fraktion auf dem Glimmer inkubiert. Danach wurden die Bindungsergebnisse erneut gemessen und nach der Auswertung die Reduktion der Bindungsanzahl ermittelt. Für Dsg3- sowie Dsg1-beschichtete Kombinationen wurde der Versuch separat durchgeführt. Wie zu erwarten, konnte c-IgG die Bindungsanzahl nicht reduzieren, nach Inkubation von allen IgG-Fraktionen mit aDsg3-Antikörpern verringerte sich die homophile Bindungsanzahl der Dsg3-Proteine signifikant. Der kommerziell erhältliche aDsg1-Mausantikörper p124 wurde als monoklonale Kontrolle für die direkte Inhibition der homophilen Dsg1-Interaktionen verwendet.

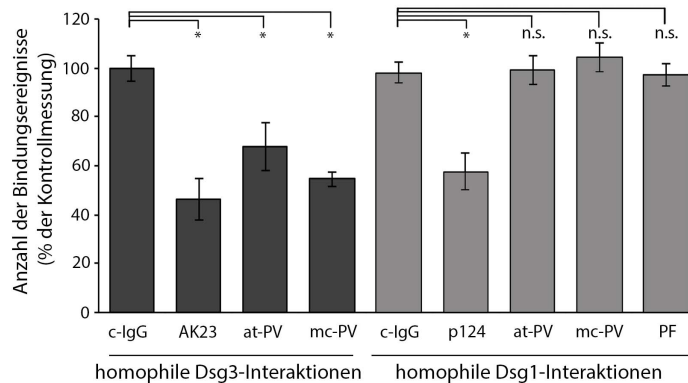


Abbildung 27: *IgG-vermittelte direkte Inhibition homophiler Dsg-Interaktionen*

Zellfreie AFM-Messungen der homophilen Dsg-Interaktionen auf beschichteten Glimmern mit Dsg1- oder Dsg3- funktionalisierten Messspitzen. Nach einer initialen Kontrollmessung wurde die jeweilige IgG-Fraktion für 1 h inkubiert und die Messung wiederholt. Die Anzahl der Bindungsergebnisse ist jeweils der Quotient aus beiden Messungen ($n = 3 - 5$, * $p < 0.05$ vs. c-IgG). Modifiziert aus Walter et al., 2019 [167].

Interessanterweise konnte p124 die Bindungsanzahl reduzieren, während Patientenantikörper mit aDsg1-Antikörpern keine Reduktion der Bindungsanzahl vermittelten. Die IgG-Fraktion des Patienten mit atypischem Phänotyp konnte die homophilen Dsg3-, jedoch ebenfalls nicht die homophilen Dsg1-Interaktionen hemmen.

Dadurch wird angedeutet, dass aDsg3-Antikörper zu direkter Inhibition und parallel p38MAPK- und Src-Aktivierung führen, während aDsg1-Antikörper die p38MAPK- und ERK-Aktivierung und den Ca^{2+} -Einstrom ohne direkte Inhibition der homophilen Dsg1-Bindungen induzieren können.

Kapitel 6

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal die Aktivierung verschiedener Signalwege durch verschiedene Pemphigus-Phänotypen unter gleichbleibenden Bedingungen evaluiert. Neben den Pathomechanismen der Zytokeratinretraktion und Desmoglein-Depletion durch alle verschiedenen IgG-Fraktionen konnte festgestellt werden, dass unterschiedliche Signalwege durch IgG-Fraktionen von Patienten mit mukosalem, mukokutanem und atypischem Pemphigus vulgaris sowie Pemphigus foliaceus aktiviert werden. Spezifischer wurde eine Aktivierung von ERK und ein Anstieg von intrazellulärem Ca^{2+} durch mc-PV-IgG und PF-IgG induziert, während eine Aktivierung von Src durch AK23, m-PV-IgG, at-PV-IgG und mc-PV-IgG ausgelöst wurde. Eine Aktivierung von p38MAPK wurde nach Inkubation mit allen pathogenen Autoantikörperfraktionen beobachtet. Damit wurde erstmals eine Korrelation zwischen dem Autoantikörperprofil und damit dem klinischen Phänotyp einerseits und dem Muster der aktivierten Signalwege andererseits aufgezeigt. Durch Knockout von Dsg3 konnte die Bedeutung der Dsg3-abhängigen Signalwege für den Adhäsionsverlust, aber auch die Unabhängigkeit der Aktivierung von ERK und des Ca^{2+} -Einstroms untermauert werden. Die Aktivierung von EGFR zeigte eine Abhängigkeit von Src, während ERK in Abhängigkeit von EGFR, jedoch unabhängig von Src aktiviert wurde. Für die weiteren Signalaktivierungen konnten Verbindungen nicht sicher bestimmt werden. Zusätzlich wurde beobachtet, dass die verschiedenen Signalaktivierungen von unterschiedlicher Relevanz für den IgG-vermittelten Adhäsionsverlust waren. ERK- und EGFR-Inhibition reduzierten nur den Haftungsverlust bei IgG-Fraktionen, bei denen auch derselbe Signalweg aktiviert wurde, während Inhibition von p38MAPK, Src, PKC und des Ca^{2+} -Einstroms bei allen Autoantikörper-Fraktionen unabhängig vom Aktivierungszustand des jeweiligen Signalproteins den IgG-vermittelten Haftungsverlust reduzierte. Dies ist ein Hinweis darauf, dass der normale Umsatz der Desmosomen auch unabhängig von Pemphigus-IgG durch Ca^{2+} , PKC, Src und möglicherweise auch durch p38MAPK reguliert wird.

6.1 Autoantikörper-spezifische Signalwege bei Pemphigus

In verschiedenen Studien wurde bereits die Aktivierung einzelner Signalwege nach Inkubation mit Pemphigus-IgG beschrieben. Dabei wurde oftmals mc-PV-IgG mit aDsg3- sowie aDsg1 repräsentativ für alle verschiedenen Phänotypen verwendet, um das gesamte Spektrum der Pemphigus-erkrankungen abzudecken [116, 120, 121, 127, 105, 137, 169]. Seltener wurde zwischen m-PV-IgG, mc-PV-IgG und PF-IgG differenziert oder wurden monoklonale Antikörper verwendet [173, 120, 117, 129]. In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal die Modulation der Signalwege durch Autoantikörper von Patienten mit unterschiedlichen klinischen Phänotypen dargestellt werden. Die untersuchten Signalaktivierungen sind komplex, können jedoch mit mehreren IgG-Fraktionen in der epidermalen Zelllinie HaCaT sowie in NHEKs einem jeweiligen spezifischen Muster zugeordnet werden (Abb. 28). Da die verschiedenen Phänotypen mit Antikörperprofilen assoziiert sind, können dadurch Rückschlüsse auf spezifische Autoantikörper und dazugehörige desmosomale Cadherine als Signalrezeptoren gezogen werden.

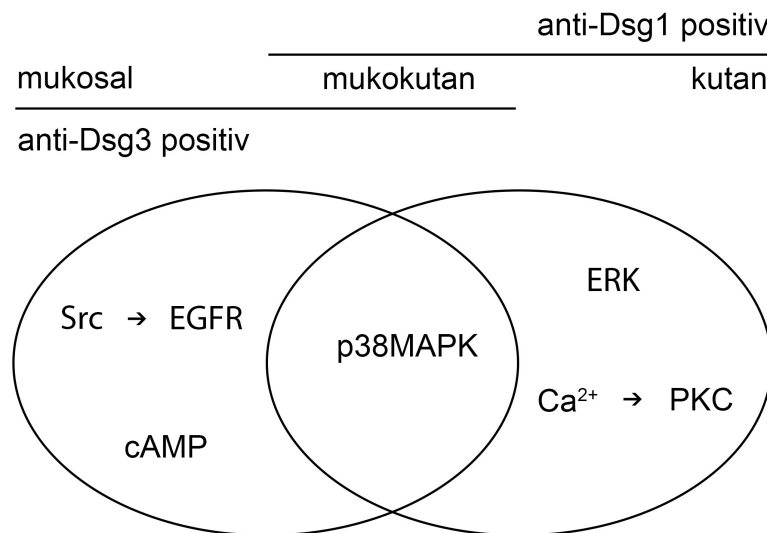


Abbildung 28: Schematische Zusammenfassung der Signalmuster

Alle Autoantikörper-Fraktionen aktivierten p38MAPK. Auf der einen Seite wurde Src, EGFR sowie cAMP durch m-PV-IgG aktiviert, während auf der anderen Seite ERK und Ca²⁺ von PF-IgG aktiviert wurden. Alle Signalproteine wurden durch Autoantikörper von mc-PV-Patienten induziert. Modifiziert aus Walter et al., 2017 [165].

6.1.1 p38MAPK-Aktivierung

Alle IgG-Fractionen der verschiedenen Phänotypen führten zu einer Aktivierung von p38-MAPK. Dies stimmt mit vorherigen Studien überein, die ebenfalls für mc-PV-IgG, PF-IgG und für den monoklonalen aDsg3-Antikörper AK23 eine Aktivierung von p38MAPK beobachtet haben [115, 116, 78, 119]. Alle anderen Signalwege wurden nur bei spezifischen Phänotypen ausgelöst. Daher nimmt p38MAPK eine besondere Rolle in der Pemphigus-Pathogenese und in der Zelladhäsion ein (Abb. 28, 29). Inzwischen wurde ein Proteinkomplex aus Dsg3, PG und p38MAPK als Pemphigus-assoziiertes Rezeptor identifiziert, der eine Signalaktivierung über aDsg3-Antikörper ermöglicht [174]. Kürzlich wurde ein entsprechender Rezeptorkomplex auch für Dsg1 nachgewiesen [175]. Interessanterweise ist in Enterozyten, die kein Dsg3 exprimieren, p38MAPK durch Dsg2 reguliert, wobei beide Proteine nicht als Signalkomplex vorzuliegen scheinen [176]. In Keratinozyten spielt Dsg2 eine untergeordnete Rolle in der Vermittlung von Adhäsion und ist nicht an der Regulation von p38MAPK beteiligt [171], sodass die Assoziation des Signalmoleküls zelltyp- und proteinabhängig zum primären adhäsions-vermittelnden Desmocadherin erscheint. Obwohl unter allen Konditionen p38MAPK aktiviert wurde, führen IgG-Fractionen von m-PV-IgG und AK23 klinisch nicht zur Spaltbildung in der Epidermis und PF-IgG nicht in der Mukosa [51]. Auch der Verlust von PG, aber nicht DP, führt zu einer Aktivierung von p38MAPK [177], was andeutet, dass PG ein Teil der Signalkaskade ist und dass diese auch unabhängig von DP und Dsg3 außerhalb von Desmosomen funktioniert. Da neben Autoantikörpern auch gegen die adhäsive Domäne gerichtete Peptide und die Aminosäure Tryptophan, die für die Adhäsion von Zellen unabdinglich ist, p38MAPK modulieren [174], ergibt sich das Bild, dass p38MAPK von Autoantikörpern gegen Dsg1 und Dsg3 ohne sterische Behinderung und damit wohl auch konformationelle allosterische Modulation der desmosomalen Cadherine reguliert.

6.1.2 Intrazellulärer Ca^{2+} -Einstrom

Antikörperfraktionen mit aDsg1-Antikörpern (mc-PV-IgG und PF-IgG) führten zu einem rapiden Ca^{2+} -Einstrom. Zum Zeitpunkt, als der Signalweg mit der Pemphigus-Pathogenese in Verbindung gebracht wurde [105], waren erst kürzlich die Pemphigus-Antigene als Dsg1 und Dsg3 identifiziert worden [56] und es wurde nur mithilfe von unspezifischen Immunoblots auf verschiedene Antikörper eingegangen. Trotzdem konnte dort eine Signalaktivierung für sieben von acht PV-IgGs sowie alle PF-IgGs aufgezeigt werden, während c-IgG-Fractionen oder IgGs von Patienten mit bullösem Pemphigoid zu keiner Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führten. Auf Unterschiede im klinischen Phänotyp der PV-Patienten wurde nicht spezifischer eingegangen und in weiterführenden Studien wurde ebenfalls nicht zwischen aDsg1- und aDsg3-Antikörpern differenziert [106, 107]. Auszuschließen sind aDsg3-Antikörper als Auslöser des Ca^{2+} -Einstroms, da AK23 als monoklonaler aDsg3-Antikörper

sowie m-PV-IgG keine Signaltransduktion induzierten und in Dsg3-defizienten Keratinozyten der Ca^{2+} -Einstrom persistierte.

Kürzlich konnte aufgrund dieser Hypothese ein Signalkomplex und möglicher Aktivierungsmechanismus über Dsg1 definiert werden. Phosphatidylinositol 4-kinase (PI4K), ein bekannter Bestandteil des Signalweges, wurde durch Affinitätspurifikations-Massenspektrometrie im Interaktom von Dsg1 identifiziert [178] (<https://bioplex.hms.harvard.edu>). Diese Interaktion konnte in Keratinozyten mithilfe von Immunprecipitationen bestätigt werden [175]. Zusätzlich wurde das Zielprotein $\text{PLC}\gamma$ durch Inkubation mit PF-IgG und mc-PV-IgG phosphoryliert, obwohl es sowohl mit Dsg1 als auch Dsg3 interagiert. Dementsprechend wird nach aDsg1-Bindung PI4K sowie $\text{PLC}\gamma$ aktiviert und IP_3 ausgeschüttet. Dadurch wird über IP_3 und Crac-Kanäle ein biphasischer Ca^{2+} -Einstrom in das Zytoplasma induziert, der letztlich über PKC die Keratinverankerung moduliert [175]. ERK wurde ebenfalls durch mc-PV-IgG und PF-IgG aktiviert und ist als PKC-Zielmolekül beschrieben worden [179]. Diese Abhängigkeit konnte jedoch ausgeschlossen werden, da weder Ca^{2+} -Chelation noch PKC-Inhibition die ERK-Phosphorylierung verhinderten.

6.1.3 Die Src/EGFR-Aktivierung

Src- und EGFR-Aktivierung wurde hier durch IgG-Fractionen mit aDsg3 ausgelöst, jedoch nicht durch PF-IgG mit aDsg1-Antikörpern (Abb. 28). Auch AK23 als monoklonaler Antikörper induzierte eine Src-Aktivierung, was in weiteren Studien bestätigt werden konnte [129, 120]. Dadurch ist eine aDsg3-Antikörper-assoziierte Aktivierung naheliegend. In den meisten anderen Publikationen wurde bisher ausschließlich mc-PV-IgG verwendet, wodurch dort nicht zwischen spezifischen Antikörpern unterschieden werden konnte [169, 118, 78, 25]. Weitere Ergebnisse verdeutlichen jedoch die Beziehung von Src zu Dsg3 und entsprechend die aDsg3-Antikörper-vermittelte Signalaktivierung. Über- und Unterexpression von Dsg3 konnte die Aktivität von Src modulieren und die Aktivität wurde suprabasal der Blase in oraler Mukosa von Pemphiguspatienten in Bereichen ohne Dsg3-Depletion identifiziert [25]. Extradesmosomal existiert ein Proteinkomplex aus Dsg3, E-Cadherin und Src, über welchen Dsg3 die Src-Aktivität reguliert [128, 25]. In diesem Kontext führt PV-IgG zu Src-abhängiger PKP3-Phosphorylierung und Ablösung von Dsg3 [127].

EGFR wurde in Abhängigkeit von Src durch m-PV-IgG und mc-PV-IgG mit aDsg3-Antikörpern aktiviert (Abb. 28, 29). Größtenteils wurde zur Untersuchung von EGFR bisher nur mc-PV-IgG verwendet [120, 180, 137, 169], wobei auch Adhäsionsverlust unabhängig von EGFR-Signaltransduktion gezeigt werden konnte [138]. Die untersuchte Phosphorylierung am Tyrosinrest 845 ist als Src-Ziel bekannt und beide Proteine interagieren direkt miteinander, sodass die Abhängigkeit der Proteine und damit aDsg3 als Auslöser naheliegend ist [118]. EGFR kann jedoch auch über Liganden stimuliert werden, nachdem diese durch Proteasen von der

Zelle abgespalten wurden. ADAM10, eine solche Protease, wird von Keratinozyten bei mc-PV produziert und führt zu einem Anstieg von EGF und Betacellulin, wodurch EGFR aktiviert wird. Dieser Mechanismus zeigte ebenfalls eine Abhängigkeit von Src und Dsg3 und damit zum Antikörperprofil der IgG-Fraktionen [181, 182].

Letztlich wurden auch nicht-desmosomale Antikörper für die Aktivierung von Src und EGFR verantwortlich gemacht, da nach Dsg1- und Dsg3-Knockdown die Aktivierung der Signalproteine durch PV-IgG *in vitro* nur leicht verringert wurde [118]. Eine synergistische Aktivierung zusätzlich zu aDsg3-Antikörpern ist folglich denkbar. Die verantwortlichen nicht-desmosomalen Antikörper konnten jedoch bisher nicht genauer definiert werden [78].

6.1.4 ERK-Aktivierung

Die ERK1/2-Aktivierung spielte bisher eher eine untergeordnete Rolle in Pemphigus-Studien und wurde ausschließlich mit mc-PV-IgG evaluiert [137, 142]. Hier wurde die ERK-Aktivierung durch IgG-Fraktionen mit aDsg1-Antikörpern induziert. Da ERK nicht durch AK23 und m-PV-IgG phosphoryliert wurde und die Aktivierung in Dsg3- und Knockout-Zelllinien persistierte, können aDsg3-Antikörper als Auslöser ausgeschlossen werden.

Eine gemeinsame Rolle in der Differenzierung von Keratinozyten und ein Zusammenhang von ERK und Dsg1 verstärkt die Hypothese, dass aDsg1-Antikörper die Aktivierung auslösen. ERK ist in der Haut antiproportional zur Dsg1-Expression aktiviert und wird über eine Bindung von Erbin an Dsg1 reguliert [141]. Über diesen Komplex wird der EGFR-ERK1/2 Signalweg unterbrochen, sodass ERK inhibiert und Differenzierung gefördert wird. Passend stellte sich die durch PF-IgG ausgelöste ERK-Aktivierung in Abhängigkeit zu EGFR dar, obwohl EGFR selber nicht durch PF-IgG modifiziert wurde. Folglich erscheinen aDsg1-Antikörper durch Auflösung des inhibitorischen ERBIN-Dsg1-Komplex als Auslöser von ERK plausibel [141].

6.2 Signalwege bei atypischem Pemphigus

Die Pathomechanismen atypischer Pemphigusphänotypen mit kutanem Phänotyp ohne aDsg1-Antikörper sind bisher ungeklärt. Durch unsere Analyse wird angedeutet, dass auch bei atypischen Phänotypen die beschriebenen aDsg3-assoziierten Signalmuster sowie typische direkte Inhibition von homophilen Dsg3-Interaktionen besteht. Es konnte, vergleichbar mit anderen aDsg3-Antikörpern, eine p38MAPK- und Src-Aktivierung beobachtet werden. Signalwege der kutanen Pemphigus-Phänotypen wie Ca^{2+} und ERK wurden jedoch nicht aktiviert, obwohl sich die Krankheit bei dem Patienten mit einer suprabasalen Spaltbildung in der Epidermis präsentierte.

Auch der cAMP-Spiegel blieb vergleichbar mit Inkubation von AK23 und PF-IgG unverändert. Eine Erhöhung der cAMP-Konzentration wirkt adhäsionssteigernd und somit protektiv gegen IgG-vermittelten Adhäsionsverlust in epidermalen Keratinozyten [183]. Da mPV-IgG zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration führte, jedoch nicht AK23 und atPV-IgG, sind entweder andere Antikörper oder zumindest nicht alle aDsg3-Antikörper für diese Signalaktivierung verantwortlich. Ursächlich können unter anderem unterschiedliche Bindungsdomänen der Antikörper sein, da unterschiedliche Kombinationen dieser die Pathogenität der polyklonalen IgGs modifizieren können [184]. Weiterhin könnte die Abwesenheit der cAMP-assoziierten protektiven Effekte ohne aDsg1-Antikörper zur Ausprägung des kutanen Phänotyps führen. Da aber AK23 in humaner Haut *ex vivo* nicht für eine Spaltbildung ausreicht [90], liegt nahe, dass noch weitere unbekannte Signalwege durch atPV-IgG ausgelöst werden.

Zusätzlich existieren Antikörper gegen Acetylcholinrezeptoren oder Dsc3, welche für atypische Fälle verantwortlich sein können [185, 186]. In einem Mausmodell mit aDsc3-Antikörpern konnte die Pathogenität dieser IgG's bereits durch Blasenbildung bestätigt werden. Analysen zu assoziierten Mechanismen und Aktivierungen von Signalwegen stehen größtenteils noch aus [187], es wurde jedoch eine Steigerung des Adhäsionsverlust und Src-assoziierten Mechanismen durch polyklonale IgG-Fractionen mit aDsc3-Antikörpern beschrieben [181]. Zusätzlich wurde in kolorektalen Tumorzellen Dsc3 mit den Signalproteinen AKT, p53 sowie p21 in Verbindung gebracht [188], welche auch bei aDsc3-Antikörpern eine Rolle spielen könnten. Auch die Inhibition heterophiler Cadherin-Interaktionen darf in diesem Zusammenhang nicht unerwähnt bleiben [31, 189, 33].

Insgesamt kann der genaue Mechanismus der atypischen PV-IgG zwar hier nicht vollständig den typischen abgegrenzt werden, die Ergebnisse zeigen jedoch, dass auch bei atypischen IgG-Fractionen die Signalwege zum Antikörperprofil passen und diese somit nicht alleine für die phänotypische Ausprägung verantwortlich sind. Zusätzliche Determinanten können dementsprechend den Phänotyp modifizieren. Dadurch lässt sich auch ableiten, dass die Signalmuster nicht bei allen Patienten gleich sein müssen.

6.3 Korrelation direkter Inhibition homophiler Dsg-Bindungen mit Signalwegsaktivierungen

Es zeigte sich, dass alle Autoantikörperfraktionen mit aDsg3-Antikörpern homophile Dsg3-Bindungen reduzieren, jedoch keine homophilen Dsg1-Bindungen durch mc-PV-IgG und PF-IgG mit aDsg1 oder at-PV-IgG beeinflusst werden können, wodurch frühere Ergebnisse bestätigt wurden [190, 191]. Da PF-IgG hier jedoch spezifische Signalaktivierungen und Zelladhäsionsverlust induzierte, wird dadurch eine Rezeptorfunktion von Dsg1 angedeutet, durch die aDsg1 ohne direkte Inhibition homophiler Interaktionen Signalwege aktivieren kann und

anschließend strukturelle desmosomale Reorganisation und Adhäsionsverlust vermittelt wird. Zwar kann PF-IgG zellfrei heterophile Dsg1-Dsc1 sowie Dsg1-Dsc3 Interaktionen inhibieren und dadurch möglicherweise anschließend Signalaktivierung auslösen [189, 33], extrazelluläre Vernetzungen zeigten jedoch *in vitro*, dass prädominant homophile Interaktionen in Epithelzellen vorliegen [192]. Auch auf Zellen *in vitro* konnte PF-IgG keine Dsg1-Bindungen reduzieren, sondern führt zu einer Neuverteilung der Bindungsereignisse von Zell-Zell-Kontakten zur freien Oberfläche [193].

Für die Wirkung von aDsg3-Antikörpern spielen Signalaktivierungen ebenfalls eine große Rolle, da direkte Inhibition durch aDsg3-Antikörper alleine nicht ausreicht, um einen Adhäsionsverlust von Keratinozyten zu induzieren [183, 194]. Damit ist die Bedeutung der direkten Behinderung der Dsg3-Haftung in der Pemphigus-Pathogenese weitgehend unklar.

6.4 Relevanz der Signalwege für Autoantikörper-induzierten Adhäsionsverlust

Die selektive Inhibition der Signalwege zeigte unterschiedliche Effektivität, um den Autoantikörper-vermittelten Zelladhäsionsverlust zu verringern. Während eine Inhibition von p38MAPK, Src und PKC zur fast vollständigen Reduktion des IgG-vermittelten Haftungsverlust führten, wurde durch Chelation des Ca^{2+} -Einstroms unabhängig von verwendeten IgG-Fraktionen die Adhäsion nur um 50% verbessert. Außerdem konnte ERK- und EGFR-Inhibition nur eine Verbesserung der Adhäsion hervorrufen, wenn der jeweilige Signalweg durch die IgG-Fraktionen aktiviert wurde. Zum einen wird dadurch die Rolle der Signalwege in der Pemphigus-Pathogenese hervorgehoben, zum anderen wird angedeutet, dass die Inhibition einiger Signalwege generell Desmosomenstabilität beeinflusst, während andere spezifischer im Rahmen des Antikörper-vermittelten Haftungsverlusts die desmosomale Haftung regulieren.

Der desmosomale Zustand der Hyperadhäsion geht mit verringerter PKC-Aktivität und damit reduzierter DP-Phosphorylierung einher [195]. Damit werden Desmosomen nicht nur Ca^{2+} -insensitiv, sondern im gleichen Zug reduziert sich die Mobilität und erhöht sich die Stabilität der desmosomalen Kernkomponenten durch Oligomerisation und Verschlüsselung der Cadherine an das Zytokeratinnetzwerk [196, 197]. Dies hat letztlich eine Steigerung der Adhäsion zur Folge, wodurch Keratinozyten gleichzeitig auch weniger anfällig gegenüber Antikörper-vermitteltem Adhäsionsverlust werden [198]. Die Inhibition des Ca^{2+} -Einstroms könnte dadurch unabhängig vom Aktivierungszustand den Adhäsionsverlust der Desmosomen reduzieren. Zusätzlich ist Src über Verbindung zu E-Cad und Dsg3 im Desmosomenaufbau beteiligt [128]. Durch Aktivierung wird der Proteinkomplex in das Desmosom verschoben, bevor er über DP verankert wird. Src-Inhibition könnte dadurch den Desmosomenumbau hemmen

und das Desmosom stabilisieren. Dabei ist auch eine Beteiligung von PKP3 nicht auszuschließen [127]. Zusätzlich könnte durch die Stabilisierung der Desmosomen die Inkorporation von aDsg3-Dsg3 Komplexen ins Desmosom verhindert werden. Die Relevanz dieser Ergebnisse und hier definierten Signalmuster wird durch ihre Möglichkeit als Angriffspunkt von pharmakologischen Therapeutika unterstrichen. In einer Studie wurden 141 Inhibitoren mit potentieller klinischer Applikation getestet, aus denen 20 Substanzen positive Effekte auf den IgG-induzierten Adhäsionsverlust *in vitro* und *ex vivo* zeigten. Dazu zählen Wirkstoffe, welche die hier untersuchten Signalwege p38MAPK, EGFR, PI3K und MEK1 als Ziel haben [199]. Die Signalmuster und Ergebnisse zum Zelladhäsionsverlust stellen dadurch spezifische therapeutische Angriffspunkte bei den verschiedenen Pemphigus-Phänotypen dar.

Für p38MAPK wurde bereits ein Inhibitor in einer kleinen klinischen Studie untersucht [180], diese musste jedoch aufgrund von Nebenwirkungen abgebrochen werden. Weiterhin wurde der Phosphodiesterase 4-Inhibitor Apremilast, welcher für die Therapie von Psoriasis zugelassen ist und den Abbau von cAMP verhindert, erfolgreich adjuvant bei einem therapieresistentem Pemphigus-Patienten eingesetzt [200]. Wirkungsmechanismen beinhalten die Verhinderung von Keratinretraktion und Desmosomenseparierung *in vitro* und *ex vivo*, während Bindungsereignisse und Dsg3-Depletion unverändert bleiben [201]. Die durch pharmakologische Signalwegsinhibition induzierte Stabilisierung der Keratinozytenhaftung wird dadurch eine interessante Therapieoption, um adjuvant zur Immunmodulation schneller und mit weniger Nebenwirkungen Symptome zu mildern.

6.5 Validierung der Signalwege in humanen *ex-vivo*-Organmodellen

Letztlich müssen die Signalwege und ihre Bedeutung jedoch noch in komplexeren Modellen validiert werden, da einschichtige epidermale Zellkulturen nicht den komplizierten dreidimensionalen Aufbau der Haut mit der schichtspezifischen Komposition der Zellkontakte, der unterschiedlichen Lokalisation der Spaltbildung und Organspezifität der klinischen Phänotypen simulieren können [202]. Verschiedene Signalwege wurden dazu schon in *ex vivo*-Organkulturen überprüft.

Inhibition von p38MAPK konnte die Reduktion der Desmosomengröße und -anzahl, Insertionsverlust der Keratinfilamente und letztlich die suprabasale Spaltbildung in der Epidermis *ex vivo* verhindern, sodass p38MAPK zentral wichtig für die Vermittlung der typischen strukturellen Veränderungen bei mc-PV-IgG erscheint [90]. Gegenätzlich ist Signalinhibition in der Mukosa *ex vivo* nicht protektiv [5]. Dort reichen p38MAPK unabhängige Mechanismen wie direkte Inhibition der Dsg3-Bindung oder andere Signalaktivierungen bei m-PV aus, um Blasenbildung zu verursachen. Eigenschaften der Mukosa wie erhöhter Zellumsatz, verringerte

Differenzierung und schnellere Adaption auf Reize, welche sich in der Desmosomenkomposition widerspiegeln, könnten p38MAPK-vermittelte strukturelle Veränderungen von geringerer Relevanz für den mukosalen Phänotyp machen. Für PF-IgG wurde eine Phosphorylierung von p38MAPK *in vitro* sowie *in vivo* gezeigt [117]. Inhibition von p38MAPK war aber nur im Mausmodell und nicht in humaner Epidermis protektiv [117, 203]. Zum einen werden hier schicht- und organspezifische Unterschiede in der Funktion der Signalwege trotz der definierten Signalmuster untermalt. Zum anderen wird deutlich, dass p38MAPK-Aktivierung nicht bei allen Pemphigus-Phänotypen primär für den Zelladhäsionsverlust verantwortlich ist, sondern über strukturelle Veränderungen den Adhäsionsverlust verstärkt [119], wodurch die suprabasale epidermale Spaltbildung in Kombination mit aDsg1-Antikörpern vermittelt werden könnte.

Ebenso verringerte ERK-Inhibition die Abnahme der Desmosomenanzahl, während Größe und Keratinverankerung *ex vivo* unverändert blieb. Dabei konnte dadurch mc-PV-IgG-induzierte epidermale Spaltbildung reduziert werden [204]. Interessanterweise führte auch Inhibition des Ca^{2+} -Einstroms und der PLC γ -Aktivierung zur verringerten Blasenbildung bei Inkubation mit mc-PV-IgG [175], während Inhibition von PKC als Bestandteil desselben Signalweges keine positiven Effekte zeigte [204]. Dabei muss man bedenken, dass es verschiedene PKC-Isoformen gibt, welche die Desmosomenhaftung positiv oder negativ beeinflussen können [18, 134]. Durch die Signalmuster kann abgeleitet werden, dass die Inhibition der hier definierten Dsg1-assoziierten Signalmechanismen ausreicht, um die epidermale Blasenbildung bei mc-PV zu verhindern. Die Wirkung auf die superfiziellen Zellschichten bei PF und unspezifische Verbesserungen durch Inhibition des Ca^{2+} -Signalwegs in der Mukosa sind hingegen noch nicht untersucht worden.

In Mausepidermis konnte die durch AK23 verursachte Blasenbildung mithilfe von Src-Inhibition verhindert werden [129], während diese in humaner *ex vivo* Epidermis keine protektiven Effekte gegen mc-PV-IgG zeigte, sodass die Signalaktivierung von geringerer Relevanz für die suprabasale Spaltbildung in der Epidermis erscheint [129]. Die Ergebnisse könnten sich jedoch in der Mukosa durch die hier dargestellte Assoziation von Src zu m-PV-IgG und Dsg3 unterscheiden.

6.6 Bedeutung von Dsg-Knockout-Zelllinien zur Evaluation einzelner Signalwege

Durch die hier generierten humanen Knockout-Zelllinien kann die Beteiligung der unterschiedlichen desmosomalen Antikörper an der Pemphiguspathogenese weiter konkretisiert werden. Der Gen-Knockout konnte auf DNA- und Proteinebene bestätigt werden. Dabei zeigte sich

eine Steigerung der Dsg2-Proteinmenge bei Dsg3-Verlust. Die basale Zelladhäsion wurde jedoch nur bei Verlust von Dsg3 verringert. Vergleichbar zeigte Dsg3-Knockout im Mausmodell Adhäsionsverlust *in vitro* und Blasenbildung *in vivo* [205], welcher ebenfalls mit einer Steigerung der Dsg2-Proteinmenge, sowie erhöhter Transkription und Translokation zur Zellmembran einherging [22]. Zusätzlich zeigte die Herabregulation von Dsg2 durch siRNA geringeren Adhäsionsverlust als Reduktion von Dsg3, wodurch deutlich wird, dass Dsg2 weniger zur Adhäsion in Keratinozyten beiträgt als Dsg3 [22]. Dadurch werden zum einen die Zelllinien indirekt validiert, da die Ergebnisse mit anderen Modellen vergleichbar sind, zum anderen wird eine kompensatorische Regulation bei Verlust von Desmogleinen durch andere Desmogleine angedeutet. Dieser Effekt konnte auch bei Pemphigus gezeigt werden. Dort induzierte mc-PV-IgG eine Steigerung der Dsg2-Proteinmenge *in vitro*, *ex vivo* und in manchen Patientenbiopsien [172, 206], wodurch möglicherweise IgG-vermittelter Adhäsionsverlust gemildert wird. Diese Beobachtung wird hier unterstützt, da in Wildtypzellen der durch mc-PV-IgG hervorgerufene Adhäsionsverlust weniger stark als in Dsg2-Knockout-Zellen ausgefallen ist, obwohl Dsg2-Verlust basal keinen Adhäsionsverlust zur Folge hatte. Auf der anderen Seite konnte der PV-IgG induzierte Adhäsionsverlust durch Depletion von Dsg3 vollständig verhindert werden. Die Immunadsorption von aDsg3-spezifischen Antikörpern führt zu ähnlichen Effekten [207], wodurch der Beitrag der aDsg3-Antikörper zum Adhäsionsverlust bei m-PV und mc-PV hervorgehoben wird. Die aDsg1-assoziierten Pathomechanismen bei Inkubation mit mc-PV-IgG konnten jedoch auch keinen Adhäsionsverlust induzieren, obwohl ERK und Ca^{2+} -Einstrom weiterhin in den Dsg3-Knockout-Zellen induziert werden konnten. Über die basale kompensatorische Dsg2-Steigerung könnte dieser Effekt möglicherweise erklärt werden. Letztlich können die Zelllinien in Zukunft weiter verwendet werden, um die Signalmuster auf ihre Abhängigkeiten zu den jeweiligen Desmogleinen zu überprüfen. Da Δ Dsg1-deletierte Zellen jedoch nicht erfolgreich generiert werden konnten, müssen andere Modelle zur Evaluation der aDsg1-abhängigen Mechanismen verwendet werden. Mittlerweile existiert aber ein Dsg1-defizientes Mausmodell, welches sich durch einen starken Phänotypen mit ausgeprägter Kompromittierung der Hautbarriere sowie Blasenbildung auszeichnet [208]. Durch Isolation von Zellen aus diesem Modell könnten die aDsg1-assoziierten Signalaktivierungen überprüft werden, falls diese lebensfähig wären.

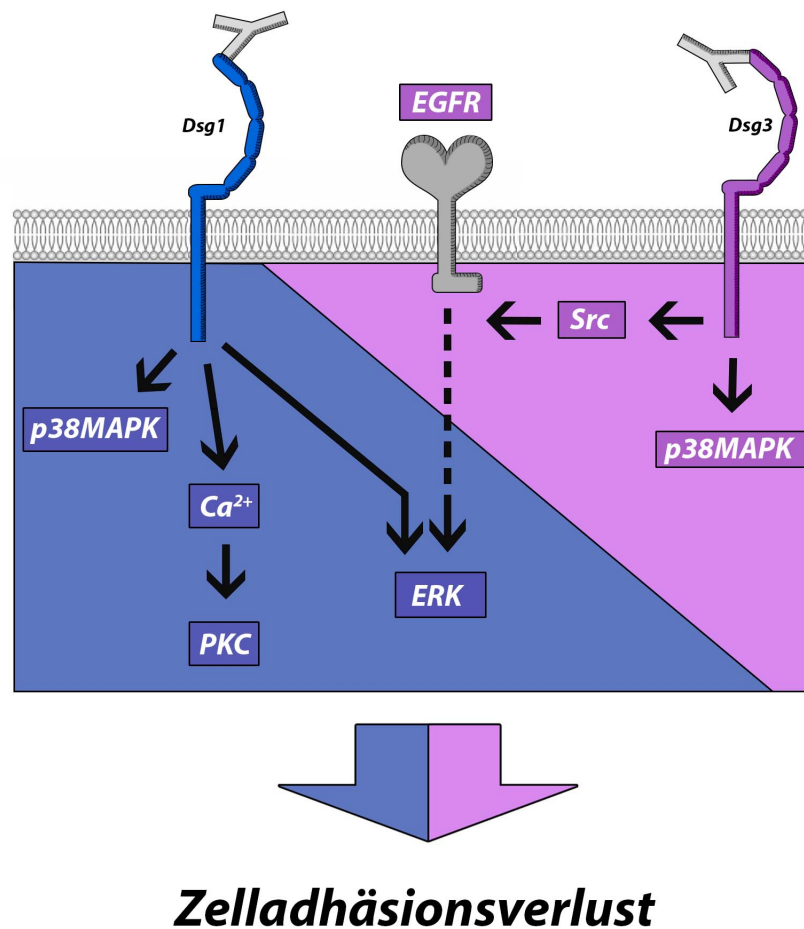


Abbildung 29: *Signalwege der Pemphigus-Pathogenese*

Zusammenfassung der vorgestellten Signalwege und ihre Abhängigkeit von Dsg1 und Dsg3. Signalwege, welche durch aDsg1-Antikörper induziert wurden, sind in blau markiert, während aDsg3-Antikörper-abhängige Signalwege in lila dargestellt sind. Modifiziert aus Walter et al., 2019 [167].

Kapitel 7

Zusammenfassung

Die autoimmundermatose Pemphigus zeichnet sich klinisch durch Blasenbildung an der Epidermis und mehrschichtigen Schleimhaut aus. Patienten entwickeln unterschiedliche Phänotypen abhängig vom Antikörperprofil gegen die desmosomalen Zelladhäsionsproteine Desmoglein (Dsg) 1 und Dsg3. Ein mukosal-betonter Pemphigus vulgaris (PV) tritt bei aDsg3-Antikörpern auf, während sowohl bei aDsg3- als auch aDsg1-Antikörpern ein mukokutaner PV typisch ist. Pemphigus foliaceus mit oberflächlicher epidermaler Blasenbildung wird bei aDsg1-Antikörpern induziert. In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal verschiedene Pemphigus-Pathomechanismen den unterschiedlichen klinischen Phänotypen mit ihren jeweiligen Antikörperprofilen zugeordnet und dadurch gezeigt, dass die Aktivierung von Signalwegen Autoantikörper-spezifisch ist.

Durch die Analyse stellten sich spezifische Signalmuster dar, welche parallel zum Phänotyp und den verschiedenen Autoantikörperprofilen aktiviert wurden. Autoantikörper von Patienten aller verschiedener klinischer Phänotypen lösten eine p38MAPK-Aktivierung aus. Phänotypen mit aDsg3-Antikörpern führten zu Src- und EGFR-Aktivierung, während Immunglobuline mit aDsg1-Antikörpern ERK aktivierten und einen intrazellulären Ca^{2+} -Einstrom induzierten. Dabei zeigte sich durch pharmakologische Inhibition eine Src-vermittelte EGFR-Aktivierung, während ERK zwar von der basalen EGFR-Aktivität abhängig war, jedoch unabhängig von Src aktiviert wurde. Für die Erhöhung des cAMP-Spiegels, welche als protektiv gegen den Zelladhäsionsverlust angesehen wird, konnte keine eindeutige Korrelation zum Autoantikörperprofil festgestellt werden.

Durch spezifische pharmakologische Intervention wurde gezeigt, dass verschiedene Signalwege von unterschiedlicher Relevanz für den Autoantikörper-vermittelten Adhäsionsverlust sein können. Weiterhin wurde untersucht, ob die Aktivierung der verschiedenen Signalwege mit der Reduktion der Dsg1- und Dsg3- vermittelten Haftung korrelierte. IgG-Fraktionen mit aDsg3-Antikörpern reduzierten homophile Dsg3-Bindungen, während aDsg1-Antikörper homophile Dsg1-Bindungen nicht verhindern konnten. Dadurch wurde verdeutlicht, dass aDsg1-

assoziierte Signalaktivierungen nicht auf direkte Inhibition der homophilen Dsg1-Bindungen zurückzuführen sind, während dies für aDsg3-vermittelte Signalwege wie die Src-vermittelte EGFR-Aktivität möglich erscheint.

Zur spezifischeren Untersuchung der Aktivierung von Signalwegen durch Dsg1 und Dsg3 wurden mit der CRISPR/Cas9-Technologie HaCaT-Keratinocyten generiert und charakterisiert, die für Dsg3 defizient sind, wobei Dsg2 zum Vergleich depletiert wurde. Dadurch konnte zum einen die Bedeutung der aDsg3-Antikörper, zum anderen eine kompensatorische Regulation von Dsg2 bei Dsg3-Verlust und zuletzt die Unabhängigkeit der mit dem Autoantikörperprofil gegen Dsg1 korrelierten Signalwege ERK und Ca^{2+} nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte erstmalig gezeigt werden, dass bei Pemphigus Autoantikörper-spezifische Signalaktivierungen eine Rolle spielen. Da diese mit dem Autoantikörperprofil der verschiedenen klinischen Phänotypen korrelieren, zeigen diese Muster einen neuen Erklärungsansatz für diese Unterschiede auf. Da die Ergebnisse auch belegen, dass Dsg1 und Dsg3 unterschiedliche Funktionen haben, liefern die Befunde dieser Arbeit neue Erkenntnisse über die Pathogenese des Pemphigus, welche die Voraussetzung für die Entwicklung neuer und spezifischer Therapieansätze sind.

Literaturverzeichnis

- [1] Renate Lüllmann-Rauch. *Taschenlehrbuch Histologie*. Thieme, Stuttgart [u.a.], 5. edition, 2015.
- [2] Kurt Fleischhauer, Jochen Staubesand, and Wolfgang Zenker. *Makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen*, volume 3. Urban & Schwarzenberger, München - Wien - Baltimore, 14. edition, 1985.
- [3] B M Gumbiner. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*, 84(3):345–57, 2 1996.
- [4] Volker Spindler and Jens Waschke. Pemphigus—A Disease of Desmosome Dysfunction Caused by Multiple Mechanisms. *Frontiers in Immunology*, 9:136, 2 2018.
- [5] D. T. Egu, A. M. Sigmund, E. Schmidt, V. Spindler, E. Walter, and J. Waschke. A new ex vivo human oral mucosa model reveals that p38MAPK inhibition is not effective to prevent autoantibody-induced mucosal blistering in pemphigus. *British Journal of Dermatology*, 6 2019.
- [6] C.A. Lesch, C.A. Squier, A. Cruchley, D.M. Williams, and P. Speight. The Permeability of Human Oral Mucosa and Skin to Water. *Journal of Dental Research*, 68(9):1345–1349, 9 1989.
- [7] Tracey A Winning and Grant C Townsend. Oral mucosal embryology and histology. *Clinics in Dermatology*, 18(5):499–511, 9 2000.
- [8] Sha-Sha Wang, Ya-Ling Tang, Xin Pang, Min Zheng, Ya-Jie Tang, and Xin-Hua Liang. The maintenance of an oral epithelial barrier. *Life Sciences*, 227:129–136, 6 2019.
- [9] Kathleen J. Green, Quinn Roth-Carter, Carien M. Niessen, and Scott A. Nichols. Tracing the Evolutionary Origin of Desmosomes. *Current Biology*, 30(10):R535–R543, 5 2020.
- [10] Joey E. Lai-Cheong, Ken Arita, and John A. McGrath. Genetic Diseases of Junctions. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(12):2713–2725, 12 2007.

- [11] Mese Gülistan, Gabriele Richard, and White Thomas W. Gap Junctions: Basic Structure and Function. *Journal of Investigative Dermatology*, 127:2516–2524, 2007.
- [12] F. Villanelo, Y. Escalona, C. Pareja-Barrueto, J. A. Garate, I. M. Skerrett, and T. Perez-Acle. Accessing gap-junction channel structure-function relationships through molecular modeling and simulations. *BMC Cell Biology*, 18(S1):5, 1 2017.
- [13] Joji Tada and Ken Hashimoto. Ultrastructural localization of gap junction protein connexin 43 in normal human skin, basai cell carcinoma, and squamous cell carcinoma. *J Cutan Pathol*, 24:628–635, 1997.
- [14] Charlène Guillot and Thomas Lecuit. Mechanics of Epithelial Tissue Homeostasis and Morphogenesis. *Science*, 340(6137):1185–1189, 6 2013.
- [15] Carien M. Niessen and Cara J. Gottardi. Molecular components of the adherens junction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(3):562–571, 3 2008.
- [16] Kazue Yoshida, Mariko Yokouchi, Keisuke Nagao, Ken Ishii, Masayuki Amagai, and Akiharu Kubo. Functional tight junction barrier localizes in the second layer of the stratum granulosum of human epidermis. *Journal of Dermatological Science*, 71(2):89–99, 8 2013.
- [17] Ceniz Zihni, Clare Mills, Karl Matter, and Maria S. Balda. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(9):564–580, 9 2016.
- [18] Jens Waschke. The desmosome and pemphigus. *Histochemistry and cell biology*, 130(1):21–54, 7 2008.
- [19] Ashraf Al-Amoudi, Daniel Castaño-Diez, Damien P. Devos, Robert B. Russell, Graham T. Johnson, and Achilleas S. Frangakis. The three-dimensional molecular structure of the desmosomal plaque. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(16):6480–6485, 4 2011.
- [20] Spiro Getsios, Arthur C. Huen, and Kathleen J. Green. Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(4):271–281, 4 2004.
- [21] Jens Waschke and Volker Spindler. Desmosomes and extradesmosomal adhesive signaling contacts in pemphigus. *Medicinal research reviews*, 34(6):1127–45, 11 2014.
- [22] Eva Hartlieb, Bettina Kempf, Miriam Partilla, Balázs Vigh, Volker Spindler, and Jens Waschke. Desmoglein 2 Is Less Important than Desmoglein 3 for Keratinocyte Cohesion. *PLoS ONE*, 2013.

- [23] Julia Brasch, Oliver J Harrison, Barry Honig, and Lawrence Shapiro. Thinking outside the cell: how cadherins drive adhesion. *Trends Cell Biol*, 22(6):299–310, 2012.
- [24] Marihan Hegazy, Abbey L. Perl, Sophia A. Svoboda, and Kathleen J. Green. Desmosomal Cadherins in Health and Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 17(1):47–72, 1 2022.
- [25] Siu Man Tsang, Louise Brown, Kuang Lin, Li Liu, Kim Piper, Edel A O’Toole, Richard Grose, Ian R Hart, David R Garrod, Farida Fortune, and Hong Wan. Non-junctional human desmoglein 3 acts as an upstream regulator of Src in E-cadherin adhesion, a pathway possibly involved in the pathogenesis of pemphigus vulgaris. *The Journal of Pathology*, 227(1):81–93, 5 2012.
- [26] Eliane J. Müller, Lina Williamson, Carine Kolly, and Maja M. Suter. Outside-in Signaling through Integrins and Cadherins: A Central Mechanism to Control Epidermal Growth and Differentiation? *Journal of Investigative Dermatology*, 128(3):501–516, 3 2008.
- [27] Sanjeevi Sivasankar, Yunxiang Zhang, W. James Nelson, and Steven Chu. Characterizing the Initial Encounter Complex in Cadherin Adhesion. *Structure*, 2009.
- [28] Yinghao Wu, Xiangshu Jin, Oliver Harrison, Lawrence Shapiro, Barry H. Honig, and Avinoam Ben-Shaul. Cooperativity between β_1 and β_2 interactions in cadherin-mediated junction formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010.
- [29] Oliver J. Harrison, Julia Brasch, Gorka Lasso, Phinikoula S. Katsamba, Goran Ahlsen, Barry Honig, and Lawrence Shapiro. Structural basis of adhesive binding by desmocolins and desmogleins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016.
- [30] Molly Lowndes, Sabyasachi Rakshit, Omer Shafraz, Nicolas Borghi, Robert M. Harmon, Kathleen J. Green, Sanjeevi Sivasankar, and W. James Nelson. Different roles of cadherins in the assembly and structural integrity of the desmosome complex. *Journal of Cell Science*, 2014.
- [31] Franziska Vielmuth, Marie-Therès Wanuske, Mariya Y. Radeva, Matthias Hiermaier, Daniela Kugelmann, Elias Walter, Fanny Buechau, Thomas M. Magin, Jens Waschke, and Volker Spindler. Keratins Regulate the Adhesive Properties of Desmosomal Cadherins through Signaling. *Journal of Investigative Dermatology*, 138(1):121–131, 1 2018.

- [32] Wolfgang-Moritz Heupel, Detlef Zillikens, Detlev Drenckhahn, and Jens Waschke. Pemphigus vulgaris IgG directly inhibit desmoglein 3-mediated transinteraction. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(3):1825–34, 8 2008.
- [33] Volker Spindler, Wolfgang Moritz Heupel, Athina Efthymiadis, Enno Schmidt, Rüdiger Eming, Christian Rankl, Peter Hinterdorfer, Thomas Müller, Detlev Drenckhahn, and Jens Waschke. Desmocollin 3-mediated binding is crucial for keratinocyte cohesion and is impaired in pemphigus. *Journal of Biological Chemistry*, 284(44):30556–30564, 10 2009.
- [34] Michael Fuchs, Daniela Kugelmann, Nicolas Schlegel, Franziska Vielmuth, and Jens Waschke. Desmoglein 2 can undergo Ca²⁺-dependent interactions with both desmosomal and classical cadherins including E-cadherin and N-cadherin. *Biophysical Journal*, 121(7):1322–1335, 4 2022.
- [35] Omer Shafraz, Matthias Rübsam, Sara N Stahley, Amber L Caldara, Andrew P Kowalczyk, Carien M Niessen, and Sanjeevi Sivasankar. E-cadherin binds to desmoglein to facilitate desmosome assembly. *eLife*, 7, 7 2018.
- [36] Franziska Vielmuth, Volker Spindler, and Jens Waschke. Atomic Force Microscopy Provides New Mechanistic Insights into the Pathogenesis of Pemphigus. *Frontiers in Immunology*, 9(MAR), 3 2018.
- [37] E. Delva, D. K. Tucker, and A. P. Kowalczyk. The Desmosome. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(2):a002543–a002543, 8 2009.
- [38] N A Chitaev, R E Leube, R B Troyanovsky, L G Eshkind, W W Franke, and S M Troyanovsky. The binding of plakoglobin to desmosomal cadherins: patterns of binding sites and topogenic potential. *Journal of Cell Biology*, 133(2):359–369, 4 1996.
- [39] Lora L. Witcher, Russell Collins, Sailaja Puttagunta, Susan E. Mechanic, Marylinn Munson, Barry Gumbiner, and Pamela Cowin. Desmosomal cadherin binding domains of plakoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, 271(18):10904–10909, 1996.
- [40] C Bierkamp, H Schwarz, O Huber, and R Kemler. Desmosomal localization of beta-catenin in the skin of plakoglobin null-mutant mice. *Development*, 126(2):371, 1 1999.
- [41] Pamela Cowin, Hans Peter Kapprell, Werner W. Franke, John Tamkun, and Richard O. Hynes. Plakoglobin: A protein common to different kinds of intercellular adhering junctions. *Cell*, 1986.

- [42] René Keil, Katrin Rietscher, and Mechthild Hatzfeld. Antagonistic Regulation of Intercellular Cohesion by Plakophilins 1 and 3. *Journal of Investigative Dermatology*, 2016.
- [43] Katrin Rietscher, Annika Wolf, Gerd Hause, Annekatrin Rother, René Keil, Thomas M. Magin, Markus Glass, Carien M. Niessen, and Mechthild Hatzfeld. Growth Retardation, Loss of Desmosomal Adhesion, and Impaired Tight Junction Function Identify a Unique Role of Plakophilin 1 In Vivo. *Journal of Investigative Dermatology*, 2016.
- [44] Michael Fuchs, Marco Foresti, Mariya Y. Radeva, Daniela Kugelmann, Rene Keil, Mechthild Hatzfeld, Volker Spindler, Jens Waschke, and Franziska Vielmuth. Plakophilin 1 but not plakophilin 3 regulates desmoglein clustering. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(17):3465–3476, 9 2019.
- [45] Marie Therès Wanuske, Dominique Brantschen, Camilla Schinner, Chiara Stüdle, Elias Walter, Matthias Hiermaier, Franziska Vielmuth, Jens Waschke, and Volker Spindler. Clustering of desmosomal cadherins by desmoplakin is essential for cell-cell adhesion. *Acta Physiologica*, 231(4), 4 2021.
- [46] Robert D. Goldman, Satya Khuon, Ying Hao Chou, Puneet Opal, and Peter M. Steinert. The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *Journal of Cell Biology*, 1996.
- [47] Fanny Loschke, Kristin Seltmann, Jamal-Eddine Bouameur, and Thomas M Magin. Regulation of keratin network organization. *Current Opinion in Cell Biology*, 32:56–64, 2 2015.
- [48] Jouni Uitto, Gabriele Richard, and John A. McGrath. Diseases of epidermal keratins and their linker proteins. *Experimental Cell Research*, 313(10):1995–2009, 6 2007.
- [49] Xia Feng, Hao Zhang, Joseph B. Margolick, and Pierre A. Coulombe. Keratin Intracellular Concentration Revisited: Implications for Keratin Function in Surface Epithelia. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3):850–853, 3 2013.
- [50] Ildiko Szeverenyi, Andrew J. Cassidy, Wang Chung Cheuk, Bernett T.K. Lee, John E.A. Common, Stephen C. Ogg, Huijia Chen, Yin Sim Shu, Walter L.P. Goh, Woei Ng Kee, John A. Simpson, Lian Chee Li, Hui Eng Goi, Bin Li, Declan P. Lunny, Danny Chuon, Aparna Venkatesh, Hoe Khoo Kian, W. H.Irwin McLean, Ping Lim Yun, and E. Birgitte Lane. The human intermediate filament database: Comprehensive information on a gene family involved in many human diseases, 2008.

- [51] Robert Pollmann, Thomas Schmidt, Rüdiger Eming, and Michael Hertl. Pemphigus: a Comprehensive Review on Pathogenesis, Clinical Presentation and Novel Therapeutic Approaches. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 2018.
- [52] J. E. Wichmann. Beytrag zur Kenntnis des Pemphigus. *Erfurt*, G.A. Keyser, 1791.
- [53] Walter F. Lever. PEMPHIGUS. *Medicine*, 23(1):1–123, 1953.
- [54] E H Beutner and R E Jordon. Demonstration of Skin Antibodies in Sera of Pemphigus Vulgaris Patients by Indirect Immunofluorescent Staining.* (29622). *Experimental Biology and Medicine*, 117(2):505–510, 1964.
- [55] J. R. Stanley, M. Yaar, P. Hawley-Nelson, and S. I. Katz. Pemphigus antibodies identify a cell surface glycoprotein synthesized by human and mouse keratinocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 1982.
- [56] Masayuki Amagai, Vera Klaus-Kovtun, and John R. Stanley. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell*, 67(5):869–77, 11 1991.
- [57] Rappersberger K, Roos N, and Stanley JR. Immunomorphologic and biochemical identification of the pemphigus foliaceus autoantigen within desmosomes. *J Invest Dermatol.*, 99(3), 1992.
- [58] Kazuyuki Tsunoda, Takayuki Ota, Masataka Saito, Tsuyoshi Hata, Atsushi Shimizu, Akira Ishiko, Taketo Yamada, Taneaki Nakagawa, Andrew P. Kowalczyk, and Masayuki Amagai. Pathogenic relevance of IgG and IgM antibodies against desmoglein 3 in blister formation in pemphigus vulgaris. *The American journal of pathology*, 179(2):795–806, 8 2011.
- [59] A A Sinha, C Brautbar, F Szafer, A Friedmann, E Tzfon, J A Todd, L Steinman, and H O McDevitt. A newly characterized HLA DQ beta allele associated with pemphigus vulgaris. *Science*, 239(4843):1026, 2 1988.
- [60] A Razzaque Ahmed, Edmond J Yunis, Khalil Khatrit, Rene Wagnert, Gur Notanit, Zuheir Awdeht, and Chester A Alpert. Major histocompatibility complex haplotype studies in Ashkenazi Jewish patients with pemphigus vulgaris. *Immunology*, 87:7658–7662, 1990.
- [61] Elena Slomov, Ron Loewenthal, Michael Korostishevsky, Ilan Goldberg, Sarah Brenner, and Ephraim Gazit. Pemphigus Vulgaris Is Associated with the Transporter Associated with Antigen Processing (TAP) System. *Human Immunology*, 2005.

- [62] Ofer Sarig, Sivan Bercovici, Lilach Zoller, Ilan Goldberg, Margarita Indelman, Sagi Nahum, Shirli Israeli, Nadav Sagiv, Helena Martinez De Morentin, Oren Katz, Sharon Baum, Aviv Barzilai, Henri Trau, Dedee F. Murrell, Reuven Bergman, Michael Hertl, Shai Rosenberg, Markus M. Nöthen, Karl Skorecki, Enno Schmidt, Detlef Zillikens, Ariel Darvasi, Dan Geiger, Saharon Rosset, Saleh M. Ibrahim, and Eli Sprecher. Population-specific association between a polymorphic variant in ST18, encoding a pro-apoptotic molecule, and pemphigus vulgaris. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(7):1798–1805, 2012.
- [63] Mariya Y. Radeva, Elias Walter, Ramona Alexandra Stach, Amir S. Yazdi, Nicolas Schlegel, Ofer Sarig, Eli Sprecher, and Jens Waschke. ST18 Enhances PV-IgG-Induced Loss of Keratinocyte Cohesion in Parallel to Increased ERK Activation. *Frontiers in immunology*, 10:770, 2019.
- [64] C Laguna, JL Sánchez-Carazo, A Pérez-Ferriols, and V Alegre. Pemphigus vulgaris associated with cocaine snorting. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 22(5):645–646, 5 2008.
- [65] Andrea Kneisel and Michael Hertl. Autoimmune bullous skin diseases. Part 1: Clinical manifestations. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 2011.
- [66] My G. Mahoney, Zhi Hong Wang, and John R. Stanley. Pemphigus Vulgaris and Pemphigus Foliaceus Antibodies are Pathogenic in Plasminogen Activator Knockout Mice. *Journal of Investigative Dermatology*, 113(1):22–25, 7 1999.
- [67] Dario Didona and Giovanni Di Zenzo. Humoral Epitope Spreading in Autoimmune Bullous Diseases. *Frontiers in Immunology*, 9, 4 2018.
- [68] Valeria Aoki, Evandro A. Rivitti, and Luis A. Diaz. Update on fogo selvagem, an endemic form of pemphigus foliaceus. *The Journal of Dermatology*, 42(1):18–26, 1 2015.
- [69] Ye Qian, Joseph S. Jeong, Mike Maldonado, Jesus G. Valenzuela, Regis Gomes, Clarissa Teixeira, Flor Evangelista, Bahjat Qaqish, Valeria Aoki, Gunter Hans, Evandro A. Rivitti, Donald Eaton, and Luis A. Diaz. Cutting Edge: Brazilian Pemphigus Foliaceus Anti-Desmoglein 1 Autoantibodies Cross-React with Sand Fly Salivary LJM11 Antigen. *The Journal of Immunology*, 189(4):1535–1539, 8 2012.
- [70] Maria Jasmin J. Jamora, Diane Jiao, and Jean Claude Bystryrn. Antibodies to desmoglein 1 and 3, and the clinical phenotype of pemphigus vulgaris. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 48(6):976–977, 6 2003.

- [71] Kazue Yoshida, Yujiro Takae, Hitoshi Saito, Hiroshi Oka, Akiko Tanikawa, Masayuki Amagai, and Takeji Nishikawa. Cutaneous type pemphigus vulgaris: a rare clinical phenotype of pemphigus. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 52(5):839–45, 5 2005.
- [72] David Rafei, Ralf Müller, Norito Ishii, Maria Llamazares, Takashi Hashimoto, Michael Hertl, and Rüdiger Eming. IgG Autoantibodies Against Desmocollin 3 in Pemphigus Sera Induce Loss of Keratinocyte Adhesion. *The American Journal of Pathology*, 178(2):718–723, 2 2011.
- [73] Y. Nakamura, H. Takahata, K. Teye, N. Ishii, T. Hashimoto, and M. Muto. A case of pemphigus herpetiformis-like atypical pemphigus with IgG anti-desmocollin 3 antibodies. *British Journal of Dermatology*, 171(6):1588–1590, 12 2014.
- [74] Koji Kamiya, Yumi Aoyama, Chie Wakashima, Tomoko Kudo, Kimiko Nakajima, Shigetoshi Sano, Norito Ishii, Kwesi Teye, Takashi Hashimoto, Keiji Iwatsuki, and Yoshiki Tokura. Atypical pemphigus with immunoglobulin G autoantibodies against desmoglein 3 and desmocollin 3. *The Journal of Dermatology*, 43(4):429–431, 4 2016.
- [75] Swantje Mindorf, Inga M. Dettmann, Stine Krüger, Tarek Fuhrmann, Kristin Rentzsch, Ingolf Karl, Christian Probst, Lars Komorowski, Kai Fechner, Nina van Beek, Susanne Lemcke, Miklós Sárdy, Christine Bangert, Sandrine Benoit, Takashi Hashimoto, Detlef Zillikens, Hendri H. Pas, Marcel F. Jonkman, Winfried Stöcker, and Enno Schmidt. Routine detection of serum antidesmocollin autoantibodies is only useful in patients with atypical pemphigus. *Experimental Dermatology*, 26(12):1267–1270, 12 2017.
- [76] Marwah A. Saleh, Rena Hashimoto, Yuko Kase, Masayuki Amagai, and Jun Yamagami. Low pathogenicity of anti-desmoglein 3 immunoglobulin G autoantibodies contributes to the atypical clinical phenotypes in pemphigus. *The Journal of Dermatology*, 42(7):685–689, 7 2015.
- [77] K T Amber, M Valdebran, and S A Grando. Non-Desmoglein Antibodies in Patients With Pemphigus Vulgaris. *Front Immunol*, 9:1190, 2018.
- [78] Steve Marchenko, Alexander I. Chernyavsky, Juan Arredondo, Vivian Gindi, and Sergei A. Grando. Antimitochondrial autoantibodies in pemphigus vulgaris: A missing link in disease pathophysiology. *Journal of Biological Chemistry*, 2010.
- [79] Vu Thuong Nguyen, Tou X. Lee, Assane Ndoeye, Leonard D. Shultz, Mark R. Pittelkow, Mark V. Dahl, Peter J. Lynch, and Sergei A. Grando. The Pathophysiological Significance of Nondesmoglein Targets of Pemphigus Autoimmunity. *Archives of Dermatology*, 134(8), 8 1998.

- [80] A. Parameswaran, K. Attwood, R. Sato, K. Seiffert-Sinha, and A.A. Sinha. Identification of a new disease cluster of pemphigus vulgaris with autoimmune thyroid disease, rheumatoid arthritis and type I diabetes. *British Journal of Dermatology*, 172(3):729–738, 3 2015.
- [81] Andrea Kneisel and Michael Hertl. Autoimmune bullous skin diseases. Part 2: diagnosis and therapy. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 2011.
- [82] AMAGAI, KOMAI, HASHIMOTO, SHIRAKATA, HASHIMOTO, YAMADA, KITAJIMA, OHYA, IWANAMI, and NISHIKAWA. Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3 for serodiagnosis of pemphigus. *British Journal of Dermatology*, 140(2):351–357, 2 1999.
- [83] M. Hertl, H. Jedlickova, S. Karpati, B. Marinovic, S. Uzun, S. Yayli, D. Mimouni, L. Borradori, C. Feliciani, D. Ioannides, P. Joly, C. Kowalewski, G. Zambruno, D. Zillikens, and M.F. Jonkman. Pemphigus. S2 Guideline for diagnosis and treatment - guided by the European Dermatology Forum (EDF) in cooperation with the European Academy of Dermatology and Venereology (EADV). *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 29(3):405–414, 3 2015.
- [84] Christoph T Ellebrecht and Aimee S Payne. Setting the target for pemphigus vulgaris therapy. *JCI Insight*, 2(5), 3 2017.
- [85] Pascal Joly, Maud Maho-Vaillant, Catherine Prost-Squarcioni, Vivien Hebert, Estelle Houivet, Sébastien Calbo, Frédérique Caillot, Marie Laure Golinski, Bruno Labeille, Catherine Picard-Dahan, Carle Paul, Marie Aleth Richard, Jean David Bouaziz, Sophie Duvert-Lehembre, Philippe Bernard, Frederic Caux, Marina Alexandre, Saskia Ingen-Housz-Oro, Pierre Vabres, Emmanuel Delaporte, Gaelle Quereux, Alain Dupuy, Sebastien Debarbieux, Martine Avenel-Audran, Michel D’Incan, Christophe Bedane, Nathalie Bénétou, Denis Jullien, Nicolas Dupin, Laurent Misery, Laurent Machet, Marie Beylot-Barry, Olivier Dereure, Bruno Sassolas, Thomas Vermeulin, Jacques Benichou, and Philippe Musette. First-line rituximab combined with short-term prednisone versus prednisone alone for the treatment of pemphigus (Ritux 3): a prospective, multicentre, parallel-group, open-label randomised trial. *The Lancet*, 2017.
- [86] H. P. Patel, L. A. Diaz, G. J. Anhalt, R. S. Labib, and Y. Takahashi. Demonstration of pemphigus antibodies on the cell surface of murine epidermal cell monolayers and their internalization. *Journal of Investigative Dermatology*, 1984.

- [87] G F Wilgram, J B Caulfield, and W F Lever. An electron microscopic study of acantholysis in pemphigus vulgaris. *The Journal of investigative dermatology*, 36(1):373–82, 5 1961.
- [88] George F. Wilgram, James B. Caulfield, and Eve B. Madgic. An Electron Microscopic Study of Acantholysis and Dyskeratosis in Pemphigus Foliaceus. *Journal of Investigative Dermatology*, 43(5):287–299, 11 1964.
- [89] Ena Sokol, Duco Kramer, Gilles F.H. Diercks, Jeroen Kuipers, Marcel F. Jonkman, Hendri H. Pas, and Ben N.G. Giepmans. Large-Scale Electron Microscopy Maps of Patient Skin and Mucosa Provide Insight into Pathogenesis of Blistering Diseases. *Journal of Investigative Dermatology*, 135(7):1763–1770, 7 2015.
- [90] D.T. Egu, E. Walter, V. Spindler, and J. Waschke. Inhibition of p38MAPK signaling prevents epidermal blistering and alterations of desmosome structure induced by pemphigus autoantibodies in human epidermis. *British Journal of Dermatology*, 177(6):1612–1618, 12 2017.
- [91] Elisabeth Schlögl, Mariya Y. Radeva, Franziska Vielmuth, Camilla Schinner, Jens Waschke, and Volker Spindler. Keratin Retraction and Desmoglein3 Internalization Independently Contribute to Autoantibody-Induced Cell Dissociation in Pemphigus Vulgaris. *Frontiers in Immunology*, 9:25, 4 2018.
- [92] A. Lanza, A. De Rosa, F. Femiano, P. Annese, E. Ruocco, F. Gombos, M. Lanza, and N. Cirillo. Internalization of Non-Clustered Desmoglein 1 without Depletion of Desmoglein 1 from Adhesion Complexes in An Experimental Model of the Autoimmune Disease Pemphigus Foliaceus. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 20(2):355–361, 4 2007.
- [93] Jean M. Jennings, Dana K. Tucker, Margaret D. Kottke, Masataka Saito, Emmanuella Delva, Yasushi Hanakawa, Masayuki Amagai, and Andrew P. Kowalczyk. Desmosome Disassembly in Response to Pemphigus Vulgaris IgG Occurs in Distinct Phases and Can Be Reversed by Expression of Exogenous Dsg3. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(3):706–718, 3 2011.
- [94] M. Sekiguchi, Y. Futei, Y. Fujii, T. Iwasaki, T. Nishikawa, and M. Amagai. Dominant Autoimmune Epitopes Recognized by Pemphigus Antibodies Map to the N-Terminal Adhesive Region of Desmogleins. *The Journal of Immunology*, 2001.
- [95] Kazuyuki Tsunoda, Takayuki Ota, Miyo Aoki, Taketo Yamada, Tetsuo Nagai, Taneaki Nakagawa, Shigeo Koyasu, Takeji Nishikawa, and Masayuki Amagai. Induction of

- Pemphigus Phenotype by a Mouse Monoclonal Antibody Against the Amino-Terminal Adhesive Interface of Desmoglein 3. *The Journal of Immunology*, 170(4):2170, 2 2003.
- [96] Aimee S Payne, Ken Ishii, Stephen Kacir, Chenyan Lin, Hong Li, Yasushi Hanakawa, Kazuyuki Tsunoda, Masayuki Amagai, John R Stanley, and Don L Siegel. Genetic and functional characterization of human pemphigus vulgaris monoclonal autoantibodies isolated by phage display. *The Journal of clinical investigation*, 115(4):888–99, 4 2005.
- [97] Jose M. Mascaró, Agustín España, Zhi Liu, Xiang Ding, Sue J. Swartz, Janet A. Fairley, and Luis A. Diaz. Mechanisms of Acantholysis in Pemphigus Vulgaris: Role of IgG Valence. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 85(1):90–96, 10 1997.
- [98] Franziska Vielmuth, Eva Hartlieb, Daniela Kugelmann, Jens Waschke, and Volker Spindler. Atomic force microscopy identifies regions of distinct desmoglein 3 adhesive properties on living keratinocytes. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 11(3):511–20, 4 2015.
- [99] Jens Waschke, Paola Bruggeman, Werner Baumgartner, Detlef Zillikens, and Detlev Drenckhahn. Pemphigus foliaceus IgG causes dissociation of desmoglein 1-containing junctions without blocking desmoglein 1 transinteraction. *The Journal of clinical investigation*, 115(11):3157–65, 11 2005.
- [100] Shohei Egami, Jun Yamagami, and Masayuki Amagai. Autoimmune bullous skin diseases, pemphigus and pemphigoid. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 145(4):1031–1047, 4 2020.
- [101] My G. Mahoney, Zhihong Wang, Kyle Rothenberger, Peter J. Koch, Masayuki Amagai, and John R. Stanley. Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. *Journal of Clinical Investigation*, 103(4):461–468, 2 1999.
- [102] Michael J. Berridge. The Inositol Trisphosphate/Calcium Signaling Pathway in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 96(4):1261–1296, 10 2016.
- [103] G R Sharpe, J I Gillespie, and J R Greenwell. An increase in intracellular free calcium is an early event during differentiation of cultured human keratinocytes. *FEBS Lett.*, 254(1):25–28, 1989.
- [104] Zhongjian Xie and Daniel D. Bikle. The Recruitment of Phosphatidylinositol 3-Kinase to the E-cadherin-Catenin Complex at the Plasma Membrane Is Required for Calcium-induced Phospholipase C- γ 1 Activation and Human Keratinocyte Differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(12):8695–8703, 3 2007.

- [105] Mariko Seishima, Chikako Esaki, Kazuko Osada, Shunji Mori, Takashi Hashimoto, and Yasuo Kitajima. 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. *Journal of Investigative Dermatology*, 104(1):33–37, 1 1995.
- [106] C. Esaki, M. Seishima, T. Yamada, K. Osada, and Y. Kitajima. 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. *Journal of Investigative Dermatology*, 105(3):329–333, 1995.
- [107] Seishima M, Iwasaki-Bessho Y, Itoh Y, Nozawa Y, Amagai M, and Kitajima Y. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C, but not phospholipase D, is involved in pemphigus IgG-induced signal transduction. *Arch Dermatol Res*, 291:606–613, 1999.
- [108] Kazuko Osada, Mariko Seishima, and Yasuo Kitajima. Pemphigus IgG Activates and Translocates Protein Kinase C from the Cytosol to the Particulate/Cytoskeleton Fractions in Human Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 108(4):482–487, 4 1997.
- [109] Schuh T, Besch R, Braungart E, Flaig MJ, Douwes K, Sander CA, Magdolen V, Probst C, Wosikowski K, and Degitz K. Protease Inhibitors Prevent Plasminogen-Mediated But Not Pemphigus Vulgaris-Induced Acantholysis in Human Epidermis. *Biol. Chem.*, 384:311 – 315, 2003.
- [110] K Hashimoto, T C Wun, J Baird, G S Lazarus, and P J Jensen. Characterization of keratinocyte plasminogen activator inhibitors and demonstration of the prevention of pemphigus IgG-induced acantholysis by a purified plasminogen activator inhibitor. *The Journal of investigative dermatology*, 92(3):310–4, 3 1989.
- [111] Volker Spindler, Alexander Endlich, Eva Hartlieb, Franziska Vielmuth, Enno Schmidt, and Jens Waschke. The extent of desmoglein 3 depletion in pemphigus vulgaris is dependent on Ca(2+)-induced differentiation: a role in suprabasal epidermal skin splitting? *The American journal of pathology*, 179(4):1905–16, 10 2011.
- [112] R Seger and E G Krebs. The MAPK signaling cascade. *The FASEB Journal*, 9(9):726–735, 6 1995.
- [113] John M. Kyriakis and Joseph Avruch. Mammalian MAPK Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation: A 10-Year Update. *Physiological Reviews*, 92(2):689–737, 4 2012.

- [114] Volker Spindler, Rüdiger Eming, Enno Schmidt, Masayuki Amagai, Sergei Grando, Marcel F Jonkman, Andrew P Kowalczyk, Eliane J Müller, Aimee S Payne, Carlo Pincelli, Animesh A Sinha, Eli Sprecher, Detlef Zillikens, Michael Hertl, and Jens Waschke. Mechanisms Causing Loss of Keratinocyte Cohesion in Pemphigus. *The Journal of investigative dermatology*, 138(1):32–37, 2018.
- [115] Paula Berkowitz, Peiqi Hu, Zhi Liu, Luis A. Diaz, Jan J. Enghild, Michael P. Chua, and David S. Rubenstein. Desmosome signaling. Inhibition of p38MAPK prevents pemphigus vulgaris IgG-induced cytoskeleton reorganization. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(25):23778–84, 6 2005.
- [116] Paula Berkowitz, Peiqi Hu, Simon Warren, Zhi Liu, Luis a Diaz, and David S Rubenstein. p38MAPK inhibition prevents disease in pemphigus vulgaris mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(34):12855–60, 8 2006.
- [117] Paula Berkowitz, Michael Chua, Zhi Liu, Luis a Diaz, and David S Rubenstein. Autoantibodies in the autoimmune disease pemphigus foliaceus induce blistering via p38 mitogen-activated protein kinase-dependent signaling in the skin. *The American journal of pathology*, 173(6):1628–36, 12 2008.
- [118] Alex I. Chernyavsky, Juan Arredondo, Yasuo Kitajima, Miki Sato-Nagai, and Sergei A. Grando. Desmoglein Versus Non-desmoglein Signaling in Pemphigus Acantholysis. *Journal of Biological Chemistry*, 282(18):13804–13812, 5 2007.
- [119] Xuming Mao, Yasuyo Sano, Jin Mo Park, and Aimee S. Payne. p38 MAPK Activation Is Downstream of the Loss of Intercellular Adhesion in Pemphigus Vulgaris. *Journal of Biological Chemistry*, 286(2):1283–1291, 1 2011.
- [120] Meryem Bektas, Puneet S Jolly, Paula Berkowitz, Masayuki Amagai, and David S Rubenstein. A pathophysiologic role for epidermal growth factor receptor in pemphigus acantholysis. *The Journal of biological chemistry*, 288(13):9447–56, 3 2013.
- [121] Puneet S. Jolly, Paula Berkowitz, Meryem Bektas, Hua-En Lee, Michael Chua, Luis A. Diaz, and David S. Rubenstein. p38MAPK Signaling and Desmoglein-3 Internalization Are Linked Events in Pemphigus Acantholysis. *Journal of Biological Chemistry*, 285(12):8936–8941, 3 2010.
- [122] Peyton Rous. A SARCOMA OF THE FOWL TRANSMISSIBLE BY AN AGENT SEPARABLE FROM THE TUMOR CELLS. *Journal of Experimental Medicine*, 13(4):397–411, 4 1911.

- [123] G. Steven Martin. The hunting of the Src. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(6):467–475, 6 2001.
- [124] Sheila M. Thomas and Joan S. Brugge. CELLULAR FUNCTIONS REGULATED BY SRC FAMILY KINASES. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13(1):513–609, 11 1997.
- [125] Enzo Calautti, Sara Cabodi, Paul L. Stein, Mechthild Hatzfeld, Nancy Kedersha, and G. Paolo Dotto. Tyrosine Phosphorylation and Src Family Kinases Control Keratinocyte Cell–Cell Adhesion. *Journal of Cell Biology*, 141(6):1449–1465, 6 1998.
- [126] Nicola Cirillo and Stephen S. Prime. Desmosomal interactome in keratinocytes: a systems biology approach leading to an understanding of the pathogenesis of skin disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(21):3517–3533, 11 2009.
- [127] Nicola Cirillo, Emad AlShwaimi, Michael McCullough, and Stephen S Prime. Pemphigus vulgaris autoimmune globulin induces Src-dependent tyrosine-phosphorylation of plakophilin 3 and its detachment from desmoglein 3. *Autoimmunity*, 47(2):134–40, 3 2014.
- [128] Vera Rötzer, Eva Hartlieb, Franziska Vielmuth, Martin Gliem, Volker Spindler, and Jens Waschke. E-cadherin and Src associate with extradesmosomal Dsg3 and modulate desmosome assembly and adhesion. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(24):4885–4897, 2015.
- [129] Daniela Kugelmann, Vera Rötzer, Elias Walter, Desalegn Tadesse Egu, Michael Tobias Fuchs, Franziska Vielmuth, Hilda Vargas-Robles, Michael Schnoor, Michael Hertl, Rüdiger Eming, Klemens Rottner, Ansgar Schmidt, Volker Spindler, and Jens Waschke. Role of Src and Cortactin in Pemphigus Skin Blistering. *Frontiers in immunology*, 10(APR):626, 4 2019.
- [130] Jeremy D. Rotty and Pierre A. Coulombe. A wound-induced keratin inhibits Src activity during keratinocyte migration and tissue repair. *Journal of Cell Biology*, 197(3):381–389, 4 2012.
- [131] Antony W Burgess, Hyun-Soo Cho, Charles Eigenbrot, Kathryn M Ferguson, Thomas P.J Garrett, Daniel J Leahy, Mark A Lemmon, Mark X Sliwkowski, Colin W Ward, and Shigeyuki Yokoyama. An Open-and-Shut Case? Recent Insights into the Activation of EGF/ErbB Receptors. *Molecular Cell*, 12(3):541–552, 9 2003.
- [132] Antony W. Burgess. EGFR family: Structure physiology signalling and therapeutic targets. *Growth Factors*, 26(5):263–274, 1 2008.

- [133] Mark A Lemmon and Joseph Schlessinger. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 141(7):1117–34, 6 2010.
- [134] Thomas Schmitt and Jens Waschke. Autoantibody-Specific Signalling in Pemphigus. *Frontiers in Medicine*, 8, 8 2021.
- [135] Taofei Yin, Spiro Getsios, Reto Caldelari, Lisa M. Godsel, Andrew P. Kowalczyk, Eliane J. Müller, and Kathleen J. Green. Mechanisms of Plakoglobin-dependent Adhesion. *Journal of Biological Chemistry*, 280(48):40355–40363, 12 2005.
- [136] Spiro Getsios, Cory L. Simpson, Shin-ichiro Kojima, Robert Harmon, Linda J. Sheu, Rachel L. Dusek, Mona Cornwell, and Kathleen J. Green. Desmoglein 1-dependent suppression of EGFR signaling promotes epidermal differentiation and morphogenesis. *Journal of Cell Biology*, 185(7):1243–1258, 6 2009.
- [137] M Frusic-Zlotkin, D Raichenberg, X Wang, M David, B Michel, and Y Milner. Apoptotic mechanism in pemphigus autoimmunoglobulins-induced acantholysis—possible involvement of the EGF receptor. *Autoimmunity*, 39(7):563–575, 2006.
- [138] Wolfgang Moritz Heupel, Peter Engerer, Enno Schmidt, and Jens Waschke. Pemphigus vulgaris IgG cause loss of desmoglein-mediated adhesion and keratinocyte dissociation independent of epidermal growth factor receptor. *American Journal of Pathology*, 174(2):475–485, 2009.
- [139] Dorothee C. Schoenwasser, Richard M. Marais, Christopher J. Marshall, and Peter J. Parker. Activation of the Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway by Conventional, Novel, and Atypical Protein Kinase C Isotypes. *Molecular and Cellular Biology*, 18(2):790–798, 2 1998.
- [140] Wei Zhang and Hui Tu Liu. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*, 12(1):9–18, 3 2002.
- [141] Robert M. Harmon, Cory L. Simpson, Jodi L. Johnson, Jennifer L. Koetsier, Adi D. Dubash, Nicole A. Najor, Ofer Sarig, Eli Sprecher, and Kathleen J. Green. Desmoglein-1/Erbin interaction suppresses ERK activation to support epidermal differentiation. *Journal of Clinical Investigation*, 123(4):1556–1570, 4 2013.
- [142] Vera Rötzer, Andreas Breit, Jens Waschke, and Volker Spindler. Adducin is required for desmosomal cohesion in keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 289(21):14925–14940, 2014.

- [143] Volker Spindler, Franziska Vielmuth, Enno Schmidt, David S. Rubenstein, and Jens Waschke. Protective Endogenous Cyclic Adenosine 5-Monophosphate Signaling Triggered by Pemphigus Autoantibodies. *The Journal of Immunology*, 185(11):6831–6838, 12 2010.
- [144] Shigetomo Fukuhara, Atsuko Sakurai, Hideto Sano, Akiko Yamagishi, Satoshi Somekawa, Nobuyuki Takakura, Yoshihiko Saito, Kenji Kangawa, and Naoki Mochizuki. Cyclic AMP Potentiates Vascular Endothelial Cadherin-Mediated Cell-Cell Contact To Enhance Endothelial Barrier Function through an Epac-Rap1 Signaling Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 25(1):136–146, 1 2005.
- [145] Camilla Schinner, Franziska Vielmuth, Vera Rötzer, Matthias Hiermaier, Mariya Y. Radeva, Thu Kim Co, Eva Hartlieb, Andreas Schmidt, Axel Imhof, Ahmed Messoudi, Anja Horn, Angela Schlipp, Volker Spindler, and Jens Waschke. Adrenergic Signaling Strengthens Cardiac Myocyte Cohesion. *Circulation Research*, 120(8):1305–1317, 4 2017.
- [146] Petra Boukamp, R T Petrussevska, D Breitkreutz, J Hornung, A Markham, and N E Fusenig. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of cell biology*, 106(3):761–771, 3 1988.
- [147] P K Smith, R I Krohn, G T Hermanson, A K Mallia, F H Gartner, M D Provenzano, E K Fujimoto, N M Goeke, B J Olson, and D C Klenk. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1):76–85, 1985.
- [148] U. K. LAEMMLI. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685, 8 1970.
- [149] H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9):4350–4354, 9 1979.
- [150] Johannes Schindelin, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, Verena Kaynig, Mark Longair, Tobias Pietzsch, Stephan Preibisch, Curtis Rueden, Stephan Saalfeld, Benjamin Schmid, Jean-Yves Tinevez, Daniel James White, Volker Hartenstein, Kevin Eliceiri, Pavel Tomancak, and Albert Cardona. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9:676, 6 2012.
- [151] A. H.W.M. Schuurs and B. K. Van Weemen. Enzyme-immunoassay: A powerful analytical tool. *Journal of Immunoassay*, 1(2):229–249, 1 1980.

- [152] Annamarie C. Dalton and William A. Barton. Over-expression of secreted proteins from mammalian cell lines. *Protein Science*, 23:517–525, 2014.
- [153] Dionne C. G. Klein, Cordula M. Stroh, Henriette Jensenius, Maarten van Es, A. S. M. Kamruzzahan, Amalia Stamouli, Hermann J. Gruber, Tjerk H. Oosterkamp, and Peter Hinterdorfer. Covalent Immobilization of Single Proteins on Mica for Molecular Recognition Force Microscopy. *ChemPhysChem*, 4(12):1367–1371, 12 2003.
- [154] Andreas Ebner, Linda Wildling, A S M Kamruzzahan, Christian Rankl, Jürgen Wruss, Christoph D. Hahn, Martin Hölzl, Rong Zhu, Ferry Kienberger, Dieter Blaas, Peter Hinterdorfer, and Hermann J Gruber. A new, simple method for linking of antibodies to atomic force microscopy tips. *Bioconjugate chemistry*, 18(4):1176–84, 7 2007.
- [155] Ferry Kienberger, Vassili Ph Pastushenko, Gerald Kada, Hermann J. Gruber, Christian Riener, Hansgeorg Schindler, and Peter Hinterdorfer. Static and Dynamical Properties of Single Poly(Ethylene Glycol) Molecules Investigated by Force Spectroscopy. *Single Molecules*, 2000.
- [156] Ashley D. Slattery, Adam J. Blanch, Jamie S. Quinton, and Christopher T. Gibson. Accurate measurement of Atomic Force Microscope cantilever deflection excluding tip-surface contact with application to force calibration. *Ultramicroscopy*, 131:46–55, 8 2013.
- [157] Ken Ishii, Reiko Harada, Itsuro Matsuo, Yuji Shirakata, Koji Hashimoto, and Masayuki Amagai. In Vitro Keratinocyte Dissociation Assay for Evaluation of the Pathogenicity of Anti-Desmoglein 3 IgG Autoantibodies in Pemphigus Vulgaris. *Journal of Investigative Dermatology*, 124(5):939–946, 5 2005.
- [158] George Gabriel Stokes. XXX. On the change of refrangibility of light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 142:463–562, 1 1852.
- [159] Osamu Shimomura, Frank H Johnson, and Yo Saiga. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 59(3):223–239, 6 1962.
- [160] Mats Ormö, Andrew B. Cubitt, Karen Kallio, Larry A. Gross, Roger Y. Tsien, and S. James Remington. Crystal Structure of the Aequorea victoria Green Fluorescent Protein. *Science*, 273(5280):1392–1395, 9 1996.
- [161] Marcin Moch, Gerlind Herberich, Til Aach, Rudolf E Leube, and Reinhard Windoffer. Measuring the regulation of keratin filament network dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(26):10664–9, 6 2013.

- [162] Haim Giloh and John W Sedat. Fluorescence Microscopy: Reduced Photobleaching of Rhodamine and Fluorescein Protein Conjugates by n-Propyl Gallate. *Science*, 217(4566):1252–1255, 9 1982.
- [163] Jennifer A. Doudna and Emmanuelle Charpentier. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 11 2014.
- [164] Martin Jinek, Krzysztof Chylinski, Ines Fonfara, Michael Hauer, Jennifer A. Doudna, and Emmanuelle Charpentier. A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337(6096):816–821, 8 2012.
- [165] Elias Walter, Franziska Vielmuth, Lukas Rotkopf, Miklós Sárdy, Orsolya N Horváth, Matthias Goebeler, Enno Schmidt, Rüdiger Eming, Michael Hertl, Volker Spindler, and Jens Waschke. Different signaling patterns contribute to loss of keratinocyte cohesion dependent on autoantibody profile in pemphigus. *Scientific reports*, 7(1):3579, 2017.
- [166] Katri Koli and Jorma Keski-Oja. Cellular senescence. *Annals of Medicine*, 24(5):313–318, 1992.
- [167] Elias Walter, Franziska Vielmuth, Marie-Therès Wanuske, Matthias Seifert, Robert Pollmann, Rüdiger Eming, and Jens Waschke. Role of Dsg1- and Dsg3-Mediated Signaling in Pemphigus Autoantibody-Induced Loss of Keratinocyte Cohesion. *Frontiers in immunology*, 10(MAY):1128, 5 2019.
- [168] Joshua A Bryant, Richard S Finn, Dennis J Slamon, Timothy F Cloughesy, and Andrew C Charles. EGF activates intracellular and intercellular calcium signaling by distinct pathways in tumor cells. *Cancer Biology & Therapy*, 3(12):1243–1249, 12 2004.
- [169] Mairer Pretel, Agustín España, Miren Marquina, Beatriz Pelacho, Jose María López-Picazo, and Maria J. López-Zabalza. An imbalance in Akt/mTOR is involved in the apoptotic and acantholytic processes in a mouse model of pemphigus vulgaris. *Experimental dermatology*, 18(9):771–80, 9 2009.
- [170] I. Sánchez-Carpintero, Agustín España, B. Pelacho, N. López Moratalla, D. S. Rubenstein, L. A. Diaz, and M. J. López-Zabalza. In vivo blockade of pemphigus vulgaris acantholysis by inhibition of intracellular signal transduction cascades. *The British journal of dermatology*, 151(3):565–70, 9 2004.
- [171] Eva Hartlieb, Vera Rötzer, Mariya Radeva, Volker Spindler, and Jens Waschke. Desmoglein 2 Compensates for Desmoglein 3 but Does Not Control Cell Adhesion via Regulation of p38 Mitogen-activated Protein Kinase in Keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 289(24):17043–17053, 6 2014.

- [172] Anna M. Sigmund, Letyfee S. Steinert, Desalegn T. Egu, Franziska C. Bayerbach, Jens Waschke, and Franziska Vielmuth. Dsg2 Upregulation as a Rescue Mechanism in Pemphigus. *Frontiers in Immunology*, 11(October):1–11, 2020.
- [173] Katja Schulze, Arnaud Galichet, Beyza S Sayar, Anthea Scothern, Denise Howald, Hillard Zymann, Myriam Siffert, Denise Zenhäusern, Reinhard Bolli, Peter J Koch, David Garrod, Maja M Suter, and Eliane J Müller. An adult passive transfer mouse model to study desmoglein 3 signaling in pemphigus vulgaris. *The Journal of investigative dermatology*, 132(2):346–55, 2 2012.
- [174] Volker Spindler, Vera Rötzer, Carina Dehner, Bettina Kempf, Martin Gliem, Mariya Radeva, Eva Hartlieb, Gregory S. Harms, Enno Schmidt, and Jens Waschke. Peptide-mediated desmoglein 3 crosslinking prevents pemphigus vulgaris autoantibody-induced skin blistering. *The Journal of clinical investigation*, 123(2):800–11, 2 2013.
- [175] T. Schmitt, D. T. Egu, E. Walter, A. M. Sigmund, R. Eichkorn, A. Yazdi, E. Schmidt, M. Sárdy, R. Eming, M. Goebeler, and J. Waschke. Ca²⁺ signalling is critical for autoantibody-induced blistering of human epidermis in pemphigus*. *British Journal of Dermatology*, 185(3):595–604, 9 2021.
- [176] Hanna Ungewiß, Franziska Vielmuth, Shintaro T. Suzuki, Andreas Maiser, Hartmann Harz, Heinrich Leonhardt, Daniela Kugelmann, Nicolas Schlegel, and Jens Waschke. Desmoglein 2 regulates the intestinal epithelial barrier via p38 mitogen-activated protein kinase. *Scientific Reports*, 7(1), 12 2017.
- [177] Volker Spindler, Carina Dehner, Stefan Hübner, and Jens Waschke. Plakoglobin but Not Desmoplakin Regulates Keratinocyte Cohesion via Modulation of p38MAPK Signaling. *The Journal of investigative dermatology*, 134(6):1655–64, 2014.
- [178] Edward L. Huttlin, Raphael J. Bruckner, Joao A. Paulo, Joe R. Cannon, Lily Ting, Kurt Baltier, Greg Colby, Fana Gebreab, Melanie P. Gygi, Hannah Parzen, John Szpyt, Stanley Tam, Gabriela Zarraga, Laura Pontano-Vaites, Sharan Swarup, Anne E. White, Devin K. Schweppe, Ramin Rad, Brian K. Erickson, Robert A. Obar, K. G. Guruharsha, Kejie Li, Spyros Artavanis-Tsakonas, Steven P. Gygi, and J. Wade Harper. Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks. *Nature*, 545(7655):505–509, 5 2017.
- [179] Yoshihiko Ueda, Syu-ichi Hirai, Shin-ichi Osada, Atsushi Suzuki, Keiko Mizuno, and Shigeo Ohno. Protein Kinase C δ Activates the MEK-ERK Pathway in a Manner Independent of Ras and Dependent on Raf. *Journal of Biological Chemistry*, 271(38):23512–23519, 9 1996.

- [180] Beyza S. Sayar, Simon Rüegg, Enno Schmidt, Maria Sibilia, Myriam Siffert, Maja M. Suter, Arnaud Galichet, and Eliane J. Müller. EGFR inhibitors erlotinib and lapatinib ameliorate epidermal blistering in pemphigus vulgaris in a non-linear, V-shaped relationship. *Experimental Dermatology*, 23(1):33–38, 2014.
- [181] M. Ivars, A. España, P. Alzuguren, B. Pelacho, J. J. Lasarte, and M. J. López-Zabalza. The involvement of ADAM10 in acantholysis in mucocutaneous pemphigus vulgaris depends on the autoantibody profile of each patient. *British Journal of Dermatology*, 182(5):1194–1204, 5 2020.
- [182] Daniela Kugelmann, Maresa Anders, Anna M. Sigmund, Desalegn T. Egu, Ramona A. Eichkorn, Amir S. Yazdi, Miklós Sárdy, Michael Hertl, Dario Didona, Takashi Hashimoto, and Jens Waschke. Role of ADAM10 and ADAM17 in the Regulation of Keratinocyte Adhesion in Pemphigus Vulgaris. *Frontiers in Immunology*, 13, 6 2022.
- [183] Franziska Vielmuth, Jens Waschke, and Volker Spindler. Loss of Desmoglein Binding Is Not Sufficient for Keratinocyte Dissociation in Pemphigus. *Journal of Investigative Dermatology*, 135(10):3068–3077, 2015.
- [184] Alice Cho, Amber L Caldara, Nina A Ran, Zach Menne, Robert C Kauffman, Maurizio Affer, Alexandra Llovet, Carson Norwood, Aaron Scanlan, Grace Mantus, Bridget Bradley, Stephanie Zimmer, Thomas Schmidt, Michael Hertl, Aimee S Payne, Ron Feldman, Andrew P Kowalczyk, and Jens Wrämmert. Single-Cell Analysis Suggests that Ongoing Affinity Maturation Drives the Emergence of Pemphigus Vulgaris Autoimmune Disease. *Cell reports*, 28(4):909–922, 7 2019.
- [185] N. Ishii, K. Teye, S. Fukuda, R. Uehara, T. Hachiya, H. Koga, A. Tsuchisaka, S. Numata, B. Ohyama, C. Tateishi, D. Tsuruta, M. Furumura, S. Hattori, T. Kawakami, C. Ohata, and T. Hashimoto. Anti-desmocollin autoantibodies in nonclassical pemphigus. *British Journal of Dermatology*, 173(1):59–68, 2015.
- [186] A. Kozłowska, T. Hashimoto, M. Jarzabek-Chorzelska, A. Amagai, Y. Nagata, Z. Strasz, and Stefania Jabłowska. Pemphigus herpetiformis with IgA and IgG antibodies to desmoglein 1 and IgG antibodies to desmocollin 3. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 48(1):117–122, 2003.
- [187] Roberta Lotti, Claudio Giacinto Atene, Alessandra Marconi, Giulia Di Rocco, L. Reggiani Bonetti, Tommaso Zanocco Marani, and Carlo Pincelli. Development of a desmocollin-3 active mouse model recapitulating human atypical pemphigus. *Frontiers in Immunology*, 10(JUN):1–10, 2019.

- [188] Tiantain Cui, Linlin Yang, Yunxia Ma, Iver Petersen, and Yuan Chen. Desmocollin 3 has a tumor suppressive activity through inhibition of AKT pathway in colorectal cancer. *Experimental Cell Research*, 378(2):124–130, 2019.
- [189] Ken Ishii, Kenji Yoshida, John R. Stanley, Jun Yamagami, Masayuki Amagai, and Akira Ishiko. Pemphigus Vulgaris and Foliaceous IgG Autoantibodies Directly Block Heterophilic Transinteraction between Desmoglein and Desmocollin. *Journal of Investigative Dermatology*, 140(10):1919–1926, 2020.
- [190] W M Heupel, D Zillikens, D Drenckhahn, and J Waschke. Pemphigus vulgaris IgG directly inhibit desmoglein 3-mediated transinteraction. *J Immunol*, 181(3):1825–1834, 2008.
- [191] J Waschke, P Bruggeman, W Baumgartner, D Zillikens, and D Drenckhahn. Pemphigus foliaceus IgG causes dissociation of desmoglein 1-containing junctions without blocking desmoglein 1 transinteraction. *J Clin Invest*, 115(11):3157–3165, 2005.
- [192] Zhuxiang Nie, Anita Merritt, Mansour Rouhi-Parkouhi, Lydia Taberner, and David Garrod. Membrane-impermeable Cross-linking Provides Evidence for Homophilic, Isoform-specific Binding of Desmosomal Cadherins in Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 286(3):2143–2154, 1 2011.
- [193] Franziska Vielmuth, Elias Walter, Michael Fuchs, Mariya Y Radeva, Fanny Buechau, Thomas M Magin, Volker Spindler, and Jens Waschke. Keratins Regulate p38MAPK-Dependent Desmoglein Binding Properties in Pemphigus. *Frontiers in immunology*, 9:528, 2018.
- [194] Catharine C. Calkins, Shannon V. Setzer, Jean Marie Jennings, Susan Summers, Kazuyuki Tsunoda, Masayuki Amagai, and Andrew P. Kowalczyk. Desmoglein endocytosis and desmosome disassembly are coordinated responses to pemphigus autoantibodies. *Journal of Biological Chemistry*, 281(11):7623–7634, 3 2006.
- [195] Tomomi E. Kimura, Anita J. Merritt, and David R. Garrod. Calcium-Independent Desmosomes of Keratinocytes are Hyper-Adhesive. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(4):775–781, 4 2007.
- [196] Judith B. Fülle, Henri Huppert, David Liebl, Jaron Liu, Rogerio Alves de Almeida, Bian Yanes, Graham D. Wright, E. Birgitte Lane, David R. Garrod, and Christoph Ballestrem. Desmosome dualism – most of the junction is stable, but a plakophilin moiety is persistently dynamic. *Journal of Cell Science*, 134(21):2021.03.02.433631, 11 2021.

- [197] Emily I. Bartle, Tejeshwar C. Rao, Reena R. Beggs, William F. Dean, Tara M. Urner, Andrew P. Kowalczyk, and Alexa L. Mattheyses. Protein exchange is reduced in calcium-independent epithelial junctions. *Journal of Cell Biology*, 219(6), 6 2020.
- [198] Nicola Cirillo, Alessandro Lanza, and Stephen S. Prime. Induction of hyper-adhesion attenuates autoimmune-induced keratinocyte cell–cell detachment and processing of adhesion molecules via mechanisms that involve PKC. *Experimental Cell Research*, 316(4):580–592, 2 2010.
- [199] Imke A.K. Burmester, Sarah Flaswinkel, Clara Sophie Thies, Anika Kasprick, Mayumi Kamaguchi, Valéria Bumiller-Bini, Shirin Emtenani, Nick Feldmann, Khalaf Kridin, Enno Schmidt, Nina van Beek, Detlef Zillikens, Christoph M. Hammers, Jennifer E. Hundt, and Ralf J. Ludwig. Identification of novel therapeutic targets for blocking acantholysis in pemphigus. *British Journal of Pharmacology*, 177(22):5114–5130, 11 2020.
- [200] Katharina Meier, Julia Holstein, Farzan Solimani, Jens Waschke, and Kamran Ghoreschi. Case Report: Apremilast for Therapy-Resistant Pemphigus Vulgaris. *Frontiers in Immunology*, 11, 10 2020.
- [201] Anna M Sigmund, Markus Winkler, Sophia Engelmayer, Desalegn T Egu, Daniela Kugelmann, Mariya Y Radeva, Franziska C Bayerbach, Stefan Kotschi, Sunil Yeruva, Enno Schmidt, Amir S Yazdi, Kamran Ghoreschi, Franziska Vielmuth, and Jens Waschke. Apremilast prevents blistering in human epidermis by stabilization of keratinocyte adhesion in pemphigus. *bioRxiv*, page 2022.02.07.478931, 1 2022.
- [202] Pawel J. Schweiger and Kim B. Jensen. Modeling human disease using organotypic cultures. *Current Opinion in Cell Biology*, 43:22–29, 2016.
- [203] Kenji Yoshidaa, Ken Ishiia, Atsushi Shimizu, Mariko Yokouchi, Masayuki Amagai, Ken Shiraishi, Yuji Shirakata, John R. Stanley, and Akira Ishiko. Non-pathogenic pemphigus foliaceus (PF) IgG acts synergistically with a directly pathogenic PF IgG to increase blistering by p38MAPK-dependent desmoglein 1 clustering. *Journal of Dermatological Science*, 2016.
- [204] Desalegn Tadesse Egu, Daniela Kugelmann, and Jens Waschke. Role of PKC and ERK Signaling in Epidermal Blistering and Desmosome Regulation in Pemphigus. *Frontiers in Immunology*, 10(December):1–10, 2019.
- [205] Vera Rötzer, Eva Hartlieb, Julia Winkler, Elias Walter, Angela Schlipp, Miklós Sardy, Jens Waschke, and Volker Spindler. Desmoglein 3-Dependent Signaling Regulates Keratinocyte Migration and Wound Healing. *Journal of Investigative Dermatology*, 2015.

-
- [206] IWATSUKI, HAN, FUKUTI, OHTSUKA, KIKUCHI, AKIBA, and KANEKO. Internalization of constitutive desmogleins with the subsequent induction of desmoglein 2 in pemphigus lesions. *British Journal of Dermatology*, 140(1):35–43, 1 1999.
- [207] Maxi Hofrichter, Jenny Dworschak, Shirin Emtenani, Jana Langenhan, Fanny Weiß, Lars Komorowski, Detlef Zillikens, Winfried Stöcker, Christian Probst, Enno Schmidt, and Stephanie Goletz. Immunoabsorption of desmoglein-3-specific IgG abolishes the blister-inducing capacity of pemphigus vulgaris IgG in neonatal mice. *Frontiers in Immunology*, 2018.
- [208] Daniela Kugelmann, Mariya Y. Radeva, Volker Spindler, and Jens Waschke. Desmoglein 1 Deficiency Causes Lethal Skin Blistering. *Journal of Investigative Dermatology*, 139(7):1596–1599, 7 2019.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
Ø	Durchmesser
Δ	Deletion
° C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
aDsg1	anti-Dsg1
aDsg3	anti-Dsg3
AJ	Adhärensjunktionen
AFM	Rasterkraftmikroskopie (Engl.: <i>Atomic Force Microscopy</i>)
AM	Acetylmethylester
ÄMP	Äußere Membranplaque
ANOVA	einfaktorielle Varianzanalyse (Engl.: <i>Analysis of variance</i>)
ARM	repetitive Domäne in Armadillo-Proteinen
at-PV	Atypischer Pemphigus vulgaris
BCA	Bicinchoninsäure
Bim-X	Bisindolylmaleimide-X hydrochloride
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (Engl.: <i>Bovine Serum Albumin</i>)
c-IgG	Kontrollgruppe (control-Immunglobuline G)
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	Cyclisches Adenosin-Monophosphat
Cas9	CRISPR-assoziiertes Protein 9

CHO	Chinesische Hamster-Ovarien-Zellen
CK	Zytokeratin (Engl.: <i>Cytokeratin</i>)
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
crRNA	CRISPR-RNA
CS	Korneosomen
Cu	Kupfer
Cy3	Cyanin 3
DAG	1,2-Diacylglycerin
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DS	Desmosomen
Dsc	Desmocollin
Dsg	Desmoglein
DSP	Doppelstrangbruch
E-Cad	E-Cadherin
EC	Extrazellulärdomäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor (Engl.: <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>)
ELISA	Enzymgekoppelter Immunosorptionstest (Engl.: <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>)
Emλ	Emissionswellenlänge
et al.	und andere (lat.: <i>et alii</i>)
Exλ	Exzitationswellenlänge
EYFP	Verstärktes gelbes fluoreszierendes Protein (Engl.: <i>enhanced yellow fluorescence protein</i>)
Fc	Kristallisierbares Fragment eines Antikörpers
FKS	Fetales Kälberserum
Fab-Fragment	Antigen-bindendes Fragment eines Antikörpers
G	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grünes Fluoreszierendes Protein
gRNA	Guide-RNA
h	Stunden

HBSS	Hanks gepufferte Salzlösung (Engl.: <i>Hank's balanced salt solution</i>)
HCl	Salzsäure
HK-5	Humanes-Keratin 5
HRP	Meerrettichperoxidase (Engl.: <i>Horseradishperoxidase</i>)
IgG	Immunglobulin G
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
HaCaT	immortalisierte Keratinozyten-Zelllinie (Engl.: <i>Human adult low Ca²⁺ and elevated temperature</i>)
HDR	Homologie-gerichtete Reparatur (Engl.: <i>homology-directed repair</i>)
HSP27	Hitzeschockprotein 27
HLA	Humane Leukozytenantigene
IF	Intermediärfilamentsystem
IMP	Innere Membranplaque
kDA	Kilodalton
n	Anzahl
N-Terminus	Amino-Terminus
NGS	Normales Ziegen Serum (Engl.: <i>normal goat serum</i>)
m	Meter
M	Stoffmenge, Molare Lösung
m-PV	Mukosaler Pemphigus vulgaris
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mc-PV	Mukokutaner Pemphigus vulgaris
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Stoffmengenkonzentration; millimolare Lösung
MP	Mesophragma
ms	Millisekunden
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromid
N/m	Newtonmeter
NHEJ	Nicht-homologe Endverknüpfung (Engl.: <i>non-homologous end-joining</i>)
nm	Nanometer
NHEK	Normale Humane epidermale Keratinozyten

p	Signifikanzwert; p-Wert
PBS	Phosphat-gepufferter Salzlösung
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAM	Protospacer Adjacent Motif
PEG-Linker	Polyethylenglykol-Verbinder
PF	<i>Pemphigus foliaceus</i>
Pg	Plakoglobin
PI4K	Phosphatidylinositol 4-kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMT	Photomultiplizierer
pN	Piconewton
PKP	Plakophilin
PV	<i>Pemphigus vulgaris</i>
PVA	<i>Pemphigus vulgaris</i> Antigen
RNA	Ribonukleinsäuren
RT	Raumtemperatur
SB	Stratum basale
SC	Stratum corneum
SDS	Natriumdodecylsulfat
SF	Stratum superficiale
SG	Stratum granulosum
SH	Src-Homologie Domäne
SI	Stratum intermedium
SS	Stratum spinosum
Src	virale-Rous-Sarcoma-Kinase
ST18	Suppression of Tumorigenicity 18
Tab.	Tabelle
TJ	Verschlusskontakte (Engl.: <i>Tight Junctions</i>)
U	Einheiten (Engl.: <i>Units</i>)
V	Volt
w/v	Gewicht/Volumen
v/v	Volumen/Volumen
Vehicle	Transportmedium

Abbildungsverzeichnis

1	Die Epidermis	3
2	Die Mundschleimhaut	4
3	Das Desmosom	6
4	Schematische Zusammenfassung der Pemphigus-Phänotypen	11
5	Cas9-Vektoraufbau	44
6	Desmoglein 3-Depletion und Zytokeratin-Retraktion	49
7	p38MAPK-, Src und ERK-Aktivierung nach Inkubation mit IgG-Fraktionen .	51
8	Ca ²⁺ -Einstrom bei Inkubation von IgG-Fraktionen	51
9	cAMP-Konzentration nach Inkubation mit verschiedenen IgG-Fraktionen . .	52
10	Zelladhäsionsverlust durch Inkubation mit zusätzlichen IgG-Fraktionen	53
11	Signalwegsmodulation durch zusätzliche IgG-Fraktionen	53
12	Signalwegsmodulation in primären Keratinozyten	54
13	EGFR-Aktivierung in Abhängigkeit von U0126, PP2, BAPTA und Erlotinib .	55
14	ERK-Aktivierung in Abhängigkeit von U0126, PP2, BAPTA und Erlotinib .	57
15	ERK-Aktivierung in Abhängigkeit von PKC	57
16	Abhängigkeit des Ca ²⁺ -Einstroms von EGFR-Aktivierung	58
17	Funktioneller Beitrag der p38MAPK- und PKC-Aktivierung zum Autoantikörper- vermittelten Zelladhäsionsverlust	59
18	Funktioneller Beitrag der ERK- und Src-Aktivierung zum Autoantikörper- vermittelten Zelladhäsionsverlust	59
19	Funktioneller Beitrag des Ca ²⁺ -Einstroms zum Zelladhäsionsverlust	60
20	Funktionelle Relevanz der EGFR-Aktivierung beim Zelladhäsionsverlust	61
21	Genanalyse der WT-, Dsg3- und Dsg2-Knockout-Zellenlinien	62
22	Immunfärbung zur Charakterisierung der Δ Dsg3- und Δ Dsg2-Knockout-Zellklone	63
23	Western Blot-Analyse zur Charakterisierung der Δ Dsg3- und Δ Dsg2-Zellklone	64
24	Zelladhäsionsveränderungen in Δ Dsg3- und Δ Dsg2-Zellen	65
25	ERK-Aktivität in Dsg-Knockout-Zellen nach IgG-Inkubationen	66

26	PF-induzierter Ca^{2+} -Einstrom in Dsg-Knockout-Zellen	66
27	IgG-vermittelte direkte Inhibition homophiler Dsg-Interaktionen	67
28	Schematische Zusammenfassung der Signalmuster	70
29	Signalwege der Pemphigus-Pathogenese	79

Tabellenverzeichnis

1	Zelllinien	21
2	Inhibitorische Mediatoren	21
3	Chemikalien	23
4	Rezepte	25
5	Primär-Antikörper	27
6	Sekundär-Antikörper	28
7	Verbrauchsmaterialien	29
8	Geräte	30
9	Patienten-Seren	47

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit

Bedeutung Autoantikörper-spezifischer Signalwege bei Pemphigus

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Teile der hier beschriebenen Ergebnisse und dargestellten Abbildungen wurden bereits in den folgenden Arbeiten publiziert:

Different signaling patterns contribute to loss of keratinocyte cohesion dependent on autoantibody profile in pemphigus

Elias Walter, Franziska Vielmuth, Lukas Rotkopf, Miklós Sárdy, Orsolya N. Horváth, Matthias Gobel, Enno Schmidt, Rüdiger Eming, Michael Hertl, Volker Spindler, Jens Waschke
Scientific Reports (2017), 7(1):3579, doi: 10.1038/s41598-017-03697-7

Role of Dsg1- and Dsg3-Mediated Signaling in Pemphigus Autoantibody-Induced Loss of Keratinocyte Cohesion

Elias Walter, Franziska Vielmuth, Marie-Therès Wanuske, Matthias Seifert, Robert Pollmann, Rüdiger Eming, Jens Waschke
Frontiers in Immunology (2019), 10(MAY):1128, 5 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.01128

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Danksagung

Vielen verschiedenen Personen, die direkt und indirekt zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben, gebührt mein Dank an dieser Stelle, auch denen, die hier nicht namentlich erwähnt werden.

Mein größter Dank gilt Prof. Dr. Jens Waschke, der nicht nur das Thema bereitgestellt und unermüdlich die Vollendung der Projekte vorangetrieben hat, sondern mir auch die Möglichkeit gegeben hat die Projekte in der DFG-geförderten Forschergruppe Pegasus weiterzuführen und die anatomische Lehre kennenzulernen. Danke für die Chancen die Wissenschaft in all ihren Facetten zu erleben: Sei es Projektplanung, -durchführung und vor allem auch -abschluss, die Arbeitsgruppenstruktur, der Austausch mit Kollegen oder die Vorstellung der Ergebnisse durch Vorträge auf nationalen und internationalen Kongressen. Diese Erfahrungen haben mich grundlegend geprägt und mein Interesse an der Forschung geweckt.

Weiterhin gilt ein besonderer Dank Prof. Dr. Volker Spindler, dessen Betreuung und Diskussionen -gerade in den Anfängen meiner Forschungszeit- die Dissertation zum Erfolg führten.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitenden, Mitpromovierenden, Wissenschaftlern und Wissenschaftlerinnen sowie Dozierenden des Lehrstuhls der Anatomischen Anstalt für die Unterstützung bei jeglichen Angelegenheiten, den Wissensaustausch, die Einarbeitung, die Ratschläge, die Aufmunterungen und die schöne Arbeitsatmosphäre. Besonders ist dabei Frau Dr. Mariya Radeva zu nennen. Ohne die ausführlichen Einweisungen in das richtige experimentelle Vorgehen und die Statistik wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Es gebührt großer Dank Martina Hitzenbichler, Thomas Korbica und Silke Gotchy für ihre exzellente technische Assistenz; aber auch allen unerwähnten Assistenten und Assistentinnen für die Organisation und Aufrechterhaltung der allgemeinen Laborinfrastruktur.

Ganz besonderer Dank gilt jedoch meinen Eltern und meiner ganzen Familie für ihre bedingungslose Unterstützung und ihr immer offenes Ohr. Zu guter Letzt gilt ein enormer Dank meiner Freundin für die beharrliche Motivation und sehr sorgfältige Korrektur.

Publikationsliste

Role of Dsg1- and Dsg3-Mediated Signaling in Pemphigus Autoantibody-Induced Loss of Keratinocyte Cohesion.

Walter E., Vielmuth F., Wanuske MT., Seifert M., Pollmann R., Eming R., Waschke J.

DOI: 10.3389/fimmu.2019.01128

Front. Immunol., 2019 (IF: 5,085)

Autoantibody profiles determine signaling patterns and loss of keratinocyte cohesion in pemphigus

Walter E., Vielmuth F., Rotkopf L., Spindler V., Waschke J.

DOI: 10.1038/s41598-017-03697-7

Sci. Rep., 2017 (IF: 4,122)

Impact of COVID-19 on Dental Care during a National Lockdown: A Retrospective Observational Study

Walter E., von Bronk L., Hickel R., Huth KC.

DOI: 10.3390/ijerph18157963

Int. J. Environ. Res. Public Health 2021 (IF: 4,614)

A new ex vivo human oral mucosa model reveals that p38MAPK inhibition is not effective to prevent autoantibody-induced mucosal blistering in pemphigus

Egu DT., Sigmund A., Schmidt E., Spindler V., Walter E.¹, Waschke J.¹

DOI: 10.1111/bjd.18237

Br J Dermatol., 2019 (IF: 7,000)

ST18 enhances PV-IgG-induced loss of keratinocyte cohesion in parallel to cytokine secretion and increased ERK activation

Radeva MY.¹, Walter E.¹, Stach R., Yazdi A., Schlegel N., Ofer S., Sprecher E., Waschke J.

DOI: 10.3389/fimmu.2019.00770

Front. Immunol. 2019 (IF: 5,085)

¹diese Autoren haben gleichermaßen zu der Erstellung der Arbeit beigetragen

Innate immune activation as cofactor in pemphigus disease manifestation*Eichkorn R., Schmidt MF., Walter E., Hertl M., Baron JM., Waschke J., Yazdi AS.*

DOI: 10.3389/fimmu.2022.898819

Front. Immunol. 2022 (IF: 8,787)

Clustering of desmosomal cadherins by desmoplakin is essential for cell-cell adhesion*Wanuske MT., Brantschen D., Schinner C., Stüdle C., Walter E., Hiermaier M., Vielmuth F., Waschke J., Spindler V.*

DOI: 10.1111/apha.13609

Acta Physiol. (Oxf), 2021 (IF: 7,523)

Ca²⁺ signalling is critical for autoantibody-induced blistering of human epidermis in pemphigus*Schmitt T., Egu DT., Walter E., Sigmund AM., Eichkorn R., Yazdi A., Schmidt E., Sárdy M., Eming R., Goebeler M., Waschke J.*

DOI: 10.1111/bjd.20091

Br. J. Dermatol. 2021 (IF: 11,113)

Identification of Autoreactive B Cell Subpopulations in Peripheral Blood of Autoimmune Patients With Pemphigus Vulgaris.*Pollmann R., Walter E., Schmidt T., Waschke J., Hertl M., Möbs C., Eming R.*

DOI: 10.3389/fimmu.2019.01375

Front. Immunol., 2019 (IF: 5,085)

Role of Src and Cortactin in Pemphigus Skin Blistering.*Kugelmann D., Rötzer V., Walter E., Egu DT., Fuchs MT., Vielmuth F., Vargas-Robles H., Schnoor M., Hertl M., Eming R., Rottner K., Schmidt A., Spindler V., Waschke J.*

DOI: 10.3389/fimmu.2019.00626

Front Immunol., 2019 (IF: 5,085)

Histamine causes endothelial barrier disruption via Ca²⁺-mediated RhoA activation and tension at adherens junctions.*Kugelmann D., Rotkopf LT., Radeva MY., Garcia-Ponce A., Walter E., Waschke J.*

DOI: 10.1038/s41598-018-31408-3

Sci. Rep., 2018 (IF: 4,011)

Keratins Regulate p38MAPK-Dependent Desmoglein Binding Properties in Pemphigus.*Vielmuth F., Walter E., Fuchs M., Radeva MY., Buechau F., Magin TM., Spindler V., Waschke J.*

DOI: 10.3389/fimmu.2018.00528

Front. Immunol., 2018 (IF: 4,716)

Keratins Regulate the Adhesive Properties of Desmosomal Cadherins through Signaling.*Vielmuth F., Wanuske MT., Radeva MY., Hiermaier M., Kugelmann D., Walter E., Buechau F., Magin TM., Waschke J., Spindler V.*

DOI: 10.1016/j.jid.2017.08.033

J. Invest. Dermatol., 2018 (IF: 6,290))

Inhibition of p38MAPK signalling prevents epidermal blistering and alterations of desmosome structure induced by pemphigus autoantibodies in human epidermis.

*Egu DT., **Walter E.**, Spindler V., Waschke J.*

DOI: 10.1111/bjd.15721

Br J Dermatol., 2017 (IF: 6,129)

Desmoglein 3-Dependent Signaling Regulates Keratinocyte Migration and Wound Healing.

*Rötzer V., Hartlieb E., Winkler J., **Walter E.**, Schlipp A., Sardy M., Spindler V., Waschke J.*

DOI: 10.1038/jid.2015.380

J. Invest. Dermatol. 2016 (IF: 6,287)

Kongressbeiträge

Autoantibody profiles determine signaling patterns and loss of keratinocyte cohesion in pemphigus

Pathogenesis of pemphigus and pemphigoid	Poster	München, 2016
111th Annual Anatomy Meeting	Vortrag	Göttingen, 2016
Experimental Biology	Vortrag	Chicago, 2017

Impact of COVID-19 on Dental Care during a National Lockdown: A Retrospective Observational Study

IADR General Session	Kurzvortrag	Boston, 2021
----------------------	-------------	--------------