

Aus dem Lehrstuhl I der Anatomischen Anstalt
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor Univ.-Prof. Dr. med. Jens Waschke

Charakterisierung der Bindungseigenschaften desmosomaler Cadherine und ihr Einfluss auf die Regulation der desmosomalen Haftung und Pathogenese der Pemphigus-Erkrankung

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach Anatomie und Zellbiologie
der Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von Dr. med. Franziska Hartig-Vielmuth

(2024)

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Stand der Forschung	4
1.1.	Epidermis	4
1.2.	Zell-Zell-Kontakte der Epidermis	5
1.3.	Desmosomen.....	6
1.3.1.	Desmosomenassemblierung.....	7
1.3.2.	Desmosomale Cadherine	8
1.3.3.	Interaktionsmechanismen desmosomaler Cadherine.....	11
1.3.4.	Desmosomale Plaqueproteine	11
1.3.5.	Keratine in epidermaler Adhäsion	13
1.3.6.	Desmosomale Hyperadhäsion.....	14
1.4.	Desmosomen-assoziierte Erkrankungen	15
1.5.	Pemphigus.....	16
1.5.1.	Klinik, Diagnostik und Therapie	16
1.5.2.	Pathogenese des Pemphigus.....	18
1.6.	Rasterkraftmikroskopie zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften desmosomaler Cadherine	21
1.6.1.	Grundlagen.....	21
1.6.2.	Methodische Weiterentwicklung zur Charakterisierung desmosomaler Adhäsion auf Keratinozyten	23
2.	Fragestellung des Habilitationsprojektes	26
3.	Ergebnisse	27
3.1.	Die Dsg3 Bindungseigenschaften unterscheiden sich in Abhängigkeit der Lokalisation auf der Zelle	29
3.2.	Plakophilin 1 jedoch nicht Plakophilin 3 reguliert die Clusterformation von Desmoglein 3.	31
3.3.	Keratine beeinflussen die Bindungseigenschaften desmosomaler Cadherine durch Regulation von intrazellulären Signalwegen	34
3.4.	Das Phänomen der desmosomalen Hyperadhäsion geht mit erhöhten Einzelmolekülbindungskräften von Desmoglein 3 einher.....	37
3.5.	Desmoglein 2 kann Ca ²⁺ -abhängige Interaktionen mit desmosomalen und klassischen Cadherinen eingehen.....	40
3.6.	Die direkte Inhibition von Dsg3 reicht nicht für den durch Pemphigus-Autoantikörper-induzierten Haftungsverlust aus.....	43
3.7.	Keratine regulieren Desmoglein-Bindungseigenschaften in Pemphigus in Abhängigkeit von p38MAPK	46

3.8.	Eine Dsg2-Hochregulation stellt einen Kompensationsmechanismus gegen den Autoantikörper-vermittelten Zellhaftungsverlust bei Pemphigus dar.....	49
3.9.	Der PDE4-Hemmer Apremilast verhindert den Pemphigus-Autoantikörper-induzierten Zellhaftungsverlust von Keratinozyten <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	51
3.10.	Pemphigus-Autoantikörper induzieren eine Blasenbildung in humaner Konjunktiva	54
4.	Diskussion	56
4.1.	AFM Studien tragen zur Aufklärung der Interaktionsmechanismen desmosomaler Cadherine und ihrer Regulation bei	56
4.1.1.	Desmosomale Cadherine interagieren homo- und heterophil	56
4.1.2.	Die heterophile Interaktion von Dsg2-Dsg3: Implikationen für die Bedeutung von unterschiedlichen Interaktionen unter verschiedenen biologischen Bedingungen	60
4.1.3.	Die Einzelmolekülbindungseigenschaften desmosomaler Cadherine werden durch unterschiedliche Faktoren reguliert.....	62
4.2.	Desmoglein Bindungseigenschaften tragen zur Ausbildung und Regulation der desmosomalen Hyperadhäsion bei	64
4.3.	AFM-Studien liefern wichtige Einblicke in die Pathogenese der Pemphigus-Erkrankung.	67
5.	Zusammenfassung und Ausblick	73
6.	Literaturverzeichnis	74
7.	Abkürzungsverzeichnis	92

1. Stand der Forschung

1.1. Epidermis

Die Hautdecke des Menschen besteht aus Subkutis, Dermis und Epidermis und grenzt den Organismus gegen die Außenwelt ab. Ihre Aufgaben umfassen neben der Barrierebildung, Thermoregulation, Schutz vor Umwelteinflüssen, Oberflächensensibilität sowie Immunfunktionen (Welsch, 2022).

Bei der äußersten Schicht – der Epidermis – handelt es sich um ein mehrschichtig verhorntes Plattenepithel, das im Wesentlichen von Keratinozyten gebildet wird und in welche verschiedene Zellen eingelagert sind, die spezifische Funktionen inne haben (Rice und Rompolas, 2020). So produzieren zum Beispiel Melanozyten Melanin und sind daher für einen UV-Schutz durch Pigmentierung unerlässlich (Benito-Martinez et al., 2020; Lambert et al., 2019); während Merkel Zellen als Sinnesrezeptoren für den Tastsinn fungieren (Xiao et al., 2014). Keratinozyten sind durch verschiedene Zell-Zell-Kontakte miteinander verknüpft, die unterschiedliche Funktionen erfüllen. Darüber hinaus ist die Basalzellschicht über Hemidesmosomen und Fokalkontakte an der Basalmembran verankert (Lüllmann-Rauch und Asan, 2019).

Die Epidermis ist in mehrere Schichten gegliedert (Abb. 1). Im Stratum basale liegen die einzigen Zellen mit proliferativen Potential, die als Stamm- oder Progenitorzellen bezeichnet werden (Blanpain und Fuchs, 2006). Sie teilen sich, ohne hierbei selbst verbraucht zu werden und generieren den Zellnachschub an Keratinozyten. Diese durchwandern ihrerseits die weiteren Schichten zur Oberfläche hin und durchlaufen dabei eine spezielle Form der terminalen Differenzierung, die als Kornifikation bezeichnet wird (Gonzales und Fuchs, 2017; Rice und Rompolas, 2020). Keratinozyten durchlaufen diesen Prozess als individuelle Zellen (Rompolas et al., 2016) und die Delamination erfolgt durch präzise abgestimmte, symmetrische und asymmetrische Zellteilungen (Yin et al., 2023). Die enge Regulation dieses Differenzierungsprozesses ist entscheidend für die Gewebemöostase, der fortwährenden Erneuerung der Epidermis und damit der Integrität des Gewebes (Blanpain und Fuchs, 2009; Gonzales und Fuchs, 2017; Yin et al., 2023).

Die einzelnen Schichten weisen auch strukturell Besonderheiten auf. So finden sich im Stratum spinosum zahlreiche Desmosomen, während im nachfolgenden Stratum granulosum erstmals Keratohyalin granula auftreten und die Zellen Säulen formieren, sodass eine Zelle die kornifiziert von einer sich differenzierenden Zelle ersetzt wird. Dadurch wird sichergestellt, dass in dieser Schicht fortwährend Tight Junctions eine dichte Barriere bilden können (Moreci und Lechler, 2020; Rubsam et al., 2017). Auch die Entwicklung des „cornified envelope“ in Stratum corneum trägt zur Barrierefunktion der Haut bei (Candi et al., 2005).

1.2. Zell-Zell-Kontakte der Epidermis

Interzelluläre Kontakte stellen eine unerlässliche Grundlage für die Funktionsweise mehrzelliger Organismen dar – sie werden für ihren Aufbau und ihre Organisation benötigt (Franke, 2009; Rubsam et al., 2018). Dabei unterscheidet man Desmosomen (Macula adherentes) und Adhärensjunktionen (Zonulae und Fasciae adherentes), die der Haftung zwischen den Zellen dienen, Tight junctions (Zonula occludentes), die als Verschlusskontakte die parazelluläre Permeabilität regulieren und Gap junctions (Nexus), die einen schnellen und doch regulierten Molekülaustausch zwischen benachbarten Zellen ermöglichen (Franke, 2009; Niessen, 2007; Rubsam et al., 2018).

Tight junctions vermitteln gemeinsam mit dem Stratum corneum die physikalische Barrierefunktion der Haut (Yokouchi und Kubo, 2018). Sie kommen beim Menschen und in der Maus nur in der 2. Schicht des Stratum granulosum vor (Furuse et al., 2002; Yoshida et al., 2013). Sie teilen die entsprechenden Zellmembranen in ein apikales und basolaterales Kompartiment (Shin et al., 2006) und beschränken Ionen- und Größen-spezifisch den parazellulären Austausch von Molekülen (Krug et al., 2014; Suzuki et al., 2014). Molekular sind sie aus Transmembranproteinen, die Claudine, Occludin und JAM-A umfassen, sowie intrazellulären Gerüstproteinen wie ZO–1 und Afadin aufgebaut und am Aktinzytoskelett bzw. an Mikrotubuli verankert (Van Itallie und Anderson, 2014). Tight junctions und Desmosomen in der Haut scheinen einer gemeinsamen bzw. gegenseitigen Regulation zu unterliegen. So weisen beispielsweise Desmoglein 1 (Dsg1)-defiziente Mäuse einen Barrieredefekt auf (Kugelmann et al., 2019a; Samuelov et al., 2013).

Dsg1 beeinflusst auch den Umsatz von Gap junctions in der Epidermis (Cohen-Barak et al., 2020). Hier werden u.a. Connexin 26 und 43 exprimiert, die vorwiegend im Stratum spinosum und Stratum granulosum zu finden sind (Garcia-Vega et al., 2021; Richard, 2000). Gap junctions tragen zur Gewebshomöostase, Wachstumskontrolle und synchroner Reaktion auf externe Reize bei (O'Shaughnessy et al., 2021; Richard, 2000).

Bei den Adhäsionskontakten weisen Adhärensjunktionen klassische Cadherine als transmembrane Adhäsionsmoleküle auf. Diese interagieren homo- und heterophil, u.a. auch mit desmosomalen Cadherinen, und sind Ca^{2+} -abhängig (Fuchs et al., 2022; Niessen und Gumbiner, 2002; Niessen et al., 2011; Shafraz et al., 2018), wobei in der Epidermis E-Cadherin (E-Cad) und P-Cadherin (P-Cad) exprimiert werden (Niessen, 2007; Samuelov et al., 2015). Auf cytoplasmatischer Seite interagieren klassische Cadherine mit den Armadilloproteinen p120^{ctn} und β -Catenin, wobei Letzteres über α -Catenin die Verbindung zum Aktinzytoskelett herstellt, die abhängig von mechanischer Belastung ist (Buckley et al., 2014; Nelson und Weis, 2016; Rubsam et al., 2018). Über diesen Komplex gibt es auch zahlreiche weitere Interaktionen beispielsweise zu Signalwegen und zytoskelettalen Verbindungsproteinen (Padmanabhan et al., 2015) wobei Adhärensjunktionen mechanische Signale aufnehmen und auf diese u.a. durch Modulation der Aktin-Myosin-Kontraktilität reagieren können (Mege und Ishiyama, 2017; Yap et al., 2018).

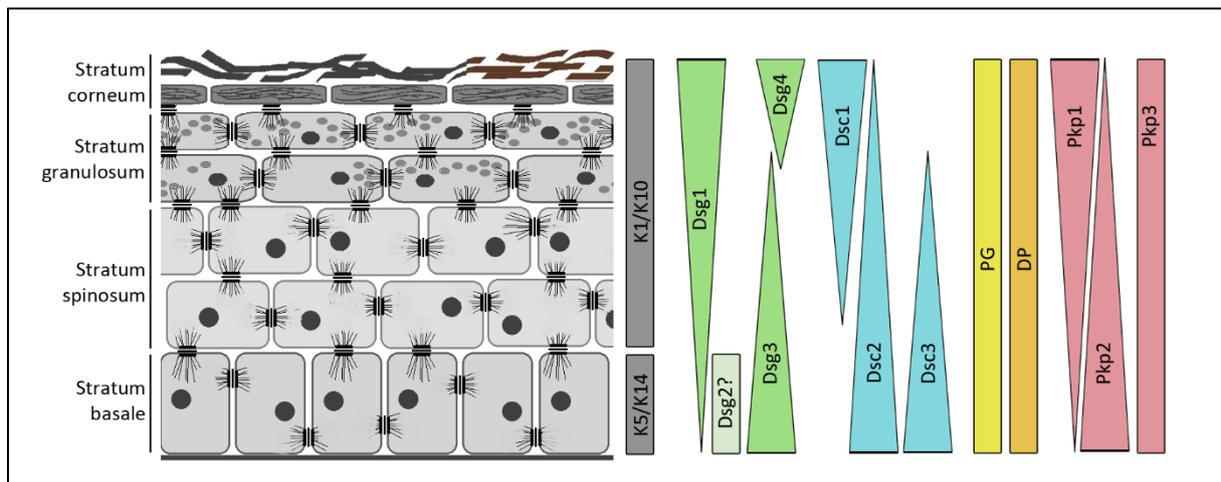


Abb. 1: Aufbau der Epidermis als mehrschichtig verhorntes Plattenepithel sowie Expressionsmuster desmosomaler Proteine

1.3. Desmosomen

Bei Desmosomen handelt es sich um supramolekulare Proteinkomplexe, die für fortwährend mechanisch beanspruchte Gewebe von besonderer Bedeutung sind (Hatzfeld et al., 2017; Kitajima, 2013; Kowalczyk und Green, 2013; Waschke, 2018). Sie kommen in einfachen und mehrschichtigen Epithelien sowie epithelialen Organen vor. Daneben sind sie auch im Herzen und weiteren nicht epithelialen Zellen, wie etwa in follikulär dendritischen Zellen des Lymphknotens, zu finden (Schafer et al., 1994; Waschke, 2008).

Auf molekularer Ebene bestehen Desmosomen aus verschiedenen Proteinfamilien: Desmosomale Cadherine gewährleisten mit ihren Extrazellulärdomänen (ECD) die starke interzelluläre Haftung und sind intrazellulär über verschiedene Plaqueproteine an das Intermediärfilamentzytoskelett verankert (Abb. 1, 2) (Delva et al., 2009; Hegazy et al., 2022). Desmosomen weisen eine für sie charakteristische Struktur auf, die insbesondere mittels Elektronenmikroskopie nachvollzogen werden kann. Hierbei kann die intrazelluläre Plaque in eine äußere (engl. „outer dense plaque“, kurz: ODP) und eine innere Plaque (engl. „inner dense plaque, kurz: IDP) gegliedert werden, die jeweils näher bzw. weiter intrazellulär bezogen auf die Plasmamembran liegen (Al-Amoudi und Frangakis, 2008). Die intrazellulären Domänen der desmosomalen Cadherine interagieren mit Proteinen der Armadillo-Familie, nämlich Plakoglobin (Pg) und den Plakophilinen (Pkp). Plakoglobin bindet mittels seiner zentralen „Armadillo-Repeat-Domains“ an den N-terminalen Teil des Plakins Desmoplakin (Dp), welches wiederum über seinen C-Terminus die Verankerung an Keratine gewährleistet (Al-Amoudi und Frangakis, 2008). Plakophiline weisen eine deutlich komplexere Assoziation zu weiteren desmosomalen Komponenten auf und interagieren direkt mit desmosomalen Cadherinen, Pg, dem N-Terminus von Dp sowie auch direkt mit Intermediärfilamenten. Ihnen wird hierdurch vor allem ein lateral stabilisierender Effekt für die desmosomale Plaque zugeschrieben (Bonne et al., 2003; Chen et al., 2002; Hatzfeld, 2007). Folglich wird die ODP hauptsächlich von Pg und Pkp gebildet und die IDP von Dp (Al-Amoudi et al., 2011). Die ODP

umfasst zwei elektronendichte Regionen, und zwar eine 4nm dicke Region mit einem Abstand von zirka 10nm von der Plasmamembran und eine 8nm dicke Region 20nm von der Plasmamembran entfernt. Fügt man immuno-elektronenmikroskopische Daten mit diesen Kryo-elektronenmikroskopischen Daten zusammen, so ergibt sich das es sich hierbei jeweils um die N- und C-Termini von Pkp bzw. Pg handelt (North et al., 1999). Im ODP sind zudem die zytoplasmatischen Domänen der desmosomalen Cadherine zu finden (Al-Amoudi et al., 2011). Interessanterweise zeigen die Cadherin-Moleküle eine Periodizität von ca. 7nm, die sich auch im desmosomalen Plaque widerspiegelt. So kann aus den Daten geschlossen werden, dass die Pg-Schicht die gleiche Anzahl an Proteinen enthält wie die dense midline, und damit Pg und Dp alternierend im Verhältnis 1:1, während in der Pkp-Schicht nur die Hälfte der Moleküle zu finden ist und damit die gleiche Anzahl wie die Cadherine, die von einer Zelle ausstrahlen (Al-Amoudi et al., 2011). Die Längsachse von Dp scheint dem restlichen Plaque in einem Winkel anzuliegen (Stahley et al., 2016a).

Obwohl Desmosomen bereits 1864 vom italienischen Pathologen Bizzozero erstmalig beschrieben wurden, ist ihre zellbiologische Bedeutung, die nach neueren Erkenntnissen weit über ihre simple Funktion bei der interzellulären Haftung hinausgeht, noch unzureichend verstanden (Calkins und Setzer, 2007; Hegazy et al., 2022). Einzelne Komponenten des Desmosoms sind in unterschiedlicher Weise in intrazelluläre Signalwege eingebunden und fungieren als Rezeptoren für wichtige biologische Prozesse (Hatzfeld et al., 2014; Huber und Petersen, 2015; Johnson et al., 2014; Spindler und Waschke, 2014; Waschke, 2018; Waschke und Spindler, 2014). Darüber hinaus regulieren sich Desmosomen und weitere Zell-Zell-Kontakte wechselseitig, was entscheidend zur Gewebeintegrität beiträgt (Green et al., 2019).

1.3.1. Desmosomenassemblierung

Die Assemblierung von Desmosomen stellt einen komplexen und noch nicht vollständig verstandenen Prozess dar. Dabei ist die Assemblierung stark mit der Bildung von Adhärensjunktionen (AJ) verwoben (Nekrasova und Green, 2013). Innerhalb von 5min nach einer Kalzium-Zugabe entstehen erste Zellkontakte zwischen Keratinozyten, die wahrscheinlich AJs darstellen. Desmosomen hingegen sind erst nach circa 2h nachweisbar (Kitajima, 2013). Zellen, die keine AJs ausbilden, da ihnen E- und P-Cadherin fehlt, bilden keine Desmosomen aus (Michels et al., 2009). Im Umkehrschluss sind AJs in Dp-KO Epidermis deutlich verändert, sodass von einem wechselseitigen Regulation der Junktionen bei deren Assemblierung ausgegangen werden kann (Vasioukhin et al., 2001). Aktuellere Daten deuten darauf hin, dass zunächst ein intermediärer Komplex mit E-Cadherin, β -Catenin und Pg gebildet wird, in welchem E-Cadherin und Dsg2 auch direkt miteinander interagieren und Src assoziiert ist (Rotzer et al., 2015a; Shafriz et al., 2018). Pg spielt durch seine zahlreichen Bindungsstellen für verschiedene desmosomale Cadherine bei der Desmosomenassemblierung eine Rolle (Trojanovsky et al., 1994a; Trojanovsky et al., 1994b). So bindet Pg dabei beispielsweise an phosphoryliertes Desmocollin 3 (Dsc3) (Aoyama et al., 2009). Darüber hinaus wurden für unterschiedliche desmosomale Cadherine, etwa Dsg2 und Dsc2, unterschiedliche Beteiligungen beschrieben, bei welchem Dsc2 durch homophile Ca^{2+} -

abhängige Interaktionen eine entscheidende Rolle spielt (Lowndes et al., 2014). Dp verändert seine Architektur während der Desmosomenassemblierung, indem sich der Plaque-zu-Plaque Abstand des C-Terminus verringert, was mit einem Verlust von E-Cadherin aus Dp-tragenden Zelladhäsionskontakten einhergeht und somit wahrscheinlich ein Zeichen von maturierenden Desmosomen darstellt (Beggs et al., 2022).

Desmosomale Cadherine werden über Mikrotubuli und spezifische Kinesine an die Zelloberfläche transportiert und dann in Desmosomen inkorporiert. Dieser Vorgang ist abhängig von „lipid rafts“ (Nekrasova et al., 2011; Stahley et al., 2014). Dabei handelt es sich um cholesterolreiche Membranabschnitte (Sezgin et al., 2017), für welche in einer aktuellen Studie auch vorgeschlagen wurde, zu desmosomalem Signaling sowie epidermaler Homöostase beizutragen (Zimmer und Kowalczyk, 2020). Für die Assoziation an lipid rafts sind die Transmembrandomänen der desmosomalen Cadherin entscheidend (Lewis et al., 2019).

Aber auch posttranslationale Modifikationen spielen eine Rolle. Hierbei wurden verschiedene Phosphorylierungen etwa von Dp und Dsg1 beschrieben (Pasdar et al., 1995a). Auch die Palmitoylation von Dsg2 wie auch von Pkp verstärkt die Desmosomenassemblierung (Roberts et al., 2014). Insgesamt spielen Pkp für die Assemblierung von Desmosomen eine wichtige Rolle. So erhöht Pkp3 Rap-1 abhängig die Assemblierung von Desmosomen sowie ihre Größe und Stabilität durch eine erhöhte Expression von Dsc2 (Gurjar et al., 2018; Todorovic et al., 2014). Auch Pkp2 reguliert die Assemblierung von Desmosomen als Gerüststruktur von PKC (Bass-Zubek et al., 2008), was wichtig ist für den Keratin-verankerten Pool von Dp (Godsel et al., 2005). Zusätzlich ist auch kortikales Aktin in Zusammenhang mit Aktin-bindenden Proteinen wie Adducin und RhoA für die Desmosomenassemblierung von Bedeutung (Godsel et al., 2010; Pasdar und Li, 1993; Rotzer et al., 2014).

1.3.2. Desmosomale Cadherine

Die Gruppe der desmosomalen Cadherine umfasst 3 Desmocollin (Dsc) und 4 Desmoglein (Dsg) Isoformen, die allesamt eine Zelltyp-spezifische sowie innerhalb von mehrschichtigen Geweben eine differenzierungsabhängige Expression aufweisen (Harmon und Green, 2013). Jedes Gen der Desmocolline codiert für ein Proteinpaar, aus welchem durch alternatives Splicing in eine längere „a“ und eine kürzere „b“ Form generiert werden, die sich in der Länge des C-terminalen Schwanzes unterscheiden. Dsg2 und Dsc2 werden in allen Desmosomen-tragenden Geweben exprimiert, während die anderen Vertreter auf mehrschichtige Epithelien beschränkt sind (Delva et al., 2009; Waschke, 2008). Die Expressionsmuster desmosomaler Cadherine in der Epidermis sind in Abb. 1 zusammengefasst. In der Konjunktiva finden sich Expressionsmuster vergleichbar der Epidermis (Vielmuth et al., 2016). Alle desmosomalen Cadherine sind auf Chromosom 18 codiert (Hunt et al., 1999). Die Bedeutung der unterschiedlichen Isoformen für die Regulation unterschiedlicher Signalwege sowie ihre jeweilige Bedeutung für die adhäsive Funktion der jeweiligen Zellen ist noch nicht vollständig verstanden. Jedoch ist klar, dass unterschiedliche Isoformen spezifische Funktionen durch Einbindung in einzelne Signalwege übernehmen (Cohen-Barak et al., 2020; Schmitt und Waschke, 2021).

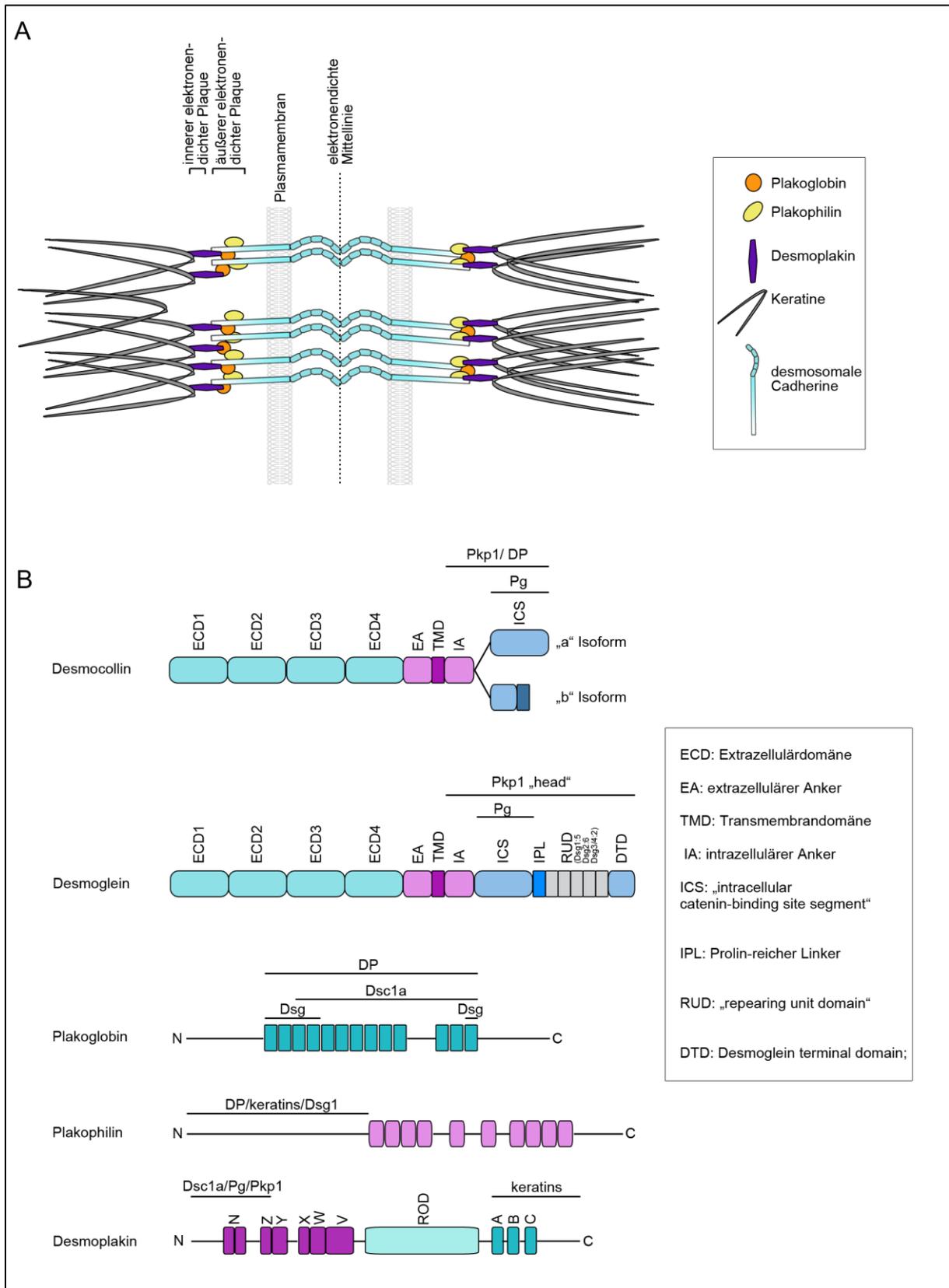


Abb. 2: Aufbau des Desmosoms in der Epidermis und seiner Komponenten, modifiziert nach (Hegazy et al., 2022; Mohammed und Chidgey, 2021)

A) Desmosomen sind aus Mitgliedern mehrerer Proteinfamilien aufgebaut. Desmosomale Cadherine, Desmogleine und Desmocolline, vermitteln eine starke Interaktion mit ihren Extrazellulärdomänen und sind intrazellulär an Plaqueproteine verankert. Dazu gehören Armadilloproteine, Plakoglobin und Plakophiline, sowie das Plakin Desmoplakin. Über diese findet eine Verankerung an das Intermediärfilamentzytoskelett statt, welches in der Epidermis aus Keratinen aufgebaut ist. B Molekularer Aufbau der desmosomalen Komponenten. Putative Interaktionsbereiche zu anderen desmosomalen Komponenten sind mittels Überstrich gekennzeichnet. B) Aufbau unterschiedlicher Komponenten des Desmosoms.

Desmosomalen Cadherinen ist gemeinsam, dass sie aus 5 Tandem-IgG-Domänen, einer transmembranen Helix und einer zytosolischen Domäne, die mit verschiedenen Proteinen interagieren kann, aufgebaut sind (Abb. 2B) (Owen und Stokes, 2010). Diese Interaktionen sind für die strukturellen und damit mechanischen Eigenschaften des Desmosoms entscheidend. Jede Extrazellulärdomäne besteht aus rund 110 Aminosäuren, die eine β -Sandwich-Struktur als Sekundärstruktur ausweisen. Ca^{2+} -Ionen sind an den Verbindungsstellen der ECDs über konservierten Sequenzmotiven zu finden, wo sie für die Rigidität des Proteins und damit einer gestreckten Konfiguration verantwortlich sind (Harrison et al., 2016; Sotomayor und Schulten, 2008). Im vollständig gestreckten Zustand ergibt sich daher eine gekrümmte Struktur mit einem Winkel von rund 100° zwischen der ECD1 und ECD5 (Boggon et al., 2002; Owen und Stokes, 2010). Mittels Fluoreszenzpolarisationsmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die Extrazellulärdomänen von Dsg3 geordnet in den Desmosomen der Zellmembran vorliegen und dies mit der adhäsiven Funktion, nicht jedoch mit Hyperadhäsion korreliert (Bartle et al., 2020; Bartle et al., 2017). Interessanterweise scheint Isoform-übergreifend zu gelten, dass die Extrazellulärdomänen desmosomaler Cadherine einen höheren Ordnungsgrad aufweisen als ihre Intrazellulärdomänen, was sich mit einem antiparallelen Interaktionsmuster, welches von Sikora et al. vorgeschlagen wurde, vereinbaren lässt (Dean und Mattheyses, 2022; Sikora et al., 2020).

Intrazellulär lassen sich die Domänen in einen intrazellulären Anker (IA) sowie eine intrazelluläre Catenin-Bindungssequenz (ICS) gliedern, wobei der kürzeren „b“ Form der Desmocolline die ICS Domäne fehlt (Abb. 2B). Diese ist jedoch entscheidend für die Bindung weiterer desmosomaler Bestandteile z.B. Plakoglobin (Choi et al., 2009). Darüber hinaus finden sich in der Intrazellulärdomäne von Desmogleinen eine Prolin-reiche Linkerdomäne (IPL), eine „repeat unit domain“ (RUD) und eine Glycin-reiche terminale Dsg-Domäne (DTD) (Abb. 2B). Die RUD-Abschnitte sind von einer variablen Anzahl sich wiederholender 29 Aminosäuren gegliedert. So besitzt Dsg1 z.B. 5 RUD, Dsg2 6 und Dsg3 2. Obgleich die Bedeutung dieser Domänen noch weitgehend unbekannt sind, gibt es Hinweise, dass sie wichtig für Signalwege sind und z.B. putativ mehrere PKC Phosphorylierungsstellen enthalten (Nilles et al., 1991).

Desmosomale Cadherine sind nicht nur in Desmosomen zu finden. Sie können auch extradesmosomal vorkommen, wo sie wahrscheinlich mit dem Aktinzytoskelett in Verbindung stehen und als Signalmoleküle zahlreiche Signalwege beeinflussen (Fuchs et al., 2023; Rotzer et al., 2015a; Tsang et al., 2012b; Waschke und Spindler, 2014)

1.3.3. Interaktionsmechanismen desmosomaler Cadherine

Der genaue Interaktionsmechanismus von desmosomalen Cadherine und deren Regulation ist noch nicht vollständig verstanden und seine Aufklärung stellt eines der Hauptziele unserer Arbeiten in den vergangenen Jahren dar. Einige Mechanismen können durch die strukturelle Ähnlichkeit zu klassischen Cadherinen abgeleitet und entsprechende Hypothesen aufgestellt werden.

Klassische Cadherine interagieren über „strand Dimers“ in welchen N-terminal ein „beta-strand exchange“ an der ECD1 Domäne stattfindet (Boggon et al., 2002). Diese Interaktion basiert auf einer Insertion einer hydrophoben Seitenkette eines Tryptophan-Residuums an Position 2 (Tryp2) in eine hydrophobe Tasche, die von der gegenüberliegenden ECD1 Domäne gebildet wird. Das Tryptophan an Position 2 sowie einige Residuen, die an der Bildung der hydrophoben Tasche beteiligt sind, z.B. Ala80, finden sich auch in desmosomalen Cadherinen sodass ein ähnlicher Interaktionsmechanismus konklusiv erscheint. Entsprechende Mutationen an Tryp2 führen zu einem Interaktionsverlust von Dsg2 (Lowndes et al., 2014; Schinner et al., 2022) und einer verminderten Ordnung im Extrazellulärraum für Dsg3 (Bartle et al., 2020).

Allen desmosomalen Cadherinen sind 5 Extrazellulärdomänen (ECD) gemeinsam. Diese sind für laterale cis-Interaktionen mit nebenliegenden desmosomalen Cadherinen ebenso verantwortlich wie für trans-Interaktionen mit ihren Gegenspielern auf den Nachbarzellen (Brasch et al., 2012; Delva et al., 2009; Owen und Stokes, 2010). Desmosomale Cadherine formen homo- und heterophile Interaktionen mit Proteinen der gegenüberliegenden Zellen (Dieding et al., 2017; Harrison et al., 2016; Heupel et al., 2008; Nie et al., 2011; Priest et al., 2019; Schlipp et al., 2014; Waschke et al., 2005). Der jeweilige Interaktionsmechanismus ist aber noch unzureichend erforscht und auch welche Interaktionen unter welchen biologischen Gegebenheiten bevorzugt werden, bleibt ein interessanter zu erforschender Aspekt. Darüber hinaus wurden gerade im Hinblick auf die Assemblierung von Junctionen, Interaktionen mit klassischen Cadherinen gefunden, darunter E-Cad was mit Dsg2 und Dsc3 interagiert (Shafraz et al., 2018; Shafraz et al., 2020).

Die Organisation der Proteine im Desmosom scheint in unterschiedlichen Zelllinien konserviert zu sein und war insbesondere in primären humanen Keratinozyten und HaCaTs (engl.: human low calcium elevated temperature cells, (Boukamp et al., 1988)) in einer Studie die dSTORM nutze gleich, sodass für die folgenden Einzelmolekülinteraktionsstudien auch HaCaTs als geeignet angesehen werden können (Stahley et al., 2016a).

1.3.4. Desmosomale Plaqueproteine

Die Vertreter der Armadilloproteine, Plakoglobin und Plakophiline dienen als desmosomale Plaqueproteine. Strukturell sind sie charakterisiert durch eine variable Anzahl von 42 Residuen-umfassenden „arm repeats“.

Plakoglobin (Pg) weist 12 zentrale „arm repeats“ auf, die von weniger organisierten N- und C-terminalen Endstücken flankiert werden (Abb. 2B) (Mohammed und Chidgey, 2021). Es bindet an die ICS der desmosomalen Cadherine; kann aber auch mit klassischen Cadherinen wie E-Cadherin interagieren (Korman et al., 1989; Vestweber und Kemler, 1984). Daher ist Pg sowohl in Desmosomen als auch in Adhärensjunktionen zu finden (Aktary et al., 2017; Cowin et al., 1986). Pg trägt entscheidend zur Assemblierung des desmosomalen Plaques und der Keratinfilamentverankerung bei (Acehan et al., 2008; Lewis et al., 1997; Palka und Green, 1997). Darüber hinaus existiert auch ein Cadherin-unabhängiger Pool, wobei die Pools unterschiedlich phosphoryliert werden und wahrscheinlich unterschiedliche zelluläre Funktionen erfüllen bzw. in zelluläre Signalkaskaden eingebunden sind (Aktary et al., 2017; Pashar et al., 1995b). So scheint insbesondere das extranukleäre Pg die Zelladhäsion über eine p38MAPK-abhängige Regulation der Keratinfilamentorganisation zu steuern (Spindler et al., 2014). Des Weiteren wurde in Kardiomyozyten gezeigt, dass eine PKA-abhängige Phosphorylierung von Pg an Ser665 zu einer verstärkten desmosomalen Adhäsion führt, die als positive Adhäsotropie bezeichnet wird (Schinner et al., 2017).

Plakophiline (Pkp) weisen strukturell zentrale „arm repeats“ auf, die durch weniger geordnete Abschnitte durchsetzt sind (Abb. 2B). So findet sich z.B. in Pkp1a eine Insertion zwischen den „arm repeats“ 5 und 6 (Choi und Weis, 2005). Diese weniger organisierten Abschnitte sowohl von Pg als auch der Pkp können wohl miteinander, aber auch mit desmosomalen Cadherinen und Dp interagieren (Mohammed und Chidgey, 2021).

Alle 3 Pkp-Isoformen existieren in 2 unterschiedlichen Splice-Varianten und weisen ein Gewebe-spezifisches Expressionsmuster auf (Hofmann, 2020). Während Pkp1 in seiner Expression auf verhornende und komplexe Epithelien sowie das Urothel beschränkt bleibt (Heid et al., 1994), kommt Pkp2 in allen Desmosomen-tragenden Geweben vor (Franke et al., 2009; Mertens et al., 1999; Rickelt et al., 2009). Pkp3 weist eine ähnlich breite Expression auf, wobei es in Hepatozyten und Kardiomyozyten nicht exprimiert wird (Schmidt et al., 1999). Auch Pkp-Isoformen spielen eine Rolle in der Desmosomenassemblierung und beeinflussen die Stabilität sowie die Struktur der gebildeten Desmosomen (Nekrasova und Green, 2013; Schmidt und Jager, 2005). Zusätzlich spielen sie eine Rolle bei der Ausbildung der Hyperadhäsion, auf die im Folgenden noch genauer eingegangen werden wird (Keil et al., 2016; Tucker et al., 2014). Neben ihrer adhäsiven Funktion sind sie in zahlreiche Signalkaskaden eingebunden, die Transkription, Proteinsynthese, Wachstum und Proliferation beeinflussen (Broussard et al., 2015; Hatzfeld et al., 2014). Insbesondere wurden Pkp-Isoformen u.a. mit RhoA-, PKC-, EGFR- und Src-Signaling in Verbindung gebracht, wobei sich jeweils ein direkter bzw. indirekter Bezug zu Pemphigus herstellen lässt (Bass-Zubek et al., 2008; Cirillo et al., 2014; Godsel et al., 2010; Hatzfeld et al., 2014; Keil et al., 2016; Neuber et al., 2015).

Desmoplakin (Dp) gehört zur Plakinfamilie und verbindet die Armadilloproteine mit dem Intermediärfilamentzytoskelett. Dp besteht aus einem N-terminalen Kopf aus wenig organisierten Abschnitten und strukturierten Plakin-Domänen, einer zentralen Rod-Domäne sowie einem C-terminalen Schwanz (Abb. 2B). Die Kopfdomäne interagiert mit Pg und Pkp (Mohammed und Chidgey, 2021). Die Rod-Domäne ermöglicht wohl eine Homodimerisierung. Die Schwanz-Domäne enthält 3 Plakin-repeat domains, ein Linkermodul sowie ein Glycin-

Serin-Arginin-reiche Motiv und vermittelt die Interaktion zu den Intermediärfilamenten (Abb. 2B). Das Glycin-Serin-Arginin-reiche Motiv erhält zahlreiche posttranslationale Modifikationen, die die Interaktion von Dp und IF regulieren (Albrecht et al., 2015).

1.3.5. Keratine in epidermaler Adhäsion

Desmosomen sind hauptsächlich am Intermediärfilamentzytoskelett verankert. Intermediärfilamente sind aneinander geknüpft, aber auch mit anderen Strukturen des Zytoskeletts sowie mit Desmosomen und Hemidesmosomen unter Verwendung von Intermediärfilament-assoziierten Proteinen (IFAPs) verbunden (Block et al., 2015). Intermediärfilamente sind eine große Proteinfamilie, deren Vertreter gewebespezifisch exprimiert werden und die besonders resistent gegen mechanische Belastung sind (Omary, 2009). Strukturell ist ihnen eine α -helikale rod Domäne mit ca. 310 Aminosäuren gemeinsam, die von non-helikalen Kopf- und Schwanzdomänen flankiert wird. Dabei formen Typ I Keratine (K9-28, K31-40) mit Typ II Keratinen (K1-8, K71-80, K81-86) Heterodimere, die sich zu antiparallelen Tetrameren zusammenlagern, sodass laterale und longitudinale Interaktionen möglich sind (Herrmann et al., 2009; Loschke et al., 2015b; Magin et al., 2007). Keratine durchspannen Keratinozyten als dichtes Netzwerk, wobei vorgeschlagen wurde, dass die Filamente zum einen wie Speichen vom Zellkern aus in die Peripherie strahlen und zum anderen als „Radkranz“ die Zellperipherie durchspannen, wo sie Desmosomen verbinden und hiermit die zwischenliegende Zellmembran stabilisieren (Quinlan et al., 2017). Sie vermitteln mechanische Stabilität und bestimmen die mechanischen Eigenschaften von Keratinozyten mit (Ramms et al., 2013).

In der Epidermis werden Keratine, ähnlich wie die desmosomalen Cadherine, differenzierungsspezifisch exprimiert. So finden sich K5/K14 in der Basalzellschicht, während K1/K10 in den oberflächlicheren Schichten vorkommen (Abb. 1) (Coulombe und Omary, 2002). Darüber hinaus werden in bestimmten biologischen Situationen, z.B. während der Wundheilung, weniger stabile Filamente wie K6, K16, K17 exprimiert (Mazzalupo et al., 2003), wobei das jeweilige Expressionsmuster durch die Aktivität von PKC reguliert wird und die desmosomale Adhäsion mitbestimmt (Loschke et al., 2015a). Durch die Sequestrierung von PKC z.B. durch Keratin5/14 spielen die Intermediärfilamente bei der Ausbildung der desmosomalen Hyperadhäsion eine wichtige Rolle (Buchau et al., 2022). Darüber hinaus verfügen Keratinfilamente über eine Vielzahl von Phosphorylierungsstellen von unterschiedlichen Kinasen, wie Akt, Erk1/2, PKC α und RhoA, von welchen sie reguliert werden (Loschke et al., 2015b). Auch weitere posttranslationale Modifikationen beeinflussen die Assemblierung und den Abbau von Keratinfilamenten sowie ihre Assoziationen zu Zelljunctionen und assoziierten Proteinen (Loschke et al., 2015b; Snider und Omary, 2014)

1.3.6. Desmosomale Hyperadhäsion

Eine wichtige Beobachtung im Hinblick auf die adhäsiven Eigenschaften von Desmosomen ist das Phänomen der Hyperadhäsion. Hierbei erreichen die Ca^{2+} -abhängig bindenden desmosomalen Cadherine einen Ca^{2+} -unabhängigen, stark adhäsiven Zustand, für den die elektronendichte Mittellinie im Desmosom als ultrastrukturelles Korrelat beschrieben wurde (Garrod, 2010). Es wurde vorgeschlagen, dass die elektronendichte Mittellinie durch Überlappung der ECD1 Domänen im hyperadhäsiven Zustand vermittelt wird (He et al., 2003; Shimizu et al., 2005) und eine geordnete periodische Organisation der desmosomalen Cadherine die Voraussetzung für die Ausbildung der desmosomale Hyperadhäsion ist (Al-Amoudi et al., 2007; Al-Amoudi et al., 2005; Garrod, 2013). Neuere Arbeiten widersprechen dem allerdings und zeigen keine erhöhte Ordnung unter hyperadhäsiven Bedingungen bzw. einen ähnlichen Ordnungsverlust unter Ca^{2+} -Chelation in beiden adhäsiven Zuständen, wohingegen der Proteinaustausch von desmosomalen Cadherinen wie auch desmosomalen Plaqueproteinen in hyperadhäsiven Desmosomen deutlich reduziert war (Bartle et al., 2020; Fulle et al., 2021).

Der hyperadhäsive Zustand gilt als physiologisch in gesunder humaner Epidermis (Garrod et al., 2005). Ein Wechsel zwischen Ca^{2+} -abhängigen und Ca^{2+} -unabhängigen Desmosomen ist entscheidend etwa unter Bedingungen der Wundheilung sowie der Migration von Keratinozyten (Garrod und Kimura, 2008; Garrod und Taberner, 2014; Wallis et al., 2000). Passend hierzu verlieren Desmosomen an Wundrändern die elektronendichte Mittellinie und die Zellen dort sind nicht hyper-adhäsiv (Garrod et al., 2005). Der Mechanismus der desmosomalen Hyperadhäsion ist noch unzureichend aufgeklärt. Die Gruppe von Garrod et al., die das Konzept der desmosomalen Hyperadhäsion wesentlich geprägt hat, schlägt vor, dass durch eine gesteigerte Ordnung der Extrazellulärdomänen der desmosomalen Cadherine, die Ca^{2+} -Ionen nicht oder nur noch schwer von den desmosomalen Cadherine durch Chelatoren wie EGTA entfernt werden können (Garrod und Kimura, 2008; Garrod et al., 2005). In der Cadherin-Kristallstruktur gibt es eine kleine β -Helix, die putativ in die cis-Interaktion eingebunden ist und ein Ca^{2+} einschließen kann, sodass es unter Umständen nicht mehr durch EGTA oder vergleichbare Agentien cheliert werden kann (Garrod et al., 2005).

Ebenso wie Desmosomen im Allgemeinen ist die desmosomale Hyperadhäsion ein fein regulierter Zustand. Die PKC-vermittelte Phosphorylierung von Dp an Ser2849 vermindert beispielsweise die Verankerung der Desmosomen am Zytoskelett und ist daher von Bedeutung in Situationen in welchen eine Reorganisation der Desmosomen erforderlich ist (Godsel et al., 2005; Wallis et al., 2000). Durch Überexpression einer phospho-defizienten Mutante von Dp an dieser Stelle (Dp-S2849G) kann dagegen Hyper-adhäsion herbeigeführt werden (Albrecht et al., 2015; Hobbs und Green, 2012). Hierzu passend regulieren Keratine Rack1-abhängig die PKC-vermittelte Dp Phosphorylierung und tragen entscheidend zur Ausbildung der desmosomalen Hyper-adhäsion bei (Buchau et al., 2022; Kroger et al., 2013; Loschke et al., 2015a). Auch eine Inhibition der PKC, die etwa durch Pkp1 vermittelt werden kann, ist förderlich für die Ausbildung der desmosomalen Hyperadhäsion (Keil et al., 2016; Tucker et al., 2014). Pkp1 trägt ebenfalls zur Hyperadhäsion bei und eine Überexpression versetzt Keratinozyten in den hyperadhäsiven Zustand, in welchem sich der Plaque-zu-Plaque-

Abstand des Dp C-Terminus, aber nicht N-Terminus verringert, wodurch klar wird, dass der flexible „Knick“ im Dp-Protein zu seiner Funktion beiträgt (Al-Jassar et al., 2011; Stahley et al., 2016b; Tucker et al., 2014).

1.4. Desmosomen-assoziierte Erkrankungen

Die klinische Bedeutung von Desmosomen wird durch zahlreiche Erkrankungen verdeutlicht, in welchen desmosomale Haftung kompromittiert wird. Dazu zählen infektiöse Erkrankungen wie das staphylogene Lyell-Syndrom (engl., SSSS, Staphylococcal scalded skin syndrome), bei welchem das Exfoliativtoxin von Dsg1 als Serinprotease die ECD von Dsg1 spaltet (Amagai et al., 2000) und Autoantikörper-vermittelte Erkrankungen wie Pemphigus vulgaris, foliaceus oder paraneoplastischer Pemphigus (Stahley und Kowalczyk, 2015). Hinzu kommen genetischen Mutationen in desmosomalen Proteinen, die zu verschiedenen Krankheitsbildern führen. Eine entsprechende Übersicht mit Beispielen gibt Abb.3.

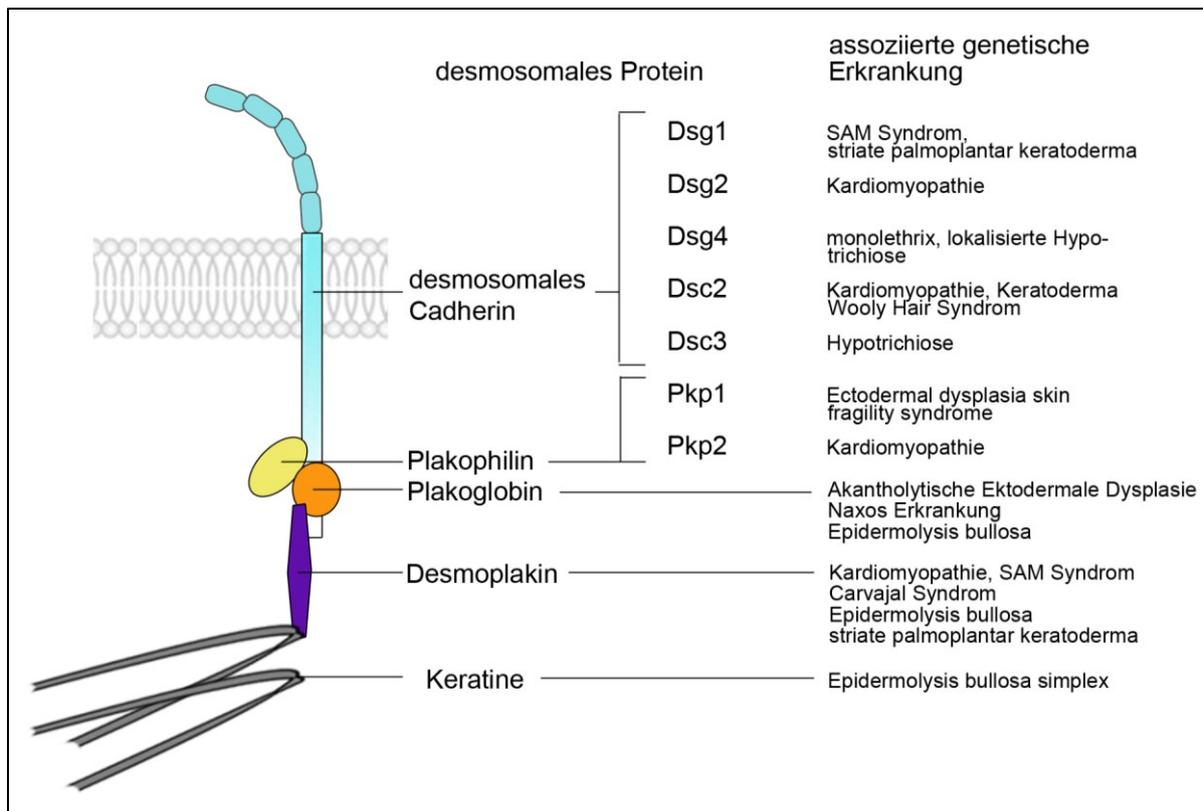


Abb. 3: desmosomale Erkrankungen durch Mutationen in desmosomalen Proteinen modifiziert von (McGrath et al., 1997; Omary, 2009)

Auch für Krebserkrankungen ist eine Assoziation zu unterschiedlichen Komponenten der Desmosomen beschrieben – mit allerdings zum Teil gegensätzlichen Befunden (Broussard et al., 2015). So wurde für Dsg2 und 3 eine Hochregulation in Lungen-, Prostata-, Kopf- und Hauttumoren gefunden, während für Dsg1-3 und Dsc2/3 eine Herunterregulation in Magen-, kolorektalen, Prostata-, Blasen, Brust- und Hauttumoren beschrieben wurden (Broussard et al., 2015; Chen et al., 2007; Dusek und Attardi, 2011). In Zusammenschau kann also sowohl

der Verlust desmosomaler Proteine als auch ihre Überexpression zu einem erhöhten Tumorgrading, gesteigerter Invasivität und Metastasierungswahrscheinlichkeit sowie einer schlechten Prognose beitragen (Huber und Petersen, 2015).

1.5. Pemphigus

1.5.1. Klinik, Diagnostik und Therapie

Bei Pemphigus handelt es sich um eine blasenbildende Autoimmundermatose, bei der es durch einen Verlust der desmosomalen Haftung von Keratinozyten zur Bildung schlaffer Blasen an Haut und Schleimhäuten kommt (Kasperkiewicz et al., 2017; Schmidt et al., 2019). Die Erkrankung wird hauptsächlich durch Autoantikörper gegen die desmosomalen Cadherine Dsg1 und 3 ausgelöst (Schmidt et al., 2019; Spindler et al., 2018). Des Weiteren wurden bei Patienten auch Antikörper gefunden, die gegen weitere Proteine gerichtet sind (Amber et al., 2018). Ihre Pathogenität ist noch nicht vollständig geklärt. Lediglich für aDsc3-Antikörper konnte die Pathogenität nachgewiesen werden (Hudemann et al., 2022; Rafei et al., 2011; Spindler et al., 2009). Die schmerzhaften Blasen verheilen schlecht und bergen auch in Abhängigkeit der Lokalisation das Risiko von Superinfektionen und Ernährungsproblemen (Kneisel und Hertl, 2011a; Kneisel und Hertl, 2011b).

Klinisch werden zwei Hauptformen voneinander unterschieden. Beim Pemphigus vulgaris (PV) führen Autoantikörper gegen Dsg3 zu Läsionen an der Mundschleimhaut. Diese betreffen bei zusätzlichem Auftreten von aDsg1-Antikörpern auch die Haut. Die Spaltbildung, die das histologische Korrelat der klinischen Blasenbildung darstellt, erfolgt bei PV suprabasal und das Auftreten von „tomb-stone“ (engl. für Grabstein) Zellen am Blasengrund (Joly et al., 2020) gilt als typisch (Kasperkiewicz et al., 2017; Ohata et al., 2014). Im Gegensatz dazu treten bei Pemphigus foliaceus (PF) nur Autoantikörper gegen Dsg1 auf und die Spaltbildung in der Haut tritt in oberflächlicheren Schichten auf (Kasperkiewicz et al., 2017; Schmidt et al., 2019; Spindler und Waschke, 2018). Hierbei ist PV mit rund 70% deutlich häufiger als PF. Allerdings gibt es bei letzterem endemische Formen in Brasilien, Kolumbien und Tunesien (Joly und Litrowski, 2011). Für die klinischen Erscheinungsbilder wurde vormals die sogenannte Desmoglein-Kompensationstheorie als Erklärung herangezogen. Demnach weisen PF-Patienten Blasen in superfiziellen Hautschichten auf, da dort viel Dsg1 aber nur wenig Dsg3 vorhanden ist. Umgekehrt kommt es bei ausschließlich vorhandenen aDsg3-Antikörpern zur Blasenbildung nur an der Mundschleimhaut, da dort im Gegensatz zur Haut Dsg1 kaum bzw. gar nicht vorhanden ist (Amagai et al., 2000; Mahoney et al., 1999). Allerdings kann die suprabasale Spaltbildung in der Haut bei PV-Patienten mit Dsg1 und 3 Antikörpern nur unzureichend erklärt werden (Spindler et al., 2011).

Bei Pemphigus handelt es sich um eine relativ seltene Autoimmunerkrankung mit einer populationsspezifischen Inzidenz zwischen 0,5 und 10 neuen Fällen/ 1 Million Personen

(Kneisel und Hertl, 2011a; Kneisel und Hertl, 2011b; Schmidt et al., 2019). Das mittlere Alter bei Ersterkrankung beträgt rund 45-65 Jahre und es gibt keine geschlechterspezifische Häufung. Für beide klinischen Formen, PF und PV, gibt es eine Assoziation zu anderen Autoimmunerkrankungen, zu Psoriasis sowie zu neurologischen und psychiatrischen Krankheitsbildern bis hin zu Tumorerkrankungen (Schmidt et al., 2019). Zudem wurden einige HLA-Allele als Erkrankungsrisiko herausgestellt, worunter die HLA Allele DRB1*04:02 und DQB1*05:03 besonders hervorzuheben sind (Pollmann et al., 2018). Auch eine veränderte Expression des Transkriptionsfaktors ST18, welches Signalwege wie Erk reguliert, geht mit einer erhöhten Prävalenz von PV einher (Vodo et al., 2018).

In der Diagnostik werden weiterhin gewebegebundene Antikörper in perilesionalen Stäben als Goldstandard betrachtet. Diese wird durch den Nachweis der gegen Antigene in der Epidermis gerichteten Autoantikörper in einer indirekten Immunofärbung am Affenösophagus sowie der ELISA zur Detektion von zirkulierenden aDsg1- und/ oder aDsg3-Antikörpern komplettiert (Beek et al., 2021; Schmitt und Waschke, 2021).

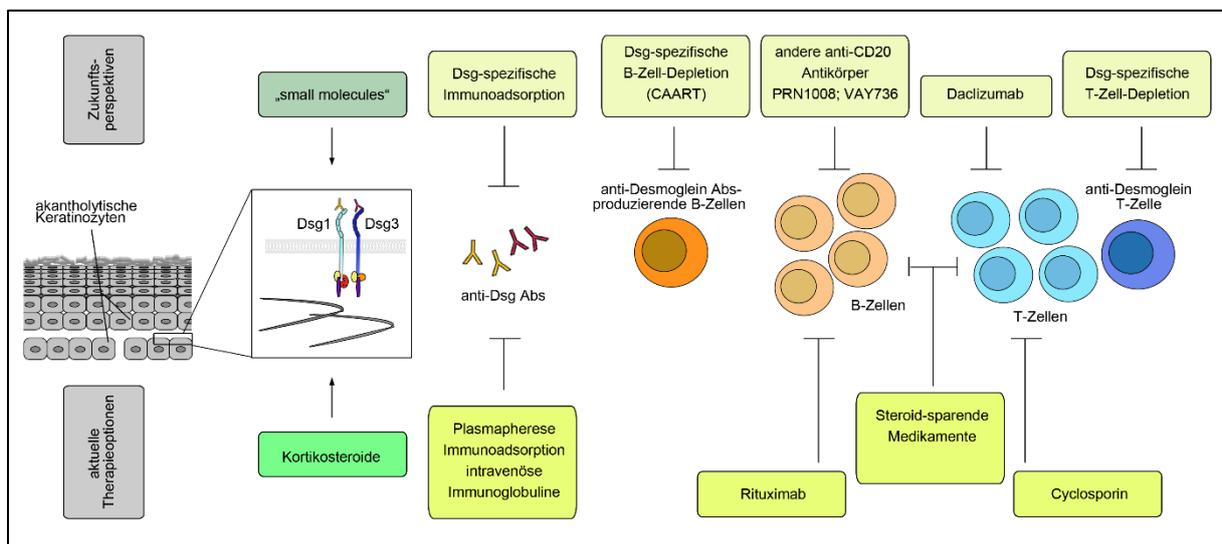


Abb. 4: Therapieoptionen bei Pemphigus

Abb. 4 gibt einen Überblick über aktuelle Therapieoptionen bei Pemphigus die im unteren Bereich der Abbildung und nach ihren Zielstrukturen geordnet, aufgelistet sind. Im oberen Bereich sind neuere Therapieansätze zusammenfassend gezeigt, die jedoch erst in der präklinischen Phase oder klinischen Erprobung sind.

Therapeutisch ist der anti-CD20 Antikörper Rituximab besonders hervorzuheben. Dieser kommt in Kombination mit Glukokortikoiden sowie Steroid-sparenden Medikamenten wie Azathioprin und Mycophenole zum Einsatz und hat die Therapie in den letzten Jahren deutlich effektiver und sicherer gemacht (Abb. 4). Bei therapieresistenten Verläufen kann zudem die Gabe von IVIGs sowie eine Immunoabsorption erwogen werden (Joly et al., 2020; Schmidt et al., 2020). Für Glukokortikoide konnte über den Stat3 Signalweg ein Zusammenhang zur Dsg3 Transkription und damit auch eine direkte Wirkung auf Keratinozyten nachgewiesen werden (Mao et al., 2017). Neben den klinisch bereits etablierten und eingesetzten Therapien gibt es

zahlreiche Ansätze für eine Verbesserung der Therapie, darunter Dsg-spezifische Immunoabsorption oder T-Zell-Depletion. Auch die B-Zell-Depletion über die CAART-Technologie sowie der Einsatz weiterer anti-CD20 Antikörper wird erwogen (Kasperkiewicz et al., 2017; Pollmann et al., 2018). Ansätze, die direkt die Keratinozytenhaftung modulieren und damit die Spanne zwischen akuter klinischer Phase mit Hochdosisglucokortikoiden und dem Einsatz der Wirkung spezifischer Immunsuppressiva schließen würden, fehlen allerdings bisher. Hierzu wollen wir durch unsere Forschung einen Beitrag leisten und Mechanismen identifizieren, auf welchen potentielle neue Therapiestrategien entwickelt werden können.

1.5.2. Pathogenese des Pemphigus

Die Mechanismen, die zum Zellhaftungsverlust bei Pemphigus beitragen, sind komplex und weiterhin nur unvollständig verstanden (Kasperkiewicz et al., 2017; Schmidt et al., 2019). Sie umfassen die direkte Inhibition von Dsg Interaktionen sowie die Dysregulation verschiedener Signalwege (Egu et al., 2022; Ishii et al., 2020; Spindler et al., 2018; Vielmuth et al., 2018a).

Der Zellhaftungsverlust wird entscheidend durch Autoantikörper vermittelt, die gegen die desmosomalen Cadherine Dsg1 und 3 gerichtet sind (Pan et al., 2011). Im Gegensatz zu vielen anderen Autoimmunerkrankungen sind die Antikörper alleine suffizient um den klinischen Phänotyp zu erzeugen (Amagai, 2010), sodass eine Immunoabsorption der Antikörper mittels Dsg1 und 3 Peptiden die pathogenen Effekte in verschiedenen Modellen verhindern kann (Amagai et al., 1992; Langenhan et al., 2014). Auch weitere Autoantikörper, die etwa gegen den muscarinergen Ach-Rezeptor oder TPO gerichtet sind, wurden beschrieben wobei ihrer Pathogenität umstritten bleibt (Amber et al., 2018; Grando, 2000; Seiffert-Sinha et al., 2018). Lediglich für anti-Dsc3-Antikörper konnte die Pathogenität *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden (Mao et al., 2010; Rafei et al., 2011; Spindler et al., 2009).

Als morphologische Korrelate des Zellhaftungsverlust lassen sich der Verlust von Dsg1 und Dsg3 von der Zellmembran, im Weiteren als Dsg-Depletion, sowie Veränderung im Keratinzytoskelett, häufig als Keratinretraktion bezeichnet, besonders hervorheben (Aoyama und Kitajima, 1999; Oktarina et al., 2011; Spindler et al., 2007; Spindler et al., 2011; Wilgram et al., 1961).

Die Dsg-Depletion basiert auf einer PV-IgG-induzierten vermehrten Endozytose von Dsg1 und Dsg3, die mit einer Verminderung des Oberflächenpools einhergeht (Aoyama und Kitajima, 1999; Calkins et al., 2006; Cirillo et al., 2007b; Jolly et al., 2010), da der internalisierte PV-IgG-Dsg3-Komplex ins endosomale und lysosomale Kompartiment transportiert wird (Calkins et al., 2006; Jennings et al., 2011). Sie betrifft zunächst den extradesmosomalen Pool und erst im Anschluss desmosomal verankerte Desmogleine (Aoyama und Kitajima, 1999; Jennings et al., 2011). Ultrastrukturell wird dies untermauert durch den Beginn der Akantholyse mit Lücken zwischen den Desmosomen, die als interdesmosomale Erweiterung bezeichnet werden (Hu et al., 1978; Takahashi et al., 1985). Die Endozytose ist hierbei Clathrin- und Dynamin-unabhängig (Delva et al., 2008; Zimmer und Kowalczyk, 2020). Stattdessen scheinen „lipid rafts“ wichtig hierfür (Resnik et al., 2011; Stahley et al., 2014). Dazu passend führt ein

Verlust von Flottilinen zu einer verminderten desmosomalen Haftung und einem Dsg3 Expressionsmuster, dass an einen PV-Phänotypen erinnert (Vollner et al., 2016). Als Modell wurde in diesem Zusammenhang die sogenannte „non-assembly-disassembly“ Theorie vorgeschlagen. Hierbei geht man davon aus, dass Pemphigus Autoantikörper mit dem Umsatz desmosomaler Cadherine interferieren und es somit zu einem Ungleichgewicht zwischen der Assemblierung und dem Abbau der Desmosomen zugunsten von Mechanismen kommt, die einen Abbau begünstigen (Kitajima, 2013; Otkarina et al., 2011). Hyperadhäsion wirkt sich, vielleicht auch durch eine Beeinflussung des desmosomalen Umsatzes, protektiv auf den Zellhaftungsverlust bei Pemphigus aus. Pkp1 spielt auch hierbei eine wichtige Rolle und eine Überexpression von Pkp1 ist daher protektiv gegen den PV-IgG-vermittelten Zellhaftungsverlust (Cirillo et al., 2010; Tucker et al., 2014).

Die Organisation von Dsg-Isoformen verändert sich durch Pemphigus Autoantikörper. In Pemphigus Patientenhaut wurde ein Clustering von Dsg1, Dsg3 und Pg nachgewiesen (Otkarina et al., 2011; van der Wier et al., 2014). Hierbei scheint das Clustering das strukturelle Korrelat der Dsg3-Depletion zu sein (Saito et al., 2012). In Übereinstimmung konnten in elektronenmikroskopischen Studien gezeigt werden, dass die Desmosomengröße in PV Haut wie auch in einem humanen *ex vivo* Pemphigus Hautmodell reduziert ist, wenn aDsg1-Antikörper vorhanden sind (Otkarina et al., 2011; Sokol et al., 2015; Stahley et al., 2016b; van der Wier et al., 2014). Manche Studien deuten *in vitro* eine laterale Aggregation gefolgt von einer Internalisierung von Dsg3 an, was zeigt dass Clustering von desmosomalen Cadherinen die Desmosomendynamik verändert (Sato et al., 2000). Auch das Auftreten von gedoppelten Membranstrukturen mit Desmosomen mit verringerter Größe wurde als Korrelat der Dsg3-Depletion vorgeschlagen (Sokol et al., 2015; van der Wier et al., 2012).

Ein weiteres histologisches Korrelat in PV und PF Läsionen ist die Desorganisation sowie die Retraktion des Keratin Zytoskeletts (Wilgram et al., 1961). Hierbei kommt es zu einer Loslösung der Keratinfilamente von Desmosomen (Diercks et al., 2009; Sokol et al., 2015) sowie eine perinukleäre Konzentration der Filamente (Cirillo et al., 2007a; Schlogl et al., 2018). Die Depletion der Dsg-Isoformen sowie die Retraktion der Keratinfilamente tragen beide zum Zellhaftungsverlust bei.

Das Konzept, dass die Autoantikörper sterisch oder allosterisch die Trans-Interaktionen von Dsg1 und 3 hemmen, wurde von Forschungsergebnissen unterstützt, die zeigen, dass die pathogenen Autoantikörper insbesondere die ECD1 und 2 Domäne von Dsg1 und 3 binden die als notwendig für die trans-Interaktionen angesehen werden (Al-Amoudi et al., 2007; Di Zenzo et al., 2012; Sekiguchi et al., 2001; Tsunoda et al., 2003). Allerdings wurde auch nachgewiesen, dass Pemphigus Patienten auch Autoantikörper gegen weitere extrazellulären Regionen als die ECD1 und 2 generieren (Sekiguchi et al., 2001) und auch Antikörper die den membranproximalen Teil der Dsg3-ECD binden pathogen sind (Hudemann et al., 2023; Schmitt et al., 2023). Zudem konnte in zell-freien AFM-Studien mit verschiedenen IgG-Fraktionen von PV- und PF-Patienten gezeigt werden, dass für Dsg3 nicht aber für Dsg1 eine direkte Inhibition der Interaktionen durch die Autoantikörper ausgelöst wird (Heupel et al., 2008; Spindler et al., 2009; Vielmuth et al., 2018a; Waschke et al., 2005). Aktuelle Daten zeigen hingegen in einem Bead-basierten Versuchsansatz, dass Pemphigus-Autoantikörper vor allem heterophile Interaktionen von Dsg1 und Dsc1 bzw. Dsg3 und Dsc3 behindern (Ishii et al., 2020).

Es bleibt also strittig welche homo- und heterophilen Interaktionen von Dsg1 und 3 tatsächlich in Keratinozyten und insbesondere in humaner Haut eingegangen werden und ob es hier Unterschiede im Hinblick auf den Interaktionstyp je nach biologischer Situation gibt (Schmitt und Waschke, 2021; Vielmuth et al., 2018a).

Als alleinige Erklärung für den Zellhaftungsverlust reicht die Theorie der direkten Inhibition allerdings schon deswegen nicht aus, weil aDsg1-Autoantikörper pathogen sind, ohne mit der Dsg1-trans-Interaktion zu interferieren (Waschke et al., 2005). Eine weitere Studie zeigte zudem, dass PV Autoantikörper keinen effektiven Pemphigus Phänotyp bei 4°C auslösen können, was demonstriert, dass zelluläre Prozesse für den Zellhaftungsverlust notwendig sind (Calkins et al., 2006).

Passend hierzu wurden zahlreiche Signalwege identifiziert, die bei der Pemphigus-Pathogenese eine entscheidende Rolle spielen, darunter *Ras homolog family member A* (RhoA), *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR); Proteinkinase C (PKC), *Extracellular Signal-regulated Kinase* (Erk) und die Tyrosinkinase Src (Sajda und Sinha, 2018; Spindler et al., 2018). Sie regulieren die PV-IgG-vermittelte Keratinretraktion wie auch die Dsg-Depletion. Hervorzuheben gilt, dass die Signalwege von spezifischen Autoantikörpern aktiviert werden und Signalmoleküle direkt mit Dsg-Isoformen assoziiert sind und somit Signalkomplexe bilden (Schmitt und Waschke, 2021). Auch wurden für Dsg3 unterschiedliche Signalwegsregulationen nachgewiesen in Abhängigkeit an welches Epitop der ECD der Antikörper bindet (Schmitt et al., 2023). Außerdem unterscheiden sich Isoform-spezifisch teilweise die assoziierten Signalmoleküle. So sind *p38 mitogen-aktivierte Kinase* (p38MAPK), PKC und Phospholipase C (PLC) sowohl mit Dsg1 als auch mit Dsg3 assoziiert, während die Phosphatidylinositol 4-kinase beta (PI4K) z.B. nur mit Dsg1 assoziiert ist (Schmitt et al., 2021). Dies hat auch Auswirkungen auf das Signaling nach Bindung von Pemphigus Autoantikörpern. PLC Aktivierung und Ca^{2+} -Einstrom sowie Erk Aktivierung sind beispielsweise nur bei Bindung von aDsg1-Antikörpern nachweisbar. Im Gegensatz dazu scheint eine Src-abhängige EGFR Aktivierung nur beim Vorliegen von aDsg3-Antikörpern aufzutreten (Schmitt und Waschke, 2021; Walter et al., 2017; Walter et al., 2019). Die Inhibition von PKC durch das Adapterproteine Rack-1 vermindert eine Phosphorylierung von Dp, was Dsg3 im Desmosom stabilisiert und in Abhängigkeit von Pkp1 zur desmosomalen Hyperadhäsion beiträgt. Beide Mechanismen wirken dem PV-IgG-induziertem Haftungsverlust entgegen (Dehner et al., 2014; Tucker et al., 2014).

Als zentral kann darüber hinaus die p38MAPK angesehen werden (Mavropoulos et al., 2013). Pemphigus Autoantikörper führen zu einer raschen Aktivierung von p38MAPK in Keratinozyten und im Mausmodell, während umgekehrt eine Inhibition dieser Aktivierung in beiden Modellen protektiv gegen den Autoantikörper-vermittelten Haftungsverlust ist (Berkowitz et al., 2008a; Berkowitz et al., 2005; Berkowitz et al., 2006). Darüber hinaus konnte die Aktivierung auch in Haut von PF- und PV-Patienten nachgewiesen werden (Berkowitz et al., 2008b). In Übereinstimmung zeigt eine weitere Studie, dass sowohl gegen Dsg1 also auch gegen Dsg3 gerichtete Autoantikörper zu einer Aktivierung von p38MAPK führen (Walter et al., 2017). Mechanistisch trägt die Aktivierung der p38MAPK sowohl zu den nach Pemphigus Autoantikörpern typischen Veränderungen am Keratinytoskelett als auch zur Depletion von Dsg3 von der Zellmembran bei (Berkowitz et al., 2005; Jolly et al., 2010; Spindler et al., 2013).

Interessanterweise führt eine Stabilisierung von Dsg3 Interaktionen durch ein quervernetzendes Peptid zur einer Verhinderung der PV-IgG-induzierten p38MAPK Aktivierung, was zeigt, dass intrazelluläre Signalwege durch direkte Inhibition getriggert werden können (Spindler et al., 2013) und somit beide Mechanismen – direkte Inhibition und die Dysregulation von Signalwegen ineinander greifen, wobei ihre jeweilige Wichtigkeit noch nicht vollständig verstanden ist.

Für viele der beschriebenen Signalwege gilt, dass diese nach PV-IgG-Bindung aktiviert werden und dann zum Zellhaftungsverlust beitragen, sodass im Umkehrschluss eine Inhibition der spezifischen Signalkaskade protektiv gegen den PV-IgG-vermittelten Zellhaftungsverlust *in vitro* und teils auch *in vivo* wirkt (Burmester et al., 2020; Schmidt et al., 2017; Spindler et al., 2018). Im Unterschied dazu, scheint cAMP ein insuffizienter zellulärer Rettungsmechanismus zu sein. Obgleich es nach PV-IgG-Inkubation auch zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel kommt, ist hier eine pharmakologische Augmentation der Signalkaskade protektiv *in vitro* und *in vivo* und blockiert etwa die Aktivierung von p38MAPK sowie in hohen Dosen die Dsg3 Depletion (Spindler et al., 2010). Obgleich der klinische Nutzen einer Pemphigus-Therapie, die direkt am Zellhaftungsverlust der Keratinozyten ansetzt, unbestritten ist, sind viele Mediatoren für die Behandlung von Patienten aufgrund des Nebenwirkungsprofils als ungünstig zu betrachten (Burmester et al., 2020). Das Finden entsprechender therapeutischer Zielmoleküle und nebenwirkungsarmer Substanzen ist daher ein wichtiges Ziel in der Pemphigus-Forschung.

1.6. Rasterkraftmikroskopie zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften desmosomaler Cadherine

1.6.1. Grundlagen

Zur Untersuchung der Regulation der desmosomalen Adhäsion und des Zellhaftungsverlustes bei Pemphigus werden eine Vielzahl von Methoden eingesetzt, darunter Adhäsionsexperimente, molekularbiologische, biochemische und immunologische Versuchsansätze sowie verschiedene Tiermodelle und *ex vivo* Modelle (Pollmann und Eming, 2017; Spindler et al., 2018; van der Wier et al., 2010).

Für einige Fragestellungen ist allerdings ein molekularer Ansatz wie die Rasterkraftmikroskopie (engl.: „atomic force microscopy“, kurz: AFM) sinnvoll um die Bindungseigenschaften desmosomaler Cadherine auf Einzelmolekülebene zu untersuchen. AFM-Messungen erlauben es neue Einblicke in die biophysikalischen Eigenschaften desmosomaler Cadherine und ihrer Interaktionsmechanismen sowie deren Bedeutung für die Zell-Zell-Haftung unter verschiedenen biologischen Bedingungen zu gewinnen (Vielmuth et al., 2018a; Yang et al., 2018). Insbesondere die geringe Einzelmolekülinteraktionskraft der desmosomalen Cadherine, die sich etwa im Bereich zwischen 20 und 200pN einordnen lassen, unterstreichen die Bedeutung der Rasterkraftmikroskopie im Vergleich zu optischen und

magnetischen Pinzetten (Neuman und Nagy, 2008). Weiterhin erlaubt die Rasterkraftmikroskopie eine Untersuchung der Topographie sowie der Einzelmolekülbindungseigenschaften unter nahezu physiologischen Bedingungen (Allison et al., 2010; Li et al., 2017; Parot et al., 2007). Auch dynamische Prozesse wie etwa morphologische Veränderungen der Zellen können untersucht werden (Allison et al., 2010).

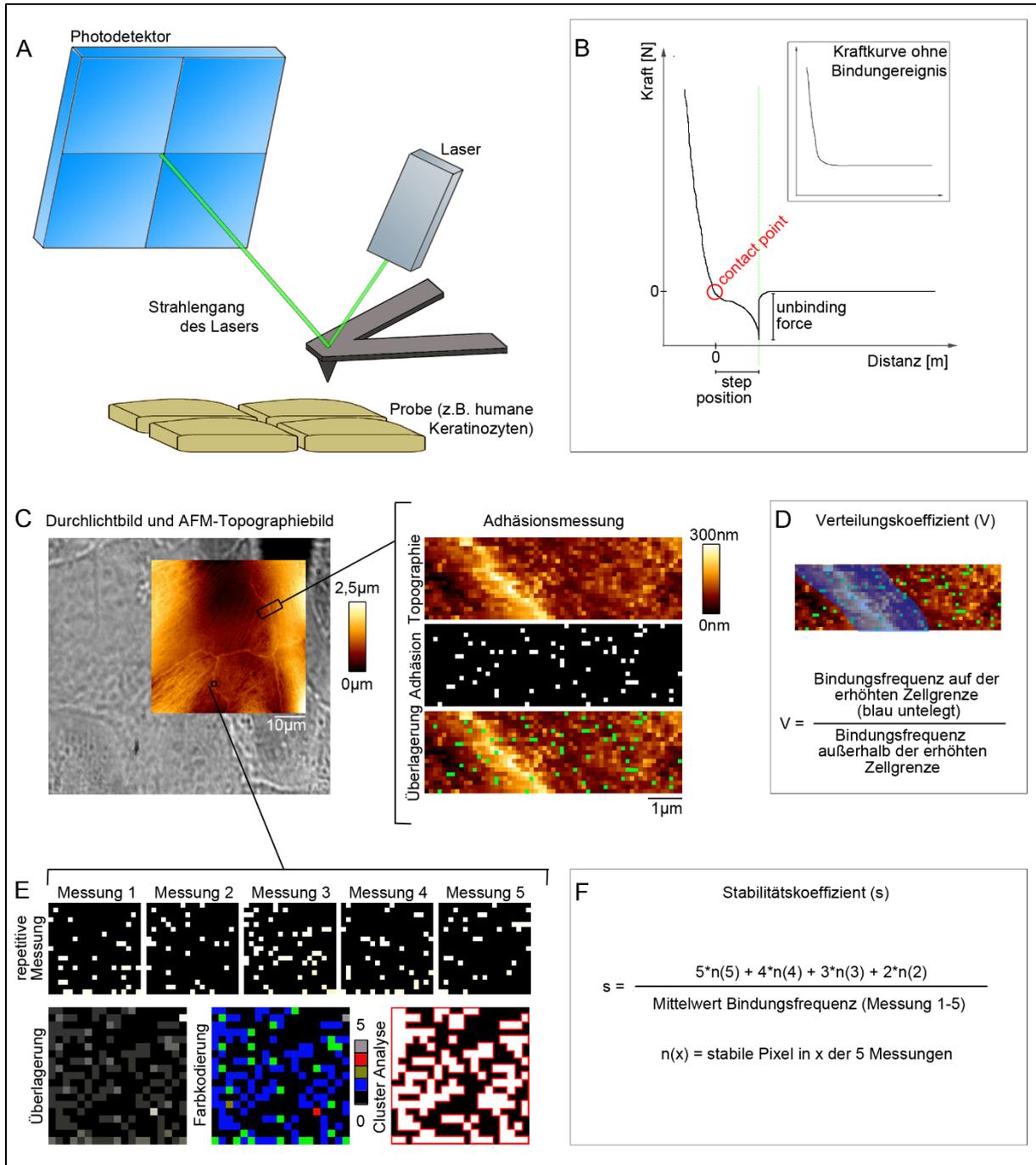


Abb. 5: Versuchsaufbau Rasterkraftmikroskopie und Messstrategien zur Untersuchung der Einzelmolekülbindungseigenschaften desmosomaler Cadherine

A: Versuchsaufbau einer Rasterkraftmikroskopiemessung; B: Die Kraft-Distanz-Kurve ist das Messergebnis jedes Messzyklus und ermöglicht eine Unterscheidung von Kurven mit und ohne spezifischen Bindungsereignissen. Hieraus kann die Bindungskraft (engl.: unbinding force), die Position

des Abrissereignisses (engl.: step position, Messgröße für die Zytoskelettverankerung (Sariisik et al., 2015)) sowie die Höhe der Probe an der jeweiligen Stelle (über den Kontaktpunkt, engl.: contact point) und die Elastizität der Probe bestimmt werden. C: Überlagerung Durchlicht- und AFM-Topographiebild hier exemplarisch an murinen Keratinozyten. In allen AFM-Bildern entspricht jeder Pixel einer Kraft-Distanz-Kurve. Ein kleines Areal an der Zellgrenze wird für Adhäsionsmessungen ausgewählt. Jeder weiße Pixel im Adhäsionspanel entspricht einem spezifischen Bindungsereignis. Aus diesen Messungen lässt sich die Bindungsfrequenz, sowie die Kraftverteilung und Zytoskelettverankerung detektieren. D: Anhand der Überlagerung von Adhäsion und Topographie kann die Verteilung zwischen den Bindungsereignissen zwischen Arealen direkt auf der Zellgrenze (bei murinen Keratinozyten als erhöhte Struktur erkennbar) und daneben detektiert und damit unterschiedliche Verteilungen bzw. Umverteilungen spezifischer Dsg-Bindungsereignisse charakterisiert werden. E: Durch 5 repetitive Messungen an einem kleinen Areal auf einer Zellgrenze mit anschließender Überlagerung können „stabile“ von „mobilen“ Dsg Clustern unterschieden werden und es kann deren Größe im Rahmen einer Cluster Analyse bestimmt werden. F: Anhand eines Stabilitätskoeffizienten kann die Mobilität der desmosomalen Cadherinen auf der Zelloberfläche bestimmt werden.

AFM ist eine nicht-optische Mikroskopiermethode zur Darstellung der Oberflächentopographie verschiedenster Materialien. Die Methode basiert auf der Messung der Auslenkung eines flexiblen Cantilever mit einer scharfer Spitze bei Kontakt mit der Messoberfläche, dessen Bewegungen durch ein sehr akkurates Piezoelement gesteuert und deren Auslenkung durch einen auf ihn gerichteten Laserstrahl detektiert werden können (Abb. 5A). Zusätzlich zu Informationen über die Oberflächentopographie der Probe können auch ihre biophysikalischen Eigenschaften wie Steifigkeit und Elastizität detektiert werden sowie durch Funktionalisierung der Messspitzen mit rekombinanten Proteinen Interaktionen zu Proteinen der Probe (Dufrene et al., 2017; Dufrene und Hinterdorfer, 2008; Dufrene et al., 2013; Garcia-Saez und Schwille, 2007; Puchner und Gaub, 2009; Zlatanova et al., 2000). Hierzu werden Kraftkurven aufgezeichnet, aus welchen die Anzahl sowie die Verteilung der Bindungen aufgezeigt sowie Bindungs-Parameter die Bindungsstärke und die Position des Abrissereignisses, welche Rückschlüsse auf die Verankerung an das zelluläre Zytoskelett zulässt (Sariisik et al., 2015), abgeleitet werden (Muller et al., 2006; Zlatanova et al., 2000) (Abb. 5B). Zudem kann die Lebenszeit der Bindung errechnet werden (Bell, 1978; Evans, 1998).

1.6.2. Methodische Weiterentwicklung zur Charakterisierung desmosomaler Adhäsion auf Keratinozyten

In Bezug auf desmosomale Haftung und insbesondere die Bindungseigenschaften desmosomaler Cadherine wurden in der Vergangenheit vor allem zell-freie AFM-Experimente durchgeführt. In diesem reduktionistischen Ansatz sind die potentiellen Bindungspartner an AFM-Spitze und funktionalisierter Messoberfläche (Mica-Sheet) genau definiert (Wagner, 1998). Mit diesem Ansatz kann nun auf Einzelmolekülebene untersucht werden, ob die potentiellen Bindungspartner Interaktionen untereinander eingehen und welche

Bindungseigenschaften die Interaktion etwa im Hinblick auf Bindungsstärke, Ca^{2+} -Abhängigkeit und Dissoziationskonstante (k_{off}) aufweisen.

Allerdings sind Desmosomen komplex aufgebaut und reguliert. Zudem existieren in Keratinozyten mehrere Isoformen desmosomaler Cadherine nebeneinander. Auch ist bekannt, dass sowohl der Aufbau des desmosomalen Plaques als auch die Verankerung an das Zytoskelett entscheidend zur Aufrechterhaltung der interzellulären Haftung durch Desmosomen beitragen. Darüber hinaus greifen zahlreiche Signalwege in die Regulation der desmosomalen Haftung ein. Es war daher naheliegend, dass auch die Einzelmolekülbindungseigenschaften von all diesen Faktoren abhängig sind. Diese Fragestellungen lassen sich allerdings nur auf lebenden Keratinozyten beantworten, da nur hier die Beschaffenheit des desmosomalen Plaques, die Verankerung der zu messenden Moleküle sowie die entsprechenden Signalwege moduliert und damit untersucht werden können.

Hierzu seien hier einige Überlegungen zu den über die Studien genutzten Messprinzipien sowie den wichtigsten biophysikalischen Messgrößen beschrieben.

Für die Messungen wurden ein Nanowizard III bzw. IV AFM (Bruker JPK BioAFM, Berlin, Deutschland) in Verbindung mit invertierten optischen Mikroskopen (Carl Zeiss, Jena, Deutschland bzw. IX73 Olympus, Hamburg, Deutschland) verwendet. Dadurch ist es möglich ein optisches Bild (Durchlicht/ Fluoreszenz) mit dem AFM-Bild zu überlagern und so Informationen über die Messlokalisierung des AFMs zu generieren (Abb. 5C).

Hierbei stellte sich heraus, dass sich die Morphologie der Zellgrenzen von Keratinozyten zwischen humanen und murinen Zellkulturen unterscheidet. Während HaCaT (Boukamp et al., 1988) humane Keratinozyten über filamentäre Ausläufer verfügen, die den Interzellularspalt überspannen (Vielmuth et al., 2015a; Vielmuth et al., 2015b), zeigen sich die Zellgrenzen bei murinen Keratinozyten als erhöhte Strukturen an den Interzellularspalten (Vielmuth et al., 2018b; Vielmuth et al., 2018c).

Für Adhäsionsmessungen wurden kleine Areale entlang der jeweiligen Zellgrenzen ausgewählt und mittels eines spezifischen Adhäsions-Messmodus (Force Mapping Mode, JPK) gemessen. Dabei entspricht jeder Pixel einer Kraft-Distanz-Kurve und spezifische Einzelmolekülbindungsereignisse können detektiert werden (Abb. 5C). Hieraus lassen sich Aussagen über die Bindungsfrequenz und damit über die Anzahl der möglichen Interaktionspartner des auf der Messspitze immobilisierten Haftproteins auf der Zelloberfläche treffen und auch die Blockierbarkeit der Bindung durch Antikörper untersuchen.

Weiterhin können physiologische Prozesse in der Zelle wie auch pathologische Prozesse wie etwa die Inkubation mit PV-IgGs zu einer Umverteilung der Moleküle an der Zellgrenze führen. Diese Umverteilung lässt sich mit Hilfe eines Verteilungskoeffizienten, der wie in Abb. 5D beschrieben wird, beschreiben und charakterisieren.

Ein weiteres wichtiges Charakteristikum desmosomaler Proteine ist ihr Vorkommen in Clustern, die auch ihre Mobilität in der Membran mitbestimmen (Fulle et al., 2021; Wanuske et al., 2021). Um dieses zu untersuchen wurden gut etablierte Methoden wie membranimpermeables Quervernetzen (Nie et al., 2011) und FRAP- (engl.: Fluorescence recovery after photobleaching) Experimente zusammen mit STED- (engl.: Stimulated Emission Depletion) Mikroskopie und AFM-Messungen verwendet.

Um mittels AFM die Mobilität und die Cluster einer Dsg-Isoform auf der Zelloberfläche zu detektieren, wurden repetitive Messungen entlang kleiner Areale auf den Zellgrenzen durchgeführt. Die Adhäsionskarten der Einzelmessungen wurden hiernach übereinandergelegt, um Cluster zu visualisieren und die Stabilität bzw. Mobilität der Pixel zu erfassen (Abb. 5E). Hieraus lässt sich die Clustergröße bestimmen und mittels eines hierfür entwickelten Stabilitätskoeffizienten (Abb. 5F) die Mobilität.

Für manche Fragestellungen wurde mit 2 unterschiedlich funktionalisierten Spitzen die gleichen Zellareale gemessen, um die spezifische Wirkung eines Antikörpers oder Signalwegs auf ein bestimmtes desmosomales Cadherin zeigen zu können (Vielmuth et al., 2018b).

Mit diesen Messerweiterungen können nun dynamische Prozesse an desmosomalen Cadherinen und ihren Bindungseigenschaften bei Modulation von Signalwegen oder unter pathogenen Bedingungen bei Pemphigus auf Einzelmolekülinteraktionsebene charakterisiert werden.

2. Fragestellung des Habilitationsprojektes

Das Habilitationsprojekt beschäftigt sich mit der Regulation der desmosomalen Haftung, insbesondere im Hinblick auf die Einzelmolekülbindungseigenschaften desmosomaler Cadherine sowie deren Regulation durch assoziierte Proteine (wie desmosomale Plaqueproteine und Zytoskelettproteine) und Signalwege. Die Untersuchungen haben auch einen klaren klinischen Bezug zu Erkrankungen, in welchen die desmosomale Haftung etwa durch Autoantikörper oder genetischen Veränderungen in ihrer Funktion verändert und eingeschränkt werden. Die Ergebnisse sind daher auch von klinischer Relevanz. Sie sollen dazu beitragen die Regulation der desmosomalen Haftung insbesondere in der Haut genauer zu verstehen und neue Erkenntnisse über die Interaktionsmechanismen desmosomaler Cadherine unter bestimmten biologischen Voraussetzungen liefern. Die Ergebnisse sollen darüber hinaus dazu beitragen gerichtete Therapieansätze für die o.g. Erkrankungen, insbesondere Pemphigus vulgaris, zu entwickeln.

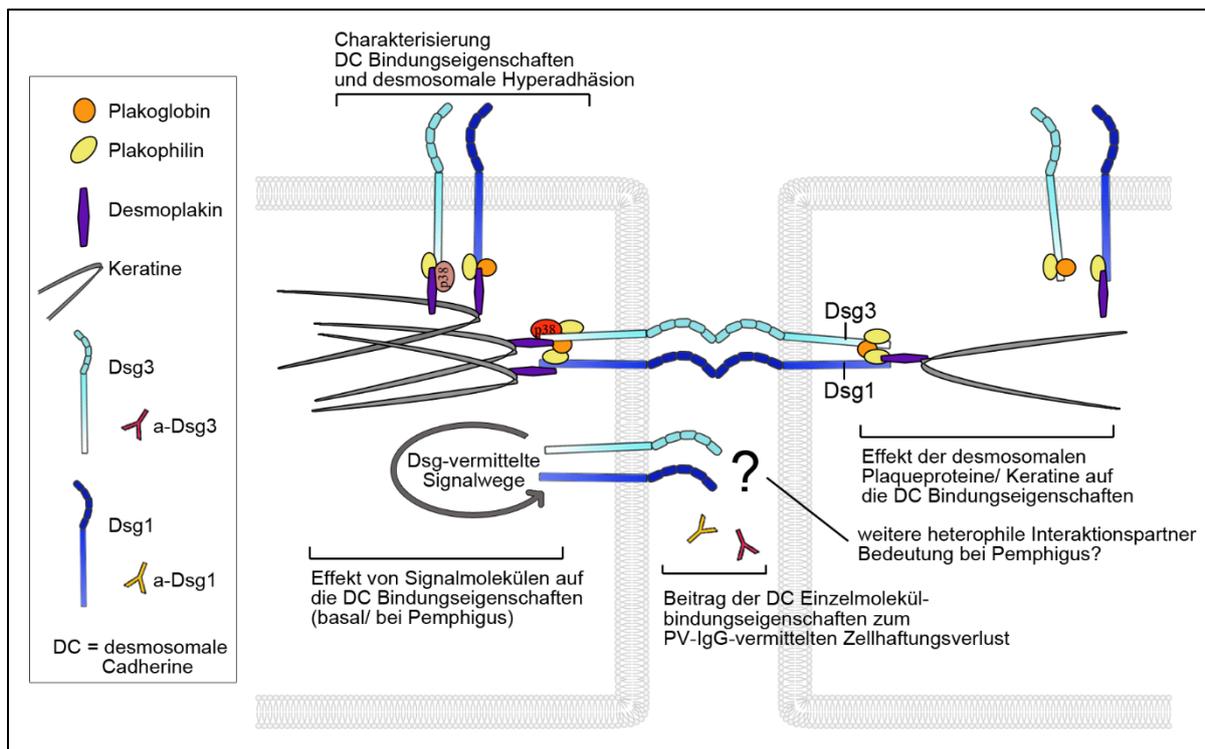


Abb. 6: Übersicht der Fragestellungen der Habilitationsschrift

3. Ergebnisse

Folgende Publikationen liegen dieser Habilitationsschrift zugrunde (thematisch geordnet):

1. **Vielmuth F**, Hartlieb E, Kugelmann D, Waschke J und Spindler V. (2015)
Atomic force microscopy identifies regions of distinct desmoglein 3 adhesive properties on living keratinocytes.
Nanomedicine.11(3):511-20. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.10.006>
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1549963414005589?via%3Dihub>
2. Fuchs M, Foresti M, Radeva MY, Kugelmann D, Keil R, Hatzfeld M, Spindler V, Waschke J und **Vielmuth F**. (2019)
Plakophilin 1 but not plakophilin 3 regulates desmoglein clustering.
Cell Mol Life Sci. 2019 Sep;76(17):3465-3476. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03083-8>
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-019-03083-8>
3. **Vielmuth F**, Wanuske MT, Radeva MY, Hiermaier M, Kugelmann D, Walter E, Buechau F, Magin TM, Waschke J und Spindler V. (2018)
Keratins Regulate the Adhesive Properties of Desmosomal Cadherins through Signaling.
J Invest Dermatol. 138(1):121-31. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.08.033>
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X17329329?via%3Dihub>
4. Fuchs M, Sigmund AM, Waschke J, **Vielmuth F** (2020)
Desmosomal Hyperadhesion Is Accompanied with Enhanced Binding Strength of Desmoglein 3 Molecules'
Biophys J. 2020 Oct 20;119(8):1489-1500. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.09.008>
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349520307189?via%3Dihub>
5. Fuchs M, Kugelmann D, Schlegel N, **Vielmuth F***, Waschke J*. *gleichberechtigte Letztautorenschaft (2022)
Desmoglein 2 can undergo Ca²⁺-dependent interactions with both desmosomal and classical cadherins including E-cadherin and N-cadherin
Biophys J. 2022 Apr 5;121(7):1322-1335.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2022.02.023>
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349522001473?via%3Dihub>
6. **Vielmuth F**, Waschke J und Spindler V. (2015)
Loss of Desmoglein Binding Is Not Sufficient for Keratinocyte Dissociation in Pemphigus.
J Invest Dermatol. 135(12):3068-77. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.324>
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X15601725?via%3Dihub>

7. **Vielmuth F**, Walter E, Fuchs M, Radeva MY, Buechau F, Magin TM, Spindler V und Waschke J. (2018)
Keratins Regulate p38MAPK-Dependent Desmoglein Binding Properties in Pemphigus.
Front Immunol. 9:528. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00528>
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00528/full>

8. Sigmund AM, Steinert LS, Egu DT, Bayerbach FC, Waschke J, **Vielmuth F**. (2020)
Dsg2 Upregulation as a Rescue Mechanism in Pemphigus.
Front Immunol. 2020 Oct 28;11:581370.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.581370>
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.581370/full>

9. Sigmund AM, Winkler M , Engelmayer S , Kugelmann D , Egu DT , Steinert LS, Fuchs MT, Hiermaier M, Radeva MY , Bayerbach FC, Butz E, Kotschi S, Hudemann C, Hertl M, Yeruva S, Schmidt E, Yazdi AS, Ghoreschi K, **Vielmuth F***, Waschke J* *gleichberechtigte Letztautorenschaft (2023)
Apremilast prevents blistering in human epidermis and stabilizes keratinocyte adhesion in pemphigus
Nat Commun. 2023 Jan 9;14(1):116.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-35741-0>
<https://www.nature.com/articles/s41467-022-35741-0>

10. **Vielmuth F**, Rotzer V, Hartlieb E, Hirneiss C, Waschke J und Spindler V. (2016)
Pemphigus Autoantibodies Induce Blistering in Human Conjunctiva.
Invest Ophthalmol Vis Sci. 57(10):4442-9. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-19582>
<https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2547706>

3.1. Die Dsg3 Bindungseigenschaften unterscheiden sich in Abhängigkeit der Lokalisation auf der Zelle

Vielmuth et al., 2015, *Nanomedicine*.11(3):511-20.

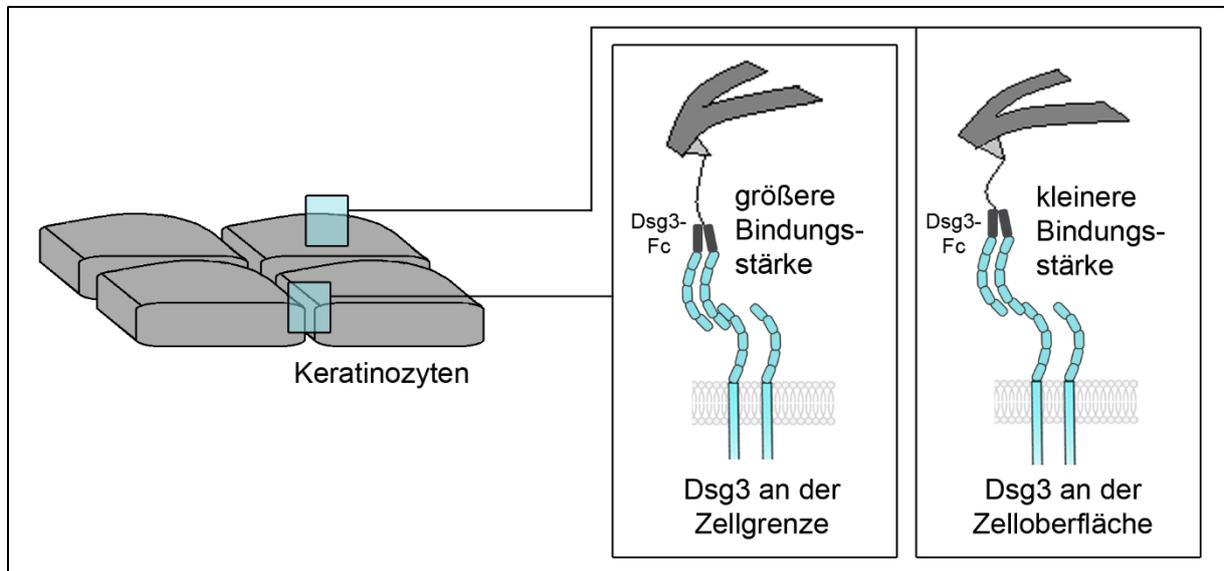


Abb. 7: AFM ermöglicht Unterschiede in den Bindungseigenschaften desmosomaler Cadherine auf lebenden Keratinozyten zu detektieren

Anhand von AFM-Topographiebildern wurden kleine Areale entlang der Zellgrenzen und auf der freien Zelloberfläche (oberhalb des Zellkerns) für Dsg3 Adhäsionsmessungen ausgewählt. Interessanterweise waren die Bindungskräfte der Dsg3 Einzelmolekülinteraktionen an Zellgrenzarealen stärker als auf der Zelloberfläche.

Desmosomale Cadherine interagieren mit den Molekülen benachbarter Zellen woraus eine starke interzelluläre Haftung in Desmosomen resultiert. Darüber hinaus kommen desmosomale Cadherine auch extradesmosomal vor (Delva et al., 2009; Waschke und Spindler, 2014). Insbesondere für Dsg3 wurde hierbei gezeigt, dass sowohl desmosomale als auch extradesmosomale Moleküle wichtige Signalfunktionen übernehmen, die über ihre adhäsive Funktion hinausgehen, wobei die jeweils regulierten Signalwege sich unterscheiden. Während extradesmosomales Dsg3 mit E-Cadherin und dem Aktinzytoskelett assoziiert sein kann und Src, Erk sowie p38MAPK reguliert (Rotzer et al., 2015a; Tsang et al., 2012b; Walter et al., 2017), wurde für den desmosomalen Pool insbesondere Src-Regulation im Hinblick auf Pemphigus-Autoantikörper herausgestellt (Walter et al., 2017; Walter et al., 2019).

Obgleich die biologische Funktion desmosomaler Cadherine groß ist, war zu diesem Zeitpunkt noch wenig über ihre Einzelmolekül-Bindungseigenschaften und deren Regulation bekannt. Ziel dieser Studie war es daher die Bindungseigenschaften von Dsg3 unter zellfreien Bedingungen genauer zu charakterisieren sowie spezifische Dsg3-Bindungsereignisse auf lebenden Keratinozyten unter physiologischen Bedingungen mittels AFM zu detektieren. Hierbei konnten wir zunächst zeigen, dass Dsg3 in einem zellfreien AFM-Versuchsaufbau

homophile, Ca^{2+} -abhängige Interaktionen eingeht. Ihre Spezifität ließ sich durch einen monoklonalen α Dsg3-Antikörper gerichtet gegen die Extrazellulärdomäne von Dsg3 nachweisen. Weiterhin wurden Untersuchungen mit unterschiedlichen Rückzugsgeschwindigkeiten durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die Bindungsstärke mit zunehmender Zuggeschwindigkeit zunimmt. Dies ist typisch für sogenannte „Catch-Bonds“ (Rakshit et al., 2012; Wieland et al., 2005) und passt damit zu ähnlichen Vorbefunden für klassische Cadherine sowie für Dsg1 (Waschke et al., 2007).

Weiterhin war ein Hauptziel dieser Publikation ein Messprozedere auf lebenden Keratinozyten unter annähernd physiologischen Konditionen zu etablieren. Alle Messungen wurden daher bei 37°C und in Zellkulturmedium durchgeführt. Es wurden zunächst die Zell-Zell-Kontaktbereiche von humanen immortalisierten HaCaT Keratinozyten mittels AFM Topographiebildern dargestellt. In Übereinstimmung mit rasterelektronenmikroskopischen Darstellungen zeigten sich hierbei dichte fingerförmige Zellfortsätze, die die Zell-Zell-Kontaktbereiche überbrücken. Kleine Areale entlang dieser Kontaktbereiche wurden ausgewählt um Einzelmolekülinteraktionen mittels einer Dsg3-funktionalisierten Messspitze zu detektieren. Interessanterweise waren die Dsg3 Interaktionen gleichmäßig verteilt. In Übereinstimmung mit den zellfreien Vorbefunden sind auch diese Interaktionen mittels Ca^{2+} -Depletion bzw. Inkubation eines Dsg3-spezifischen Antikörpers blockierbar. Damit konnten erstmal spezifische Dsg3-Einzelmolekülinteraktionen auf lebenden Keratinozyten untersucht werden.

Im nächsten Schritt verglichen wir die Bindungseigenschaften von Dsg3-Interaktionen an Zellgrenzen mit solchen auf der freien Zelloberfläche über dem Zellkern. Während Bindungsfrequenz und Verteilung sich zwischen den Zelllokalisationen nicht unterschieden, ergaben sich deutliche Unterschiede in der Interaktionsstärke. So konnte eine signifikant höhere Bindungsstärke an den Zellgrenzen im Vergleich zur Zelloberfläche detektiert werden (Abb. 7).

Dies ist interessant, da dies andeutet, dass die Moleküle vielleicht auch unterschiedliche Funktionen innehaben, was nachgeordnet die Frage aufwirft, woraus dieser Unterschied resultiert. Es könnte spekuliert werden, dass eine unterschiedliche **Verankerung an das zelluläre Zytoskelett** entscheidend ist oder dies durch eine veränderte Organisation der **desmosomalen Plaqueproteine** hervorgerufen wird. Des Weiteren ist eine **unterschiedliche Einbindung in Signalkomplexe** und damit eine unterschiedliche Regulation durch Signalmoleküle denkbar. Dies waren demnach Ansatzpunkte für die nachfolgenden Studien.

3.2. Plakophilin 1 jedoch nicht Plakophilin 3 reguliert die Clusterformation von Desmoglein 3

Fuchs et al., 2019, *Cell Mol Life Sci.* 2019Sep; 76(17):3465-3476.

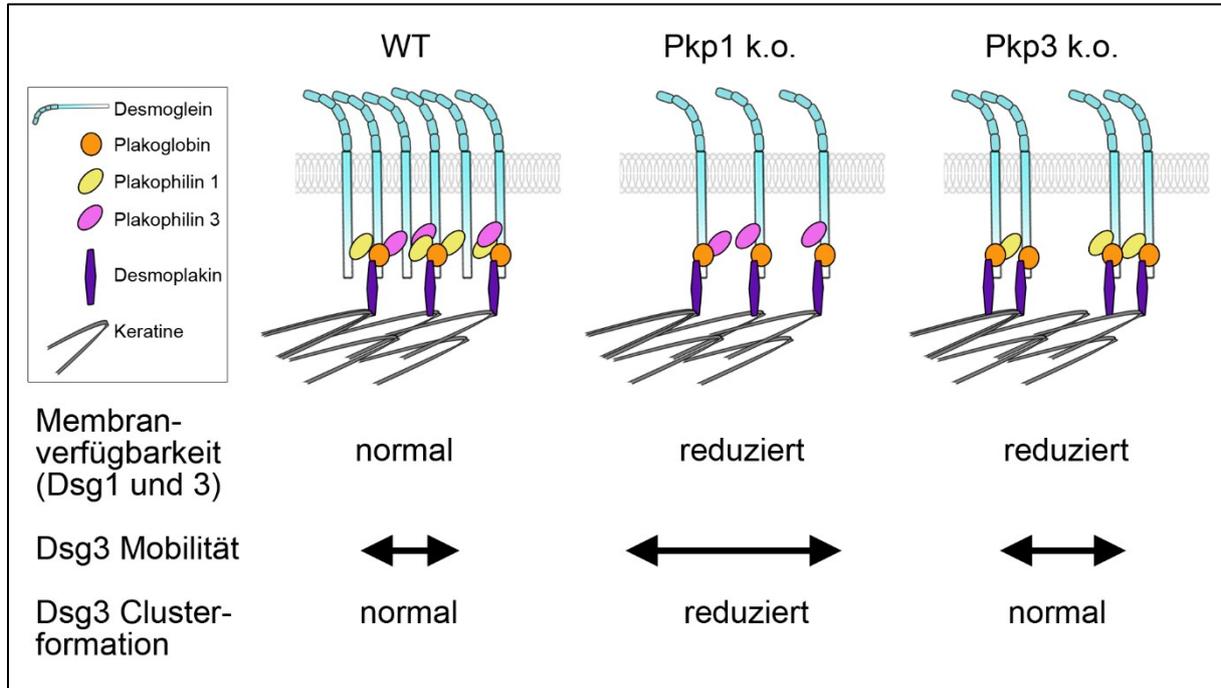


Abb. 8: Plakophiline sind entscheidend für die Membranverfügbarkeit sowie für die Clusterformation von desmosomalen Cadherinen

In murinen Keratinozyten, die entweder defizient für Pkp1 oder Pkp3 sind, wurde die Bedeutung der Plakophiline für die Bindungseigenschaften und Verteilung der desmosomalen Cadherine Dsg1 und 3 mittels AFM untersucht. Sowohl Pkp1 als auch Pkp3 reduzierten signifikant die Membranverfügbarkeit von Dsg1 und 3. Interessanterweise führte allerdings nur der Verlust von Pkp1, nicht aber ein Fehlen von Pkp3 zu einer erhöhten Mobilität sowie einer reduzierten Clusterformation von Dsg3.

In Anknüpfung an die vorausgegangene Studie wurde im ersten Schritt der Einfluss der desmosomalen Plaqueproteine Pkp 1 und 3 untersucht.

Pkp sind desmosomale Plaqueproteine, die mit ihren 3 Isoformen ein gewebespezifisches Expressionsmuster aufweisen. In der Epidermis ist dies darüber hinaus differenzierungs- und damit schichtspezifisch (Abb. 1) (Hatzfeld et al., 2014; Johnson et al., 2014). Es war bereits bekannt, dass die unterschiedlichen Isoformen entscheidend zu einer intakten desmosomalen Haftung beitragen und durch Regulation von verschiedenen Signalwegen am Umsatz desmosomaler Cadherine und ihrer Haftung beteiligt sind (Hatzfeld et al., 2014; Keil et al., 2016). Ihre jeweilige Bedeutung wird durch unterschiedliche Erkrankungen aber auch durch murine Knock-out (KO) Modelle verdeutlicht. So führt eine funktionsmindernde Mutation in Pkp1 zum ektodermalen Dysplasie – Hautfragilitätssyndrom (McGrath et al., 1997; McGrath und Mellerio, 2010). In Übereinstimmung damit entwickeln Pkp1 KO Mäuse neben einer Wachstumsretardierung, einen Verlust der desmosomalen Haftung sowie eine verminderte

Funktion von Tight Junctions (Rietscher et al., 2016). Pkp3 KO Mäuse weisen dagegen nur einen milden Phänotyp auf, der Auffälligkeiten an den Haarfollikeln sowie Anfälligkeit für Hautinfektionen beinhaltet (Sklyarova et al., 2008).

Aus einer molekularen Sichtweise wurde gezeigt, dass Pkp eine Periodizität von rund 7nm im desmosomalen Plaques aufweisen und damit direkt an dessen Organisation beteiligt sind (Al-Amoudi et al., 2011). Allerdings war bis zu diesem Zeitpunkt unbekannt, welche Pkp-Isoformen welche desmosomalen Cadherine clustern und ob diese auch einen direkten Einfluss auf die Bindungseigenschaften desmosomaler Proteine haben.

Für die Studie verwendeten wir murine Keratinozyten, die entweder für Pkp1 oder Pkp3 defizient sind. Sowohl der Verlust von Pkp1 als auch Pkp3 führen zu einem Zell-Zell-Haftungsverlust, was die Bedeutung der Pkp-Isoformen für die desmosomale Haftung zeigt. Interessanterweise war hierbei auch die Membranlokalisation von Dsg1 und Dsg3 stark vermindert (Abb. 8).

Um nun zu untersuchen ob dies auch einen Einfluss auf Einzelmolekülbindungseigenschaften von Dsg3 hat, wurden nachfolgend AFM Messungen auf den jeweiligen Zelllinien durchgeführt. Vergleichen zu Wildtyp (WT) Zellen zeigte sich in Pkp1- oder 3-defizienten Keratinozyten eine signifikant reduzierte Bindungsfrequenz von Dsg3 in Übereinstimmung mit der verminderten Membranverfügbarkeit. Des Weiteren war die Bindungsstärke (engl. Unbinding force, UF) der verbleibenden Bindungsereignisse und ihre Unbinding position (UP) vermindert. Diese Pkp-unabhängigen Dsg3 Bindungsereignisse scheinen also eine besondere Entität an Molekülen zu sein, wobei diese noch nicht abschließend aufgeklärt werden konnte. Auch für Dsg1 war die Bindungsfrequenz an den Zell-Zell-Kontakten in den Pkp-defizienten Zelllinien deutlich vermindert ebenso wie die UP. Interessanterweise konnte hier eher eine Tendenz zu höheren Bindungsstärken festgestellt werden.

Da Pkp-Isoformen in verschiedene Signalwege eingreifen und hierüber desmosomale Haftung regulieren und p38MAPK ein entscheidender Signalweg für eine suffiziente desmosomale Haftung darstellt, untersuchten wir nachfolgend ob der Verlust von Pkp1 oder 3 einen Effekt auf p38MAPK hat. Allerdings konnte weder unter unbehandelten Bedingungen noch unter Stimulation mittels des p38MAPK-Aktivators Anisomycin ein Unterschied zu WT Zellen detektiert werden.

Im nächsten Schritt untersuchten wir wie sich ein Verlust von Pkp1 bzw. Pkp3 auf das Clustering von Dsg3 auswirkt. Unter Verwendung eines membran-impermeablen Crosslinkers konnte gezeigt werden, dass sich in den Pkp-defizienten Zelllinien im Vergleich zum WT signifikant weniger Dsg3-Oligomere zu finden sind. Weiterhin untersuchten wir die Clustergröße sowie die Mobilität einzelner Dsg3 Moleküle in der Membran mittels AFM. Durch repetitive Messungen entlang eines kleinen Areals einer Zellgrenze konnte gezeigt werden, dass die Größe der Dsg3 Cluster in Pkp1- und Pkp3-defizienten Zelllinien deutlich vermindert ist (Abb. 8). Im Unterschied dazu war die Molekülmobilität lediglich in Pkp1-defizienten Zellen

signifikant erhöht. Die konnte auch in FRAP (engl. für: fluorescence recovery after photobleaching) Experimenten bestätigt werden.

Um zu untersuchen ob diese Unterschiede durch die verminderte Membranverfügbarkeit von Dsg3 in den Pkp-defizienten Zelllinien bedingt wird, führten wir nachfolgend Überexpressionsstudien mit transienter Dsg3-Expression durch. Interessanterweise konnte hierdurch die Clustergröße und –Morphologie in der Pkp3 aber nicht in der Pkp1 KO Zelllinie normalisiert werden. Hierbei legten wir besonderen Wert auf den methodischen Ansatz, der neben AFM- und FRAP-Experimenten auch STED-Mikroskopie umfasste, sodass die Dsg3 Cluster auch direkt sichtbar gemacht werden konnten.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse also, dass sowohl Pkp1 als auch Pkp3 für die Membranverfügbarkeit von Dsg3 entscheidend sind. Dagegen ist die Dsg3-Clusterbildung eine spezifische von Pkp1-vermittelte Funktion (Abb. 8).

3.3. Keratine beeinflussen die Bindungseigenschaften desmosomaler Cadherine durch Regulation von intrazellulären Signalwegen

Vielmuth et al., 2018, *J Invest Dermatol.* 138(1):121-31.

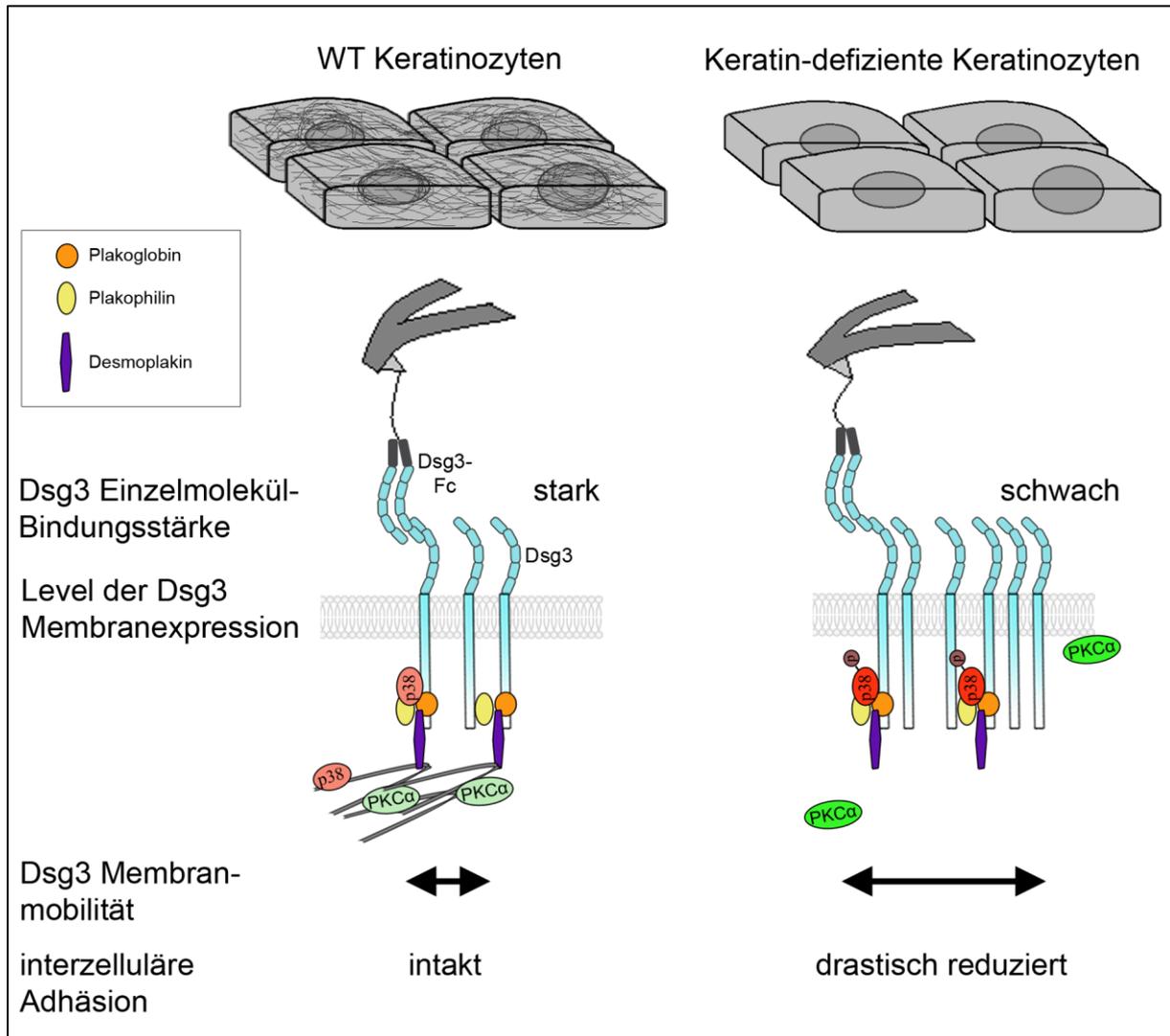


Abb. 9: Keratine regulieren die Bindungseigenschaften von Dsg3 durch Regulation von PKCα und p38MAPK

In murinen Keratinozyten konnte mittels AFM die Abhängigkeit der Dsg3 Bindungseigenschaften von Keratinen herausgestellt werden. In Keratin-defizienten Zellen zeigte sich die Bindungsfrequenz von Dsg3 erhöht, jedoch die Interaktionsstärke der Einzelmolekülinteraktionen reduziert. Beide Veränderungen konnten durch zelluläre Signalwege, wie p38MAPK und PKCα reguliert werden.

Eine unserer vorausgegangenen Studien zeigte, dass sich die Dsg3 Bindungseigenschaften in Abhängigkeit der zellulären Lokalisation des Moleküls unterscheiden; wobei die Ursache dieses Phänomens nicht erklärt werden konnte. Keratine sind in der Epidermis für deren Integrität von entscheidender Bedeutung. Sie determinieren mittels Steifigkeit und Mobilität die mechanischen Eigenschaften von Keratinozyten (Seltmann et al., 2013). Ein Verlust der Keratine führt zu einer verminderten Zell-Zell-Haftung sowie der Ausbildung von weniger und

kleineren Desmosomen (Bar et al., 2014; Kroger et al., 2013; Toivola et al., 2015). Darüber hinaus regulieren Keratine z.B. durch PKC α -abhängige Dp Phosphorylierung die Stabilität und adhäsiven Eigenschaften von Desmosomen (Kroger et al., 2013), wobei die genauen Mechanismen noch nicht verstanden waren. Wir untersuchten in der vorliegenden Studie daher wie Keratine die Einzelmolekülbindungseigenschaften desmosomaler Cadherine regulieren und ob sie für die unterschiedlichen Bindungskräfte von Dsg3 an Zellgrenze und Zelloberfläche verantwortlich sind.

Hierbei konnten wir zunächst zeigen, dass sich neben den Zell-Zell-Kontakten in der lateralen Membran der Zellen auch auf deren Oberfläche Cluster ausbilden, die neben Dsg3 auch Dp und Keratine enthalten. Diese Cluster, die vielleicht als Vorstufen von Desmosomen angesehen werden können, sind somit durch AFM Messungen erreichbar. Wir untersuchten nun die Dsg3 Bindungseigenschaften in Keratin-defizienten murinen Keratinozyten und verglichen diese mit entsprechenden WT Zellen. In Übereinstimmung mit vorausgegangenen Studien zeigen Keratin-defiziente Keratinozyten eine deutlich verminderte interzelluläre Haftung (Kroger et al., 2013; Loschke et al., 2016). Interessanterweise zeigen Keratin-defiziente Keratinozyten eine erhöhte Expression und Membranverfügbarkeit von Dsg3 was sich am AFM in einer höheren Dsg3 Bindungsfrequenz widerspiegelte. Allerdings war die Einzelmolekülbindungsstärke von Dsg3 in den Keratin-defizienten Zellen signifikant verringert, was die Bedeutung der Keratine für eine adäquate Dsg3 Haftung aufzeigt (Abb. 9). Nichts desto trotz, blieb der Unterschied zwischen höheren Kräften an der Zellgrenze und niedrigeren Kräften auf der freien Zelloberfläche bestehen und ist somit nicht durch die Keratinverankerung bedingt. Wir bestimmten weiterhin die „bond lifetime“ der mechanisch nicht belasteten Dsg3-Interaktionen auf den jeweiligen Zellen unter Anwendung einer modifizierten Bells Gleichung (Evans, 1998; Wieland et al., 2005). Der erste Peak der Häufigkeitsverteilung zeigte eine „lifetime“ von 0,2s im WT und 0,21 in KO, allerdings zeigte die Verteilung nur im KO einen zweiten Peak mit einer erhöhten „lifetime“ von 0,49s, die vielleicht auf einen anderen Interaktionsmechanismus oder auf eine heterophile Interaktion hindeutet, die in diesen Zellen vermehrt auftritt. Wir untersuchten daher mögliche Interaktionspartner von Dsg3 mittels zell-freien AFM-Experimenten. Hierbei konnte lediglich zu Dsg2, nicht aber zu Dsg1 und Dsc3 eine heterophile Interaktion detektiert werden, die durch einen Dsg2-Antikörper blockierbar war. Auf Zellen konnte in beiden Zelllinien ein Dsg3-Antikörper die Bindungsfrequenz deutlich reduzieren, was zeigt, dass auch hier vorwiegend homophile Dsg3 Interaktionen auftreten, allerdings führte auch der Dsg2-Antikörper in den Keratin-defizienten Zellen zu einer Reduktion der Bindungsfrequenz, was andeutet, dass hier vermehrt heterophile Interaktionen von Dsg3 mit Dsg2 auftreten, die möglicherweise einen Kompensationsmechanismus gegenüber der verringerten Zellhaftung darstellen.

Auch für Aktin wurde berichtet, dass es insbesondere extradesmosomales Dsg3 in der Membran clustert (Tsang et al., 2012a). Um den Effekt von Aktin mit jenem von Keratinen auf die Dsg3 Bindungseigenschaften zu vergleichen, nutzen wir Latrunculin B um das Aktin-Zytoskelett zu zerstören. Dies hatte insbesondere in den Keratin-defizienten Zellen einen drastisch verminderten Effekt auf die interzelluläre Haftung, allerdings konnten wir keinen

Unterschied in der Dsg3 Bindungsfrequenz oder -stärke durch den Aktinverlust zeigen, sodass dem Aktinzytoskelett hier eine untergeordnete Rolle zugeschrieben werden muss.

Im nächsten Schritt untersuchten wir den Einfluss der beiden Zytoskelettkomponenten auf die Mobilität von Dsg3 in der Membran. Hierbei führte sowohl der Verlust der Keratine wie auch des Aktinzytoskeletts zu einer erhöhten Mobilität von Dsg3 in AFM und FRAP Messungen (Abb. 9).

Da Keratine PKC α in der Membran sequestrieren lässt sich vermuten, dass dieser Signalweg einen Einfluss auf die Keratin-abhängigen Dsg3 Bindungseigenschaften hat. Tatsächlich fanden wir erhöhte Level von PKC α in der Membran von Keratin-defizienten Keratinozyten. Im Umkehrschluss wirkte sich eine Inhibition von PKC α positiv auf die interzelluläre Haftung in Keratin-defizienten Keratinozyten aus. Dies ging einher mit einer noch deutlicher erhöhten Membranexpression von Dsg3 in der Membran Keratin-defizienter Keratinozyten wie durch AFM Experimenten und mittels Biotinylierung der Membranproteine herausgestellt werden konnte. Darüber hinaus führte eine Inhibition von PKC α zu einer verringerten Mobilität von Dsg3. Es kann also geschlussfolgert werden, dass die Sequestrierung von PKC α durch Keratine und somit deren Inhibition sich positiv auf die Membranexpression sowie auf die Stabilität von Dsg3 in der Membran auswirkt.

Des Weiteren beschäftigten wir uns mit dem p38MAPK Signalweg. Dies ist zum einen ein zentraler Signalweg in der Pathogenese des Pemphigus zum anderen zeigen vorausgegangene Studien, dass eine rasche Zerstörung des Keratinzytoskeletts zu einer drastischen Aktivierung von p38MAPK führen (Strnad et al., 2003; Woll et al., 2007). Auch die Keratin-defizienten Keratinozyten zeigten eine Aktivierung von p38MAPK. Eine Inhibition von p38MAPK führte zu einer Verbesserung der Zellhaftung im WT sowie zu einer Wiederherstellung der Zelladhäsion in den Keratin-defizienten Keratinozyten. Dies ging einher mit einer Stärkung der Einzelmolekülinteraktionen auf WT Level in den KO Zellen.

Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass Keratine die Bindungseigenschaften von Dsg3 regulieren und zwar die Membranstabilität und Dsg3-Bindungsfrequenz in Abhängigkeit von PKC α sowie die Bindungsstärke in Abhängigkeit von p38MAPK.

3.4. Das Phänomen der desmosomalen Hyperadhäsion geht mit erhöhten Einzelmolekülbindungskräften von Desmoglein 3 einher

Fuchs et al., 2020, *Biophys J.* Oct 20;119(8):1489-1500.

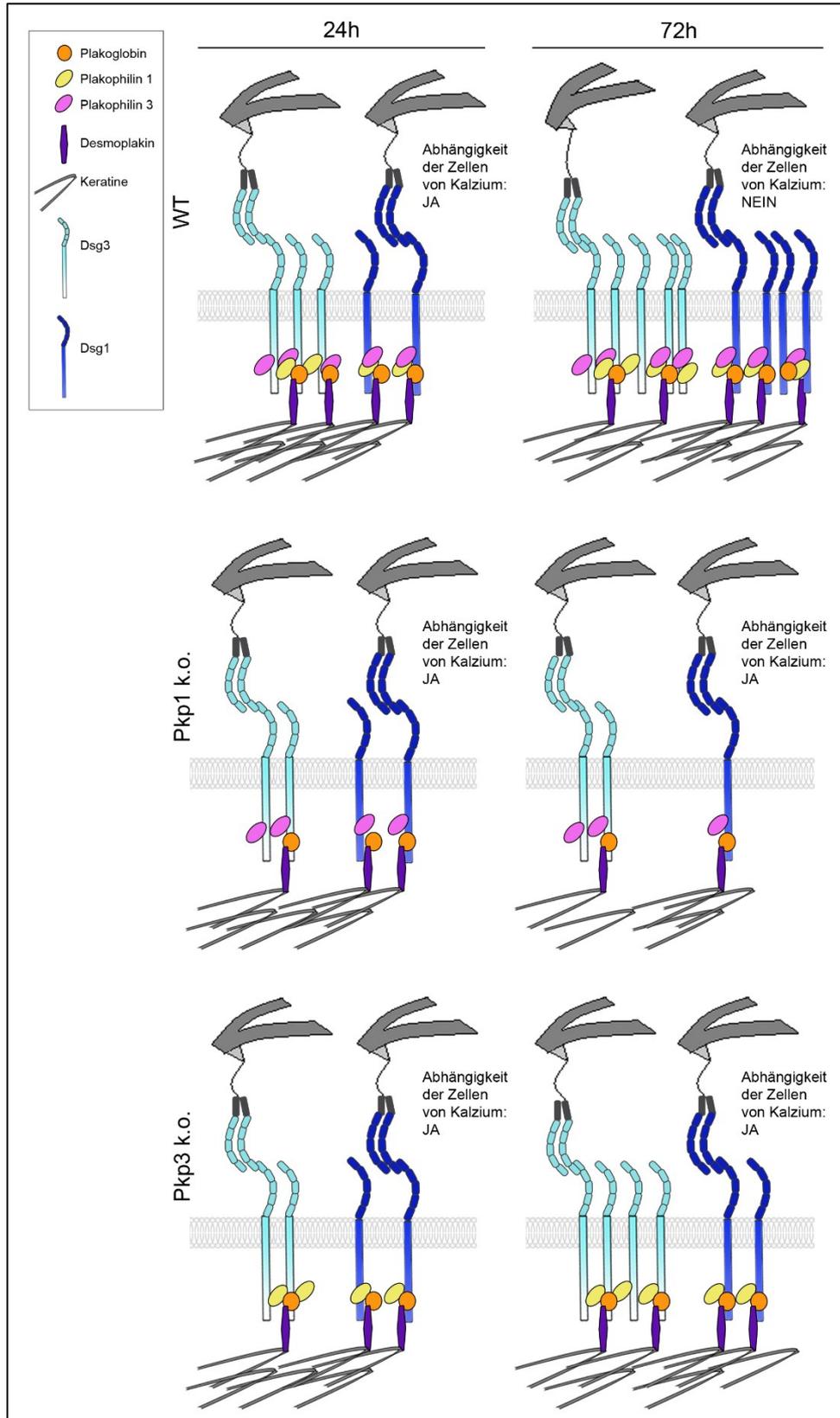


Abb. 10: Dsg1 und Dsg3 sowie die Plaqueproteine Pkp1 und 3 sind unterschiedlich am Phänomen der desmosomalen Hyperadhäsion beteiligt.

Murine WT Keratinozyten unterscheiden sich in ihrer Ca^{2+} -Abhängigkeit zwischen 24h und 72h Differenzierung in Medium mit 1.2mM Ca^{2+} . Nach 72h sind im WT vermehrt Dsg1 und 3 Moleküle detektierbar. Die Membranverfügbarkeit, wie in der vorausgegangenen Studie gezeigt, wird durch Pkp1- und 3-Verlust deutlich reduziert. Im WT kommt es über die Zeit zu einer vermehrten Entwicklung von Ca^{2+} -unabhängigen Dsg3 Oligomeren was mit einer erhöhten Einzelmolekülbindungskraft von Dsg3 einhergeht. Diese Veränderungen sind Pkp-abhängig und treten in den Pkp1- und 3-defizienten Zelllinien nicht auf. Des Weiteren sind entsprechende Veränderungen während der Entwicklung desmosomaler Hyperadhäsion für Dsg1 nicht detektierbar, was eine unterschiedliche Rolle von Dsg1 und 3 für die Aufrechterhaltung der desmosomalen Hyperadhäsion andeutet.

Für Desmosomen wurde das Phänomen der Hyperadhäsion beschrieben. Dabei handelt es sich um einen stark adhäsiven Zustand, bei dem desmosomale Cadherine während ihrer Maturierung unabhängig von extrazellulären Kalzium werden (Garrod und Kimura, 2008). Dies ist insofern überraschend, als dass die Transinteraktion von Cadherinen Ca^{2+} -abhängig ist. Die zugrundeliegenden Mechanismen insbesondere auf Einzelmolekülebene sind noch unverstanden. Das Ziel der vorliegenden Studie war es daher mögliche Korrelate der Hyperadhäsion auf Einzelmolekülebene zu finden und deren Regulation genauer zu verstehen. Konkret haben wir dafür die Bindungseigenschaften von Dsg1 und 3 in murinen Keratinozyten zum Zeitpunkt der Kalziumabhängigkeit untersucht und diese mit dem Zeitpunkt der Kalziumunabhängigkeit verglichen. Außerdem wurde der Einfluss der desmosomalen Plaqueproteine Pkp1 und 3 untersucht, da insbesondere für Pkp1 bereits ein Zusammenhang mit PKC-Signaling und Hyperadhäsion beschrieben wurde (Keil et al., 2016; Tucker et al., 2014).

Zunächst wurden die Bedingungen unter welchen murine WT Keratinozyten hyperadhäsiv werden definiert. Hierzu wurde ein Hyperadhäsions-Keratinozytendissoziationsversuch durchgeführt. Die Zellen werden dafür mit dem Ca^{2+} -Chelator EGTA behandelt und nachfolgend wird die Fragmentierung der Einzelzellschicht unter mechanischem Stress beobachtet. WT-Keratinozyten weisen hierbei nach 24h Differenzierung (in Medium mit 1.2mM Ca^{2+}) eine deutliche Fragmentierung auf die nach 72h Differenzierung deutlich abnimmt, was andeutet, dass die Zellen nach dieser Zeit hyperadhäsiv und damit zumindest teilweise unabhängig von extrazellulärem Ca^{2+} geworden sind. Im Gegensatz dazu nahm die Fragmentierung in Pkp1- und Pkp3-defizienten Keratinozyten im gleichen Zeitverlauf nicht ab, was andeutet, dass diese Zellen nur verzögert oder nicht hyperadhäsiv werden. Wir untersuchten nun die Einzelmolekülbindungseigenschaften von Dsg1 und 3. Für Dsg3 konnten wir in WT-Keratinozyten eine Erhöhung der Einzelmolekülbindungskräfte von 24h auf 72h Differenzierung detektieren, während diese in Pkp-defizienten Keratinozyten nicht vorhanden war (Abb. 10). Im Gegensatz dazu konnten bei Bindungsfrequenz, Verteilung der Moleküle sowie der „Life Time“ der Bindung keine Unterschiede detektiert werden, während die Zellen hyperadhäsiv wurden. Daraus lässt sich ableiten, dass eine Erhöhung der Einzelmolekülbindungskraft ein Korrelat der desmosomalen Hyperadhäsion sein kann. Wir untersuchten nun im Vergleich die Bindungseigenschaften von Dsg1. Interessanterweise gab

es hier zwischen 24h und 72h keine signifikanten Unterschiede, was andeutet, dass sich die desmosomalen Cadherine im Hinblick auf ihren Beitrag zur Entwicklung der desmosomalen Hyperadhäsion unterscheiden.

Diesen Unterschied wollten wir nun genauer untersuchen. Zunächst wurde daher ein Oligomerisierungsversuch durchgeführt. Dabei werden mittels eines membranimpermeablen Quervernetzers Moleküle, die eng aneinander liegen, miteinander verbunden. Im Western Blot können dann entsprechende Oligomere detektiert werden. Für Dsg3 zeigte sich hierbei, dass es während der Entwicklung der Hyperadhäsion zu einer Zunahme von Ca^{2+} -unabhängigen Dsg3-Oligomeren kommt, was in der Pkp-defizienten Zelllinien nicht der Fall ist. Auch für Dsg1 ist eine solche Zunahme in keiner der Zelllinien zu beobachten. Auch dies gibt einen weiteren Hinweis darauf, dass sich Dsg1 und 3 im Hinblick auf ihren Beitrag zur desmosomalen Hyperadhäsion unterscheiden. Vergleichend wurde in dieser Versuchsreihe auch die Oligomerisierung des klassischen Cadherins E-Cad untersucht. Hierbei zeigten sich zu keinem Zeitpunkt Ca^{2+} -unabhängige Oligomere was zeigt, dass Hyperadhäsion ein Phänomen ist, dass spezifisch bei Desmosomen, nicht aber bei Adhärensjunktionen, auftritt.

Der hyperadhäsive Zustand von Desmosomen wurde als der Physiologische in gesunder Epidermis beschrieben (Garrod, 2010). Nach den in Zellkultur detektierten Unterschieden von Dsg1 und 3 untersuchten wir nachfolgend den Effekt von EGTA auf Dsg1 und 3 in humaner Epidermis. Interessanterweise zeigten sich hier für Dsg3 keine Unterschiede zwischen Kontrolle und EGTA-behandelten Geweben. Die Färbung von Dsg1 war dagegen nach EGTA-Behandlung vermindert und fragmentiert was andeutet, dass Dsg1 in der Epidermis nicht in allen Fällen einen hyperadhäsiven Zustand aufweist. Schließlich konnten wir auch zeigen, dass in Dsg3-defizienten Keratinozyten die Entwicklung von Hyperadhäsion stark beeinträchtigt ist.

Zusammenfassend kann man herausstellen, dass Dsg3 eine zentrale Rolle in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der desmosomalen Hyperadhäsion in Keratinozyten einnimmt. Die Daten deuten weiterhin darauf hin, dass desmosomale Hyperadhäsion kein Zustand ist, den ganze Desmosomen erlangen, sondern vielmehr ein Prozess an welchem Isoformen der desmosomalen Cadherine sowie desmosomale Plaqueproteine wie Pkp1 und Pkp3 in unterschiedlicher Weise beteiligt sind.

3.5. Desmoglein 2 kann Ca^{2+} -abhängige Interaktionen mit desmosomalen und klassischen Cadherinen eingehen

Fuchs et al, 2022, *Biophys J.*, Oct 20;119(8):1489-1500.

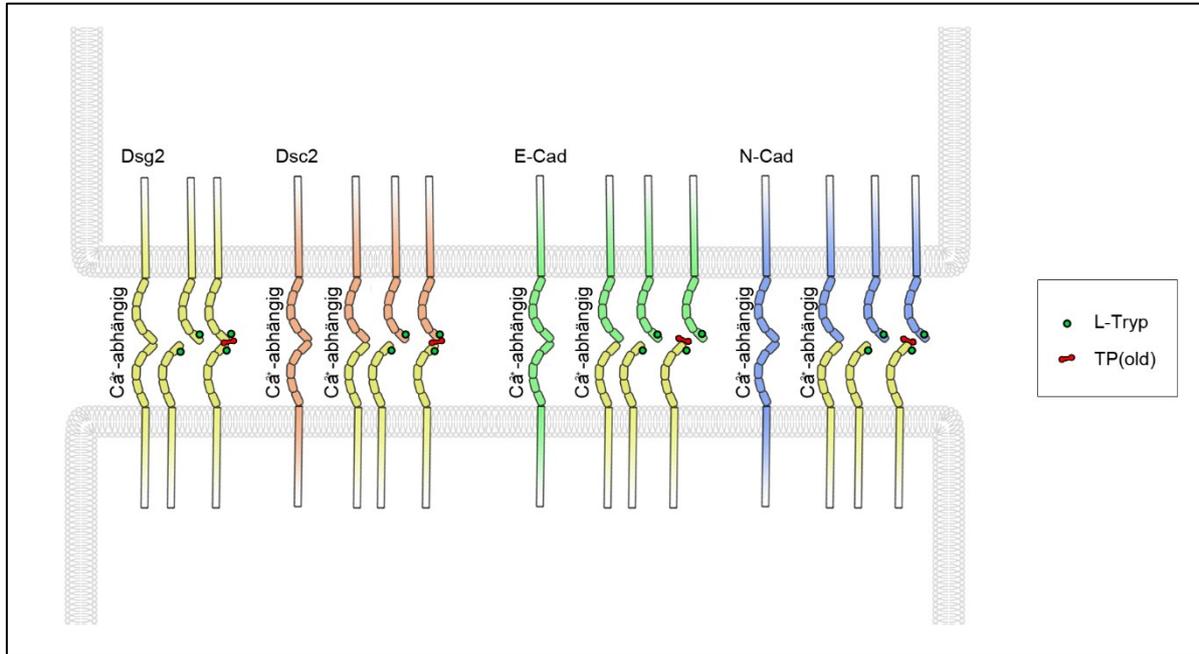


Abb. 11: Übersicht homo- und heterophile Interaktionen von Dsg2 mit desmosomalen und klassischen Cadherinen

Das ubiquitär vorkommende Dsg2 kann homophile Interaktionen eingehen, aber auch heterophil mit Dsc2 sowie mit den klassischen Cadherinen E-Cad und N-Cad interagieren. Alle diese Interaktionen sind Ca^{2+} -abhängig. L-Tryptophan (L-Tryp), welches an die hydrophobe Bindungstasche an der ECD1 der desmosomalen und klassischen Cadherine bindet, blockiert homophile wie auch heterophile Dsg2 Interaktionen. Ein Peptid (engl. „tandem peptide“, kurz: TP) welches an der ECD1 von desmosomalen Cadherinen bindet und dabei 2 Moleküle quervernetzen kann, kann den Effekt von L-Tryptophan zwischen den Interaktionen desmosomaler Cadherine aufheben, nicht aber in den heterophilen Interaktionen von Dsg2 mit E-Cad und N-Cad.

Trans-Interaktionen klassischer Cadherine wurde bereits genau charakterisiert. Dabei werden sogenannte „strand swap“ Dimere gebildet, die auf einem Austausch eines konservierten Tryp (W2) an der ECD1 beruhen (Boggon et al., 2002). Im Gegensatz dazu werden auch X-Dimere in cis gebildet, an welchen die ECD 1 und 2 beteiligt sind und die wahrscheinlich eine wichtige intermediäre Konformation bei der Bildung von „strand swap“ Dimeren darstellen (Harrison et al., 2010). Dagegen ist der Interaktionsmechanismus von desmosomalen Cadherinen noch nicht genau bekannt. Mittels unterschiedlichen Methoden wurden homo- und heterophile Interaktionen detektiert mit teilweise widersprüchlichen Ergebnissen (Dieding et al., 2017; Harrison et al., 2016; Ishii et al., 2020; Vielmuth et al., 2018a). Da sich in aktuellen Studien gezeigt hat, dass es auch einen Crosstalk von AJs und Desmosomen gibt und insbesondere E-Cad und Dsg2 während der Desmosomenassemblierung interagieren (Green et al., 2019;

Rubsam et al., 2018; Shafraz et al., 2018), haben wir hier homo- und heterophile Interaktionen von Dsg2 mittel zellfreien AFM-Untersuchungen untersucht.

Hierzu wurden zellfreie AFM Messungen durchgeführt. Sowohl die Messspitze als auch die Oberfläche eines Mica-Plättchen wurden mit den Extrazellulärdomänen der entsprechenden Cadherine beschichtet und diese nachfolgend gegeneinander gemessen. Dadurch sind die jeweiligen Interaktionspartner in trans festgelegt und es kann beurteilt werden welche Interaktionen auftreten. Dabei konnten homophile Dsg2-Dsg2, Dsc2-Dsc2, E-Cad-E-Cad und N-Cad-N-Cad Interaktionen sowie heterophile Interaktionen zwischen Dsg2-Dsc2, Dsg2-E-Cad und Dsg2-N-Cad mit einer ähnlichen Bindungsfrequenz detektiert werden. Bei der Auswertung der Bindungsstärke der Einzelmolekülinteraktionen fiel auf, dass die heterophile Dsg2-E-Cadherin Interaktion eine signifikant erhöhte UF aufwies, was vielleicht durch die Rolle in der Desmosomenassemblierung erklärt werden kann (Shafraz et al., 2018). Im Gegensatz dazu war die „lifetime“ aber unter allen heterophilen Interaktionen vergleichbar. Darüber hinaus waren alle Interaktionen Ca^{2+} -abhängig und durch entsprechende spezifische Antikörper blockierbar. Eine Ausnahme stellte die Dsg2-Dsc2 Interaktion dar, für die wir keinen Dsc2-Antikörper finden konnten, der zu einer signifikanten Blockade der Interaktionen führte.

Um mehr über die jeweiligen Interaktionsmechanismen der Dsg2-Interaktionen zu erfahren, wurden im nächsten Schritt vormals designte Peptide eingesetzt. Ein sog. „single peptide“, (SP) blockiert die trans-Interaktionen desmosomaler Cadherine, während ein sog. „tandem peptide“ (TP) durch Quervernetzung die trans Interaktion desmosomaler Cadherine stabilisiert (Heupel et al., 2009b; Schlipp et al., 2014). TP besteht dabei aus 2 SP, die über einen flexible Aminohexal-Linker verbunden sind (Heupel et al., 2009a). In Übereinstimmung mit vorherigen Ergebnisse von homophilen Interaktionen von Dsg3-Dsg3, Dsg2-Dsg2 und Dsg1-Dsg1 (Heupel et al., 2009b; Schlipp et al., 2014), blockiert SP auch die heterophilen Interaktion von Dsg2 mit Dsc2, E-Cad und N-Cad, während die Kräfte der verbleibenden Interaktionen davon nicht beeinträchtigt wurden. Des Weiteren wurde L-Tryptophan (L-Tryp) verwendet. Für diese Aminosäure ist bekannt, dass es mit den für klassische Cadherine gezeigten und für desmosomale Cadherine vermuteten Austausch von Tryptophan-Residuen an der ECD1 (engl.: tryptophan swap) interferiert. In Übereinstimmung konnte auch für Dsg2-Dsg2 Interaktionen eine Inhibition durch L-Tryp-Zugabe gezeigt werden (Schlipp et al., 2014). Da in der gleichen Studie zudem gezeigt wurde, dass TP den blockierenden Effekt von L-Tryp auf homophile Dsg2-Dsg2 Interaktionen aufhebt (Schlipp et al., 2014), wurde im nächsten Schritt der Effekt von TP auf homo- und heterophile Dsg2 Interaktionen unter Anwesenheit von L-Tryp untersucht. Hierbei zeigte sich, dass TP zwar den L-Tryptophan-vermittelten Verlust von Dsg2-Interaktionen im Falle von homophilen Dsg2-Dsg2 sowie heterophilen Dsg-Dsc2 Interaktionen aufheben konnte, nicht aber für die heterophilen Interaktionen zu E-Cad und N-Cad. Dies lässt vermuten, dass Interaktionen von Dsg2 mit anderen desmosomalen Cadherinen auf einem anderen Mechanismus beruhen als die Interaktionen zu klassischen Cadherinen. Um diese zellfreien Daten im Zellmodell zu verifizieren, wurden im Anschluss Enterozyten (DLD1-Zellen) untersucht. In AFM Experimenten mit Dsg2-funktionalisierten Messspitzen zeigte sich hier,

dass L-Tryp zu einer signifikanten Verminderung der Dsg2-abhängigen Bindungsfrequenz führt und dass TP diesen Effekt aufhebt. Darüber hinaus führte TP zu einer Umverteilung von Dsg2-abhängigen Bindungsereignissen zu den Zellgrenzen, was unter Umständen zu einer stärkeren Zellhaftung beitragen kann.

Zusammenfassend zeigt die Studie, dass das ubiquitär vorkommende desmosomale Cadherin Dsg2 in der Lage ist, homophile sowie heterophile Interaktionen einzugehen. Als heterophile Interaktionspartner wurden desmosomale (Dsc2) und klassische Cadherine (E-Cad, N-Cad) identifiziert, wobei der Interaktionsmechanismus jeweils unterschiedlich zu sein scheint.

In den nachfolgenden Studien wurde nun untersucht welchen Beitrag die Einzelmolekülbindungseigenschaften der desmosomalen Cadherine zur Pemphigus Pathogenese leisten.

3.6. Die direkte Inhibition von Dsg3 reicht nicht für den durch Pemphigus-Autoantikörper-induzierten Haftungsverlust aus

Vielmuth et al., 2015, *J Invest Dermatol.* 135(12):3068-77.

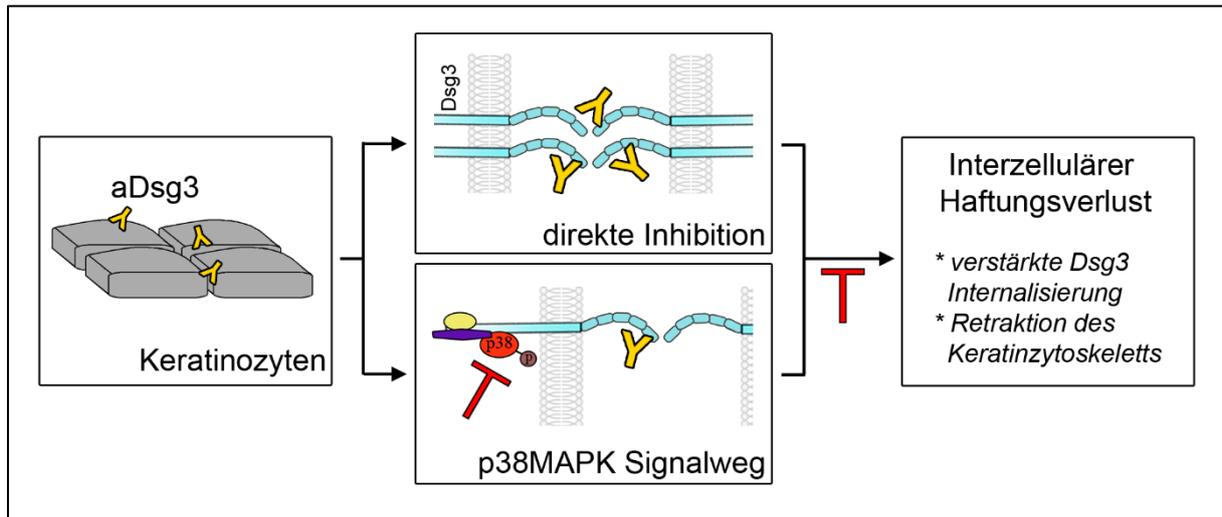


Abb. 12: Die Dysregulation von Signalwegen ist wichtiger für den Zellhaftungsverlust bei Pemphigus als die direkte Inhibition von Dsg3 Interaktionen

Autoantikörper gegen Dsg3 führen bei Pemphigus zu einer direkten Inhibition von Dsg3 Interaktionen sowie zur Dysregulation unterschiedlicher Signalwege. Obgleich durch eine protektive Inhibition von p38MAPK der PV-IgG-induzierte Zellhaftungsverlust inhibiert werden konnte, blieb die direkte Inhibition vorhanden. Im Umkehrschluss kann also der PV-IgG-vermittelte Zellhaftungsverlust in Anwesenheit der direkten Inhibition von Dsg3 Interaktionen verhindert werden, sodass Signalwegen eine zentrale Bedeutung in der Pemphigus-Pathogenese zukommt.

In vorausgegangenen zellfreien AFM-Studien konnte gezeigt werden, dass der interzelluläre Haftungsverlust bei Pemphigus mit einer Veränderung intrazellulärer Signalwege sowie einer direkten Inhibition von Dsg3-Interaktionen durch die Autoantikörper einhergeht (Spindler et al., 2018; Spindler und Waschke, 2018). Interessanterweise konnte für Autoantikörper, die gegen Dsg1 gerichtet sind, keine direkte Inhibition in zellfreien AFM-Studien nachgewiesen werden (Waschke et al., 2005) und zudem wurde herausgestellt, dass PV-Antikörper bei 4°C keinen Zellhaftungsverlust induzieren, was zeigt dass energieaufwändige Prozesse am Zellhaftungsverlust beteiligt sind (Calkins et al., 2006). Des Weiteren wurden zahlreiche Signalwege identifiziert, die von Autoantikörpern dysreguliert werden und in Zusammenhang mit den morphologischen Kennzeichen von Pemphigus, der Dsg-Depletion und Veränderungen des Keratinzytoskeletts, stehen (Spindler und Waschke, 2014; Waschke und Spindler, 2014). Allerdings war der jeweilige Anteil der direkten Inhibition bzw. der

Dysregulation der Signalwege bisher noch nicht untersucht worden. Auch ein Nachweis der direkten Inhibition von Dsg3 Interaktionen auf Keratinozyten war noch nicht erfolgt. Dies war das Ziel der vorliegenden Studie.

Zunächst konnte mittels AFM-Bildgebung gezeigt werden, dass die filamentären Strukturen, die die Zell-Zell-Kontakte von humanen Keratinozyten überbrücken, Keratine enthalten. Daraus ergab sich die Möglichkeit frühe PV-IgG-induzierte morphologische Veränderungen mittels AFM zu detektieren. Parallel zum beginnenden Zellhaftungsverlust konnten in den ersten 2h der Autoantikörperinkubation größere Interzellularspalten sowie eine Verminderung der filamentären Strukturen an Zell-Zell-Kontaktarealen nachgewiesen werden. Es wurden nun Dsg3-Adhäsionsmessungen auf kleinen Arealen entlang der Zell-Zell-Kontakte durchgeführt. Es trat eine direkte Inhibition der Dsg3-Interaktionen auf. Interessanterweise war diese bereits 15min nach Autoantikörperinkubation nachzuweisen und voll ausgeprägt. Im Gegensatz zu den progredienten morphologischen Veränderungen gibt es hier also keinen linearen Zusammenhang zum Zellhaftungsverlust. Die Untersuchung der Membranexpression von Dsg3 zeigte hierbei, dass sowohl pathogene aDsg3-Antikörper im gegebenen Versuchsaufbau nach 30min noch nicht zu einer Verminderung von Dsg3 führen, was somit unterstreicht, dass die beobachtete Reduktion in der Bindungsfrequenz von Dsg3 auf eine direkte Inhibition der Interaktionen und nicht auf eine Depletion von Dsg3 zurückzuführen ist.

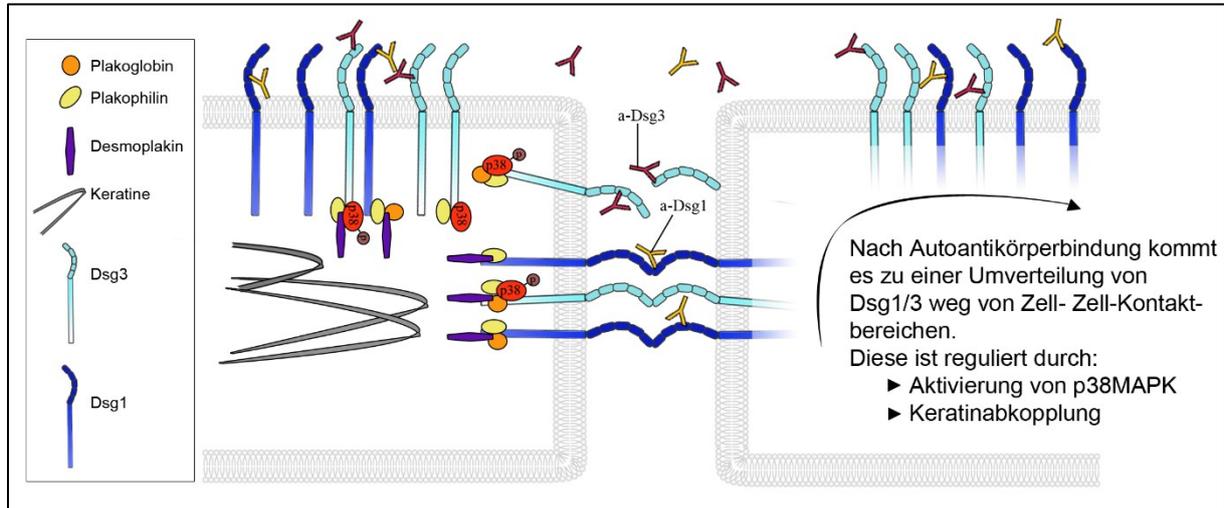
Im nächsten Schritt untersuchten wir den Einfluss von Signalwegen auf die direkte Inhibition. Für diese Versuche wurde zunächst p38MAPK als zentraler Signalweg in der Pemphiguspathogenese gewählt, da er mit den am AFM beobachteten frühen morphologischen Veränderungen der Keratinretraktion sowie der Depletion von Dsg3 in Verbindung steht (Berkowitz et al., 2008a; Berkowitz et al., 2005; Jolly et al., 2010). Eine Inhibition der PV-IgG-induzierten Aktivierung von p38MAPK mittels eines spezifischen Mediators (SB202190) konnte sowohl die frühen morphologischen Veränderungen am AFM wie auch den Zellhaftungsverlust während der ersten beiden Stunden der Autoantikörperinkubation komplett blockieren. Im Gegensatz dazu, war der Effekt auf die direkte Inhibition von Dsg3 nur klein, sodass die direkte Inhibition auch unter Inhibition von p38MAPK signifikant war. Daraus lässt sich schließen, dass die direkte Inhibition nicht alleinig dem PV-IgG-induzierten Zellhaftungsverlust zugrunde liegt.

„Lipid rafts“ sind notwendig für den Umsatz von Desmosomen und es wurde in vorausgegangenen Studien gezeigt, dass eine Zerstörung dieser Membrandomänen protektiv gegen einen PV-IgG-induzierten Zellhaftungsverlust ist (Resnik et al., 2011; Stahley et al., 2014). Wir verwendeten daher beta-Methylcyclodextrin zur Zerstörung der „Lipid rafts“ um den Effekt einer geblockten Dsg3-Depletion auf die direkte Inhibition zu untersuchen. Interessanterweise zeigen auch diese Daten, dass die Zerstörung der „Lipid Rafts“ zwar den Zellhaftungsverlust nach PV-IgG-Inkubation komplett verhindern im Gegensatz dazu aber keinen Effekt auf das Auftreten der direkten Inhibition haben.

Die Daten dieser Studie haben eine länger bestehende Kontroverse im Pemphigusfeld aufgelöst – nämlich ob eine direkte Inhibition von Dsg-Interaktionen alleinig ausreichend ist um den Zellhaftungsverlust herbeizuführen. Die aktuellen Daten zeigen deutlich, dass es zwar eine direkte Inhibition von Dsg3-Interaktionen auf lebenden Keratinozyten gibt, allerdings ist eine Modifikation von zellulären Signalwegen in der Lage auch unter diesen Bedingungen den Zellhaftungsverlust komplett zu blockieren. Daraus lässt sich ableiten, dass die direkte Inhibition nicht alleinig für den PV-IgG-induzierten Zellhaftungsverlust ausreichend ist. Dagegen unterstreichen die Daten die Wichtigkeit des p38MAPK-Signalweges sowie der Dsg3-Depletion für eine suffiziente desmosomale Haftung und ihre Dysregulation in Pemphigus (Abb. 12).

3.7. Keratine regulieren Desmoglein-Bindungseigenschaften in Pemphigus in Abhängigkeit von p38MAPK

Vielmuth et al., 2018, *Front in Immunol.* 9:528.



Modifiziert von Vielmuth et al, Minireview, *Frontiers in Immunology*, 2018

Abb. 13: Autoantikörperbindung führt zu einer Umverteilung von Dsg1 und 3 weg von Zell-Zell-Kontaktbereichen

Bei Pemphigus kommt es durch Autoantikörper zu einer direkten Inhibition von Dsg3 aber nicht von Dsg1 trans-Interaktionen auf lebenden Keratinozyten. Interessanterweise bewirken die aDsg1-Antikörper in Abhängigkeit von p38MAPK und Keratinfilamentverankerung eine Umverteilung von Dsg1 weg von Zell-Zell-Kontaktbereichen. Da für Dsg3 die Beobachtung der Umverteilung durch Autoantikörper wegen der auftretenden direkten Inhibition nicht möglich war, konnte diese nur durch Aktivierung der p38MAPK nachvollzogen werden.

Keratine spielen eine entscheidende Rolle für die Verankerung des Desmosoms und beeinflussen die Mechanik von Keratinozyten (Ramms et al., 2013). In einer vorausgegangenen Studie konnten wir weiterhin zeigen, dass Keratine die Bindungseigenschaften von Dsg3 abhängig von p38MAPK und PKC α regulieren (Vielmuth et al., 2018c). Veränderungen in der Organisation des Keratinzytoskeletts und Ablösung der Filamente vom desmosomalen Plaque sind ein morphologisches Charakteristikum bei Pemphigus (Berkowitz et al., 2005; Muller et al., 2007; Schlogl et al., 2018) wobei der Beitrag zum Zellhaftungsverlust nicht vollständig aufgeklärt ist. Ziel dieser Studie war daher den Beitrag von Keratinen zum Pemphigus-Autoantikörper-induzierten Haftungsverlust aufzuklären sowie Veränderungen der Dsg1 Bindungseigenschaften in Abhängigkeit von Keratinen und Pemphigus-Autoantikörpern zu untersuchen. Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurden WT und Keratin-defiziente Keratinozyten verwendet.

In murinen WT Keratinozyten wurde zunächst der Effekt von PV-IgG (aDsg1- und aDsg3-Autoantikörper), AK23 (pathogener aDsg3-Antikörper) und PF-IgG (aDsg1-Autoantikörper) auf das Keratinzytoskelett untersucht. In 24h induzierten alle getesteten Antikörper eine

deutliche Retraktion des Keratinzytoskeletts sowie einen signifikanten Zellhaftungsverlust. Im Gegensatz dazu konnte in Keratin-defizienten Keratinozyten, die bereits unter basalen Bedingungen eine stark kompromittierte Zellhaftung zeigen, kein signifikanter Effekt der pathogenen Autoantikörper nachgewiesen werden.

Weiterhin wurden parallele Dsg1- und 3 Adhäsionsmessungen an den gleichen Zellgrenzen in WT und Keratin-defizienten Keratinozyten durchgeführt. Wie zuvor gezeigt, weisen Keratin-defiziente Keratinozyten eine erhöhte Bindungsfrequenz von Dsg3, allerdings verminderte Einzelmolekülinteraktionskräfte auf (Vielmuth et al., 2018c). Im Unterschied dazu zeigen sie weniger Dsg1-abhängige Bindungsereignisse, die sich allerdings im Hinblick auf ihre Bindungskräfte nicht unterscheiden. Des Weiteren zeigen Dsg1-Bindungsereignisse ein vermehrtes Auftreten an Zell-Zell-Kontakten. Diese Verdichtung geht in den Keratin-defizienten Keratinozyten verloren. Diese Daten zeigen also, dass Keratine differenziell die Bindungseigenschaften der Pemphigus-Antigene Dsg1 und 3 regulieren. Im nächsten Schritt untersuchten wir den möglichen Einfluss der Keratine auf die Autoantikörper-induzierte direkte Inhibition von Dsg3 Interaktionen. Obgleich die Dsg3-Depletion in den Keratin-defizienten Keratinozyten beschleunigt abläuft, konnte kein Unterschied im Hinblick auf die direkte Inhibition von Dsg3-Interaktionen detektiert werden. Dabei ist die beschleunigte Dsg3 Depletion nach unserer Auffassung auf eine erhöhte Mobilität der Dsg3 Moleküle zurückzuführen, die sowohl bei Keratindizienz als auch nach Keratinfilamentretraktion im WT auftritt.

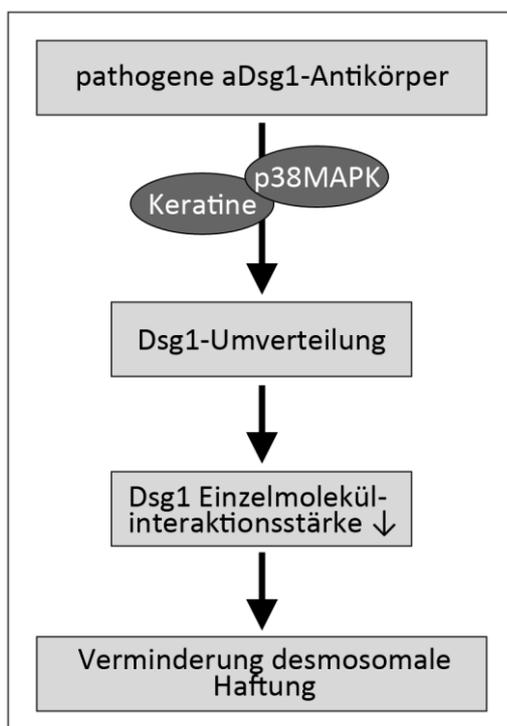


Abb. 14: Sequenz der Wirkung pathogener aDsg1-Antikörper bei Pemphigus

Im Gegensatz zu Dsg3 tritt für Dsg1 durch Autoantikörper keine direkte Inhibition auf, was bisher allerdings nur in zell-freien AFM-Untersuchungen gezeigt wurde (Waschke et al., 2005). Im nächsten Schritt untersuchten wir daher das Auftreten einer direkten Inhibition von Dsg1 Interaktionen auf Keratinozyten. In Übereinstimmung mit den Vordaten, induzierten sowohl PF-IgGs als auch PV-IgGs (mit pathogenen aDsg1-Antikörpern) in WT Keratinozyten keine direkte Inhibition. Obgleich sich die detektierte Dsg1-Bindungsfrequenz nicht unterscheidet, kommt es aber zu einer Umverteilung von Dsg1 weg von Bereichen der Zell-Zell-Kontakte, sodass die Dsg1-Verteilung dann dem Bild in Keratin-defizienten Keratinozyten entspricht (Abb. 13, 14). In Keratin-defizienten Keratinozyten kommt es zudem bereits nach 1h Inkubation mit pathogenen aDsg1-Antikörpern zu einer Verminderung der Dsg1-Interaktionsstärke, die im WT erst nach 24h Inkubation zu beobachten ist. Aus den Daten lässt

sich daher eine Sequenz ableiten, in der es nach pathogenen aDsg1-Antikörpern abhängig von Keratinen zu einer Umverteilung von Dsg1 auf der Zelloberfläche weg von den Zellgrenzen kommt. Diese Umverteilung geht einer Verminderung der Einzelmolekülinteraktionsstärke von Dsg1 voraus. Somit konnte eine Sequenz aufgezeigt werden, mittels welcher aDsg1-Autoantikörper zum Zellhaftungsverlust bei Pemphigus auf dem Level von Einzelmolekülinteraktionen beitragen, ohne jedoch eine direkte Inhibition der Interaktionen auszulösen (Abb. 14).

Darauf abgeleitet ergab sich die Frage, ob diese Sequenz, insbesondere die Umverteilung auch für Dsg3 auftreten. Da hier Pemphigus-Autoantikörper zu einer direkten Inhibition führt, konnte die Sequenz hier nicht direkt untersucht werden. Da allerdings bekannt ist, dass Autoantikörper zu einer Aktivierung von p38MAPK führen (Berkowitz et al., 2008a; Berkowitz et al., 2008b; Berkowitz et al., 2005; Berkowitz et al., 2006) und eine durch Mediatoren induzierte Aktivierung von p38MAPK zu ähnlichen morphologischen Veränderungen wie Pemphigus-Autoantikörper führen, wählten wir nachfolgend den p38MAPK-Aktivator Anisomycin, um die Sequenz für Dsg3 zu untersuchen. In der Tat führte Anisomycin zu einer Retraktion des Keratinzytoskeletts vergleichbar zu den Pemphigus-Autoantikörpern sowie zu einem signifikanten Zellhaftungsverlust. Passend zu den vorherigen Versuchen führte eine Aktivierung von p38MAPK ebenfalls zu einer Umverteilung von Dsg1 weg von Arealen der Zell-Zell-Kontakte sowie zu einer sequenziellen Reduktion der Dsg1-Einzelmolekülinteraktionskräfte. Interessanterweise kam es ebenfalls zu einer ähnlichen Umverteilung von Dsg3 wobei hier keine Unterschiede in den Bindungskräften gezeigt werden konnten. Diese Daten deuten zum einen an, dass die Umverteilung nach Autoantikörperbindung Dsg1 und 3 betrifft, zum anderen weisen sie auf eine Beteiligung von p38MAPK hin (Abb. 13). Im nächsten Schritt wurden daher ein Mediator (SB202190) eingesetzt, der p38MAPK inhibiert. Inhibition von p38MAPK konnte den Autoantikörper-induzierten Zellhaftungsverlust in WT Zellen verhindern und auch in Keratin-defizienten Keratinozyten die Zellhaftung nahezu auf WT-Level verbessern. Wir verwendeten nun den gleichen Inhibitor zusammen mit pathogenen Dsg1-Antikörpern (PF-IgG) in WT und Keratin-defizienten Keratinozyten. Hierbei zeigte sich, dass eine Inhibition von p38MAPK die PF-IgG-induzierte Umverteilung von Dsg1 blocken kann und in Keratin-defizienten Zellen zu einer Verteilung von Dsg1 vergleichbar zum WT führt.

Zusammengefasst zeigen die Daten dieser Studie also, dass Keratine die Bindungseigenschaften desmosomaler Cadherine differentiell regulieren. Eine direkte Inhibition der Dsg-Interaktionen durch Pemphigus-Autoantikörper tritt auf Keratinozyten nur für Dsg3 nicht aber für Dsg1 auf. Dysregulation des p38MAPK-Signalwegs sowie Veränderungen des Keratinzytoskeletts durch Pemphigus-Autoantikörper tragen durch Modulation der Verteilung von Dsg1 und 3 bzw. ihrer Veränderungen ihrer Bindungseigenschaften zum Zellhaftungsverlust bei. Des Weiteren wird hier die Bedeutung der Untersuchung pathomechanistischer Veränderungen auf Ebene von Einzelmolekülinteraktionen mittels AFM bei Pemphigus deutlich.

3.8. Eine Dsg2-Hochregulation stellt einen Kompensationsmechanismus gegen den Autoantikörper-vermittelten Zellhaftungsverlust bei Pemphigus dar

Sigmund et al., 2020, *Front Immunol.* Oct 28;11:581370

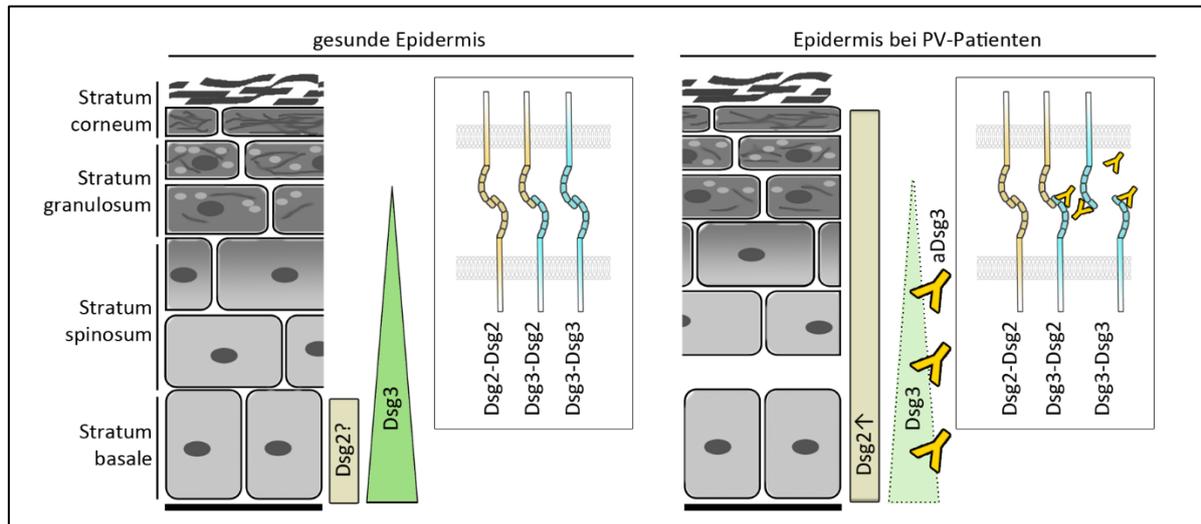


Abb. 15: Dsg2 wird als Kompensationsmechanismus in Hautläsionen von Pemphigus Patienten hochreguliert.

In gesunder Epidermis kommt Dsg2 allenfalls in kleinen Mengen in der Basalzellschicht sowie in Haarfollikeln vor. Dsg3 kann ungehindert homophil mit Dsg3 interagieren. Eine heterophile Interaktion zu Dsg2 ist möglich. In der Epidermis von PV-Patienten wurde eine Hochregulation von Dsg2 beobachtet. Bei Pemphigus kommt es durch Autoantikörper gegen Dsg3 zu einer direkten Behinderung der homophilen Dsg3-Interaktionen. Heterophile Dsg2-Dsg3 Interaktionen werden durch Dsg3-Autoantikörper weniger behindert. Dsg2 kann daher als zellulärer Kompensationsmechanismus den PV-IgG-vermittelten Zellhaftungsverlust abmildern.

Dsg2 wird in gesunder humaner Haut kaum oder nicht exprimiert (Hartlieb et al., 2013). Vorausgegangene Studien berichten allerdings eine Hochregulation von Dsg2 in Läsionen von PV-Patienten (Iwatsuki et al., 1999) und einen gegenläufigen Zusammenhang von Dsg2 und 3 Expression in oralen spinoszellulären Karzinomen (Teh et al., 2011). Auch *in vitro* konnte ein Zusammenhang von Dsg2 und 3 Expression herausgestellt werden. So zeigen Dsg3-defiziente murine Keratinozyten eine erhöhte Membranlokalisation von Dsg2 (Hartlieb et al., 2013; Hartlieb et al., 2014). Auch Daten aus Keratin-defizienten Keratinozyten deuten an, dass Dsg2 in Situationen mit kompromittierter Haftung von Dsg3 kompensierend wirken kann (Vielmuth et al., 2018c).

In dieser Studie haben wir daher das Auftreten eines Dsg2-abhängigen Kompensationsmechanismus in Patientenproben sowie einem humanen *ex vivo* Hautmodell untersucht. Des Weiteren wurden die biophysikalischen Eigenschaften einer heterophilen Dsg2-Dsg3 Interaktion untersucht und mit den entsprechenden homophilen Interaktionen verglichen.

Zunächst konnte im humanen *ex vivo* Pemphigus-Hautmodell gezeigt werden, dass PV-IgGs eine Hochregulation von Dsg2 induzieren. Weiterhin wurde die Epidermis von mehreren Pemphigus-Patienten untersucht. Hierbei konnte bei der Hälfte der Patienten eine signifikante Hochregulation von Dsg2 in periläsionaler Epidermis gefunden werden.

Im nächsten Schritt wurde die heterophile Interaktion von Dsg2 und Dsg3 mittels Immunopräzipitation (IP) und AFM untersucht. In humanen Keratinozyten konnte mittels IP eine direkte Interaktion von Dsg2 und 3 nachgewiesen werden. In zell-freien AFM Untersuchungen wurden nun die Bindungseigenschaften der heterophilen Dsg2-Dsg3 mit den homophilen Interaktionen verglichen. Hierbei ergaben sich keine Unterschiede im Hinblick auf Bindungsfrequenz, Bindungskraft und Ca^{2+} -Abhängigkeit. Allerdings war die „bond lifetime“ der heterophilen Interaktion deutlich höher als die der homophilen Dsg2 Interaktion. Gleich der homophilen Interaktionen verhielten sich auch die heterophilen Dsg2-Dsg3 Interaktionen wie catch-bonds. Weiterhin untersuchten wir den Einfluss von AK23, einem monoklonalen aDsg3-Antikörper aus einem Pemphigus Mausmodell (Tsunoda et al., 2003) sowie von PV-IgGs auf die jeweiligen Interaktionen. Während die homophile Dsg3-Dsg3 Interaktion durch AK23 bzw. PV-IgGs direkt inhibiert wurde, waren heterophile Dsg2-Dsg3 Interaktionen deutlich weniger von direkter Inhibition betroffen.

In Zusammenschau sprechen diese Befunde für einen Kompensationsmechanismus bei Pemphigus, der auf heterophilen Dsg2-Dsg3 Interaktionen beruht.

3.9. Der PDE4-Hemmer Apremilast verhindert den Pemphigus-Autoantikörper-induzierten Zellhaftungsverlust von Keratinozyten *in vitro* und *in vivo*

Sigmund et al, 2023, *Nat Commun.* Jan 9;14(1):116.

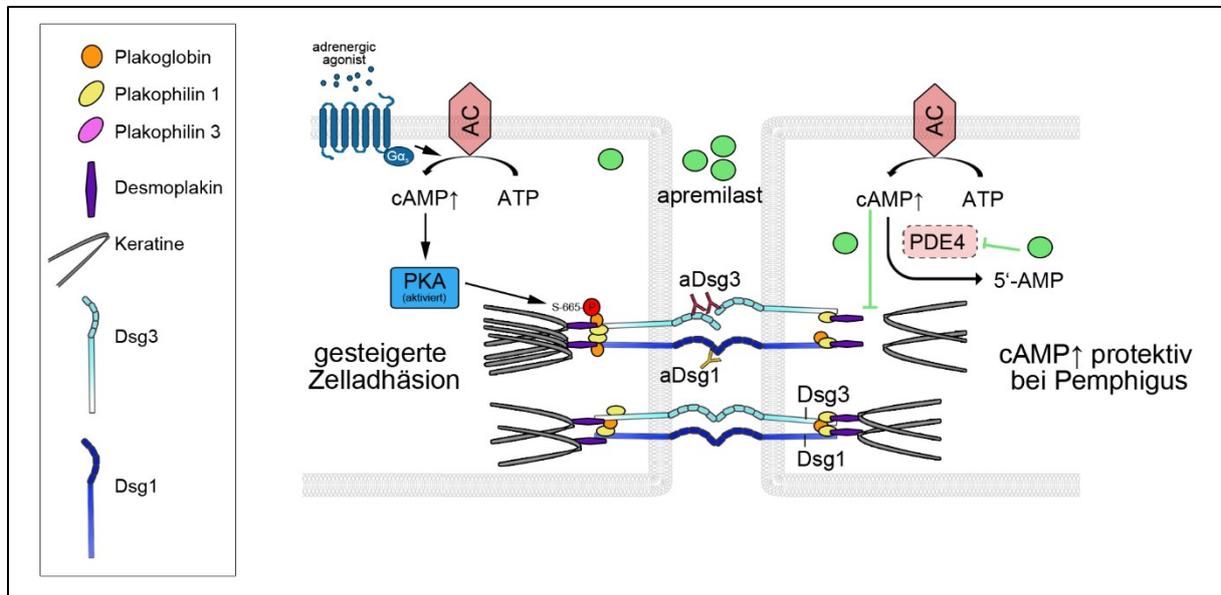


Abb. 16: Apremilast stärkt durch eine cAMP Erhöhung in Keratinozyten die desmosomale Haftung und wirkt protektiv gegen den PV-IgG-vermittelten Haftungsverlust

Aus vorausgegangenen Studien war bekannt, dass eine Erhöhung des cAMP Spiegels etwa durch direkte Aktivierung der Adenylatcyclase oder β -adrenerger Stimulation zu einer Steigerung der desmosomalen Haftung führt und protektiv gegen den Zellhaftungsverlust bei Pemphigus wirkt. Der PDE4-Hemmer Apremilast, der bei Patienten eingesetzt werden könnte, führt ebenfalls zu einer Erhöhung der cAMP Spiegel in Keratinozyten und wirkt über eine Phosphorylierung von Pg an S665 durch eine Verminderung der PV-IgG-induzierten Keratinretraktion. AC: Adenylatcyclase, PKA: Proteinkinase A, ATP: Adenosintriphosphat, AMP: Adenosinmonophosphat

Bei Pemphigus agieren Dsg1 und 3 als Signalüberträger und es wurden Dsg-spezifische Signaling-Muster identifiziert (Schmitt und Waschke, 2021; Walter et al., 2017; Walter et al., 2019). Viele der beschriebenen involvierten Signalwege tragen zum Zellhaftungsverlust bei, etwa die Aktivierung von p38MAPK, PKC, Ca^{2+} -Signaling, Src und Erk (Berkowitz et al., 2005; Burmester et al., 2020; Egu et al., 2019; Kugelmann et al., 2019b; Walter et al., 2017). Dagegen konnten wir in einer vorausgegangenen Studie zeigen, dass es sich bei cAMP um einen zellulären Rettungsmechanismus handelt. Pemphigus Autoantikörper induzieren einen leichten cAMP Anstieg, der, wenn er pharmakologisch verstärkt wird, den PV-IgG-vermittelten Zellhaftungsverlust verhindert (Spindler et al., 2010). Des Weiteren stärkt cAMP auch die Cadherin-vermittelte Haftung in weiteren Geweben, wie dem Endothel und dem Herz, wobei es hierbei in Kardiomyozyten zu einer Phosphorylierung von Pg an Serin 665 kommt (Schinner et al., 2017; Vielmuth et al., 2023). Allerdings waren die zunächst genutzten Mediatoren durch erwartbare schwere Nebenwirkungen nicht für eine Translation in den Patienten denkbar. Ziel dieser Studie war es daher die Effektivität des PDE4-Inhibitors Apremilast bei Pemphigus zu

testen und die Mechanismen des adhäsionsstabilisierenden Effekts einer cAMP-Erhöpfung in Keratinozyten zu untersuchen.

Apremilast induziert in Keratinozyten einen deutlichen cAMP Anstieg, allerdings geringer als die vormals genutzten Mediatoren (Sigmund et al., 2023; Spindler et al., 2010). Durch Applikation in *ex vivo* humaner Haut konnte gezeigt werden, dass Apremilast die PV-IgG-vermittelte Blasenbildung effektiv hemmt. Außerdem blockiert es selbst in einer deutlich geringeren Dosierung, die auch im Patienten angewendet werden kann (https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/otezla-epar-product-information_de.pdf), die Blasenbildung im neonatalen Pemphigus-Mausmodell.

Auch *in vitro* in humanen Keratinozyten (HaCaT und NHEK) konnte Apremilast den PV-IgG-vermittelten Zellhaftungsverlust blockieren. Interessanterweise normalisiert Apremilast die PV-IgG-induzierte Keratinfilamentretraktion, jedoch nicht die Dsg-Depletion. Passend hierzu, zeigt sich ultrastrukturell im humanen *ex vivo* Modell, dass Apremilast die veränderte Keratininsertion normalisiert, jedoch nicht die Anzahl und Länge der Desmosomen und die Dsg3 Einzelmolekülbindungseigenschaften.

Im nächsten Schritt sollte der protektive Mechanismus einer cAMP-Erhöpfung bei Pemphigus genauer untersucht werden. Hierzu wurden zunächst die vorherigen Beobachtungen aus Kardiomyozyten aufgegriffen und die PKA-abhängige Phosphorylierung von Pg an Serin 665 untersucht. In der Tat kam es durch Apremilast auch in Keratinozyten zu dieser Phosphorylierung an Pg. Um den Einfluss dieser Phospho-Seite für die Integrität der Epidermis und den Zellhaftungsverlust bei Pemphigus zu untersuchen, wurde nachfolgend ein Mausmodell etabliert, bei welchem in Pg das Serin an Stelle 665 durch ein Alanin ersetzt wurde und somit eine Phosphodefizienz an dieser Stelle induziert wird. Obgleich sie die grundlegende Morphologie der Epidermis der Pg-phosphodefizienten Mäuse (Pg-S665A) nicht vom WT unterschied, zeigte sich eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber mechanischer Belastung sowie deutliche Unterschiede in der Charakterisierung der desmosomalen Proteine. Insbesondere waren Dsg1, Dsc1 und Dsg3 drastisch reduziert und fragmentiert an den Zellgrenzen, was die Wichtigkeit der Phospho-Seite für die Lokalisation der desmosomalen Cadherine zeigt. Zudem war, passend zu den Vordaten zu Pemphigus, die Keratinfilamente drastisch verändert. Keratinozyten, die aus dem Mausmodell gewonnen wurden, zeigten sich ebenfalls drastische Veränderungen in Dsc1 und Dsg1, während andere Proteine wie etwas Loricrin als Differenzierungsmarker bzw. E-Cad als Marker für Adhärensjunktionen, nicht verändert waren. Die Pg-S665A murinen Keratinozyten zeigten zudem einen deutlichen Zellhaftungsverlust und das Keratinnetzwerk war auch in den Zellen sehr stark verändert und erschien in den Pg-S665A Zellen ausgedünnt und irregulär. In diesen Zellen hatte AK23 keinen additiven Effekt auf die Zellhaftung aber auch Apremilast zeigte keinen Nutzen mehr.

Zusammenfassend kann daraus abgeleitet werden, dass die Pg-Phosphorylierung an S665 bedeutsam für eine adäquate interzelluläre Adhäsion von Desmosomen sowie der Organisation des Keratinytoskeletts ist. Abschließend wurde zudem untersucht wie cAMP den desmosomalen Umsatz reguliert. Ca^{2+} -Austauschexperimente (Kugelman et al., 2019b) wurden genutzt um die Assemblierung der Desmosomen zu synchronisieren und Untersuchungen nach 8h und 24h in der Anwesenheit von Apremilast durchzuführen. Dabei

deutete sich an, dass Apremilast die Dp Rekrutierung an sich neubildenden Desmosomen reguliert, wobei in parallelen FRAP-Experimenten die „recovery halftime“ nach Apremilast in WT aber nicht in Pg-S665A reduziert war, was zu einer verstärkten Assoziation von Dsg3 an der Membran durch die Pg-vermittelte Zytoskelettverankerung passt.

Zusammenfassend konnte diese Studie einen therapeutischen Ansatz bei Pemphigus identifizieren, der direkt an der Keratinozytenadhäsion ansetzt. Da Apremilast bereits für den Einsatz bei Psoriasis und Behcet-Erkrankung klinisch erprobt ist (Keating, 2017; Torres und Puig, 2018) und auch bei refraktären Pemphigus „off-label“ bereits mit Erfolg eingesetzt wurde (Meier et al., 2020), stellt dies einen erfolgversprechenden neuen Ansatz in der Pemphigus-Therapie dar. Darüber hinaus konnte für die Phosphorylierung von Pg an S665 gezeigt werden, dass die entscheidend zur Integrität der Epidermis und der Haftung von Keratinozyten beiträgt.

3.10. Pemphigus-Autoantikörper induzieren eine Blasenbildung in humaner Konjunktiva

Vielmuth et al., 2016, *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 57(10):4442-9.

Eine Blasenbildung an der Haut sowie der Mundschleimhaut ist das typische klinische Erscheinungsbild der blasenbildenden Autoimmundermatose Pemphigus. Allerdings wurde in verschiedenen Studien immer wieder auf eine okuläre Beteiligung hingewiesen, die zumeist als Konjunktivitis diagnostiziert und für welche diskutiert wurde, dass diese mit der Schwere der Erkrankung korreliert (Akhyani et al., 2014; Balica et al., 2013). Da der zugrundeliegende Mechanismus der Augenbeteiligung bei Pemphigus allerdings bisher nicht charakterisiert wurde, haben wir in dieser Studie untersucht wie es zur Konjunktivitis bei Pemphigus kommt. Insbesondere sollte herausgestellt werden, ob die Autoantikörper auch hier eine Blasenbildung induzieren oder es vielmehr zu einer Superinfektion kommt.

Dsg3 KO Mäuse weisen einen PV-Phänotyp mit suprabasaler Blasenbildung in der oralen und ösophagealen Mukosa auf (Koch et al., 1997). Interessanterweise konnten wir bei 43% von diesen Dsg3 KO Mäusen (B6, 129X-Dsg3^{tm1Stan}/J mice, Jackson Laboratory) in unserer Zucht ebenfalls einen Augenphänotyp beobachten, der sich mit geröteter Konjunktiva und verklebten Augenlidern darstellte. Wir untersuchten daher die komplette Augenhistologie dieser Tiere und verglichen diese mit ihren WT Geschwistertieren. Die Gesamtstruktur der Augen war nicht verändert und es konnten keine Anzeichen einer Infektion beobachtet werden. Allerdings zeigten sich Spaltbildungen in der Kornea sowie in der Konjunktiva, die an einen PV-Phänotyp erinnern, was einen weiteren Anhaltspunkt für einen Augenphänotyp bei Pemphigus als direkte Folge der Dsg3-Autoantikörperbindung darstellt.

Wir charakterisierten nun die Expressionsmuster desmosomaler Proteine in humaner Konjunktiva. Hierbei zeigte sich ein Expressionsmuster, dass an die Epidermis erinnert. In Übereinstimmung waren Dsg3 und Dsc3 vermehrt in den basalen Schichten zu sehen, während Dsg1 in den oberflächlichen Schichten eine stärkere Expression auswies. Im Unterschied zur Epidermis konnten wir allerdings kein Dsc1 detektieren, dafür war ein positives Signal für Dsg2 zu erkennen. Auch Pg und Dp waren vergleichbar mit der Epidermis in allen Schichten detektierbar, ebenso das klassische Cadherin, E-Cad. Im nächsten Schritt etablierten wir ein humanes *ex vivo* Konjunktiva-Modell was die Möglichkeit bot, humane Konjunktiva des gleichen Spenders mittels Kontroll-IgG oder PV-IgG zu behandeln. Unter Kontroll-IgG-Inkubation beobachteten wir eine intakte Morphologie der Konjunktiva. Dagegen trat in Proben, die mit PV-IgG inkubiert wurden, eine für PV typische suprabasale Blasenbildung auf. Auch konnte eine direkte Bindung der Autoantikörper an die humane Konjunktiva nachgewiesen werden.

Die Depletion von Dsg1 und Dsg3 infolge der Autoantikörperbindung gehört zu den morphologischen Charakteristika der Pemphigus-Pathogenese in der Epidermis (Spindler et al., 2018; Spindler und Waschke, 2018). Um zu untersuchen ob ähnliche Mechanismen auch der Blasenbildung in der Konjunktiva zugrunde liegen, wurde auch hier Dsg1 und 3 gefärbt. Tatsächlich beobachteten wir auch in der Konjunktiva eine deutliche Depletion von Dsg1 und Dsg3. Weiterhin stellen die Aktivierung von p38MAPK und dessen nachgeschaltetes

Zielmolekül bei Pemphigus MK2 einen entscheidenden Signalweg für den Zellhaftungsverlust bei Pemphigus in der Epidermis dar (Berkowitz et al., 2008b; Egu et al., 2017). Die Untersuchung dieses Signalweges bestätigte die Aktivierung dieses Signalweges auch in humaner Konjunktiva. In Übereinstimmung mit diesen Daten war auch in den Dsg3-KO Mäusen in läsionalen Bereichen eine entsprechende Aktivierung von p38MAPK und MK2 zu beobachten.

In Zusammenschau zeigen diese Daten also, dass es in der Konjunktiva durch vergleichbare Mechanismen wie in der Epidermis, die die Depletion von Dsg1 und Dsg3 von der Zellmembran sowie die Aktivierung von p38MAPK umfassen, zu einer suprabasalen Spaltbildung infolge der Pemphigus-Autoantikörper kommt. Die aktuelle Studie liefert somit einen Hinweis darauf, dass eine konjunktivale Blasenbildung den in der Literatur beschriebenen Augenphänotyp bei Pemphigus auslöst.

4. Diskussion

4.1. AFM Studien tragen zur Aufklärung der Interaktionsmechanismen desmosomaler Cadherine und ihrer Regulation bei

4.1.1. Desmosomale Cadherine interagieren homo- und heterophil

Desmosomale Cadherine gehen homo- und heterophile Interaktionen ein. Ihr Vorkommen als 7 Isoformen mit einer gewebespezifischen sowie in mehrschichtigen Epithelien differenzierungsabhängigen Expression (Waschke, 2008) legt nahe, dass die unterschiedlichen Isoformen verschiedene zelluläre Funktionen erfüllen, was auch eine Implikation für unterschiedliche Interaktionspartner und Mechanismen andeutet.

AFM-Studien leisten einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der Interaktionsmechanismen desmosomaler Cadherine, da sie funktionelle biophysikalische Daten in biologischen Systemen unter nahezu physiologischen Bedingungen und auf Einzelmolekülebene erbringen (Vielmuth et al., 2018a). Dies ist insbesondere von Bedeutung, da die komplette Aufklärung der Kristallstruktur desmosomaler Cadherine schwierig bleibt. Daher beziehen sich viele Modellierungsdaten auf die Struktur von C-Cadherin (Boggon et al., 2002) oder leiten sich insgesamt von Daten klassischer Cadherine ab (Brasch et al., 2012; Harrison et al., 2010). In einer Studie von Harrison et al. aus 2016 konnten die glykosylierten Ektodomänen von humanen Dsg2, Dsg3 und Dsc1 dargestellt werden, die eine elongierte, gekrümmte Struktur von benachbarten EC-Domänen die über Ca^{2+} -bindenden Verbindungsregionen verknüpft sind (Harrison et al., 2016).

Auch die Modellierung der Interaktionsmechanismen isolierter Proteine aber insbesondere ihre Interaktion unter physiologischen Bedingungen im Desmosom bleiben stark umstritten.

Klar ist, dass desmosomale Cadherine ähnlich zu klassischen Cadherinen Ca^{2+} -abhängig interagieren (Chitaev und Troyanovsky, 1997; Syed et al., 2002). Dies konnte auch mittels AFM unter zellfreien Bedingungen für unterschiedliche homo- und heterophile Interaktionen gezeigt werden und für Dsg3 auch auf Zellen bestätigt werden (Heupel et al., 2008; Sigmund et al., 2020; Spindler et al., 2009; Vielmuth et al., 2015a; Waschke et al., 2007). Außerdem scheint für die Interaktion in trans ein ähnlicher Mechanismus wie für klassische Cadherine aufzutreten. Dieser basiert auf einer Verbindung der EC1-Domänen durch einen gegenseitigen Austausch von einem N-terminalen Strang der eine Seitenkette mit einem konservierten Tryptophan Residuum an Position 2 trägt und in eine hydrophobe Bindungstasche des gegenüberliegenden Partners bindet (Brasch et al., 2012; Harrison et al., 2010; Harrison et al., 2016; Priest et al., 2019). Diese Residuen sind zwischen klassischen und desmosomalen Cadherinen konserviert (Thomason et al., 2010). Dazu passt, dass sich auch Interaktionen zwischen desmosomalen Cadherinen mittels L-Tryp blockieren lassen (Fuchs et al., 2022; Schlipp et al., 2014). Trans-Interaktionen zwischen 2 Interaktionspartnern von gegenüberliegenden Zellen können als sogenannte „X-Dimers“ und „Strand-Swap dimers“ auftreten (Harrison et al., 2010; Harrison et al., 2016). „Strand-swapped“ Homodimere, die

durch die jeweiligen EC-Domänen 1 gebildet werden, wurden für Dsg2 und Dsc1 nachgewiesen.

Allerdings legt man das Tryp2-swap Modell zugrunde in welchem ein Tryp2 Seitenkette hydrophobe Interaktionen mit den Residuen Ile/Val24, Typ36, Ala80 und Leu92 (Nummerierung nach Dsc1) an einer hydrophoben Tasche des gegenüberliegenden Moleküls binden. Daneben binden Indol-Nitrogen-Reste an das Carboxyl-Rückgrat vom Residuum 90 und es treten ionische Wechselwirkungen mit aziden Seitenketten von Asp72 und Glu89 auf. Den heterophilen Interaktionen soll ein ähnlicher Interaktionsmechanismus zugrunde liegen (Harrison et al., 2016). In einer weiteren Studie wurden W-, S- und λ -förmige Konfigurationen beobachtet, die einen wechselseitigen Tryp-Swap als Interaktionsmechanismus nahe legen zusätzlich jedoch auch eine einseitige Insertion des Tryp eines Moleküls in die hydrophobe Tasche eines benachbarten Moleküls unter Umständen auch im Hinblick auf eine cis-Interaktion andeuten (Al-Amoudi und Frangakis, 2008).

Passend zu diesen Daten, führt eine Mutation an diesem Tryptophan (W2A) zu einem Verlust der Haftungen in trans, was vielfach für klassische (Prakasam et al., 2006) und mittlerweile auch für desmosomale Cadherine gezeigt werden konnte (Lowndes et al., 2014; Schinner et al., 2022), wobei beispielsweise eine veränderte Ordnung von Dsg3-W2A beschrieben wurde (Bartle et al., 2020). Neuere Daten legen zudem nahe, dass auch Interaktionen über die EC2-Domäne kritisch für eine starke Haftung sind (Al-Amoudi et al., 2007; Sikora et al., 2020).

In Abhängigkeit der Bindungskonformation als „X-Dimer“ oder „Strand-Swap-Dimer“ wurden für Cadherine „catch“- , „slip“ und „ideale“ Bindungen beschrieben (Rakshit et al., 2012). Während bei „slip“ bonds auseinanderweichen, wenn mechanische Belastung auf sie ausgeübt wird, steigt bei „catch“ und „idealen“ Interaktionen die Bindungskraft mit dem applizierten Kraft. Die Bindungskräfte der homo- und heterophilen Interaktionen steigen in unseren AFM Studien vergleichbar mit jenen von klassischen Cadherinen mit steigender Loadingrate an (Baumgartner et al., 2003; Baumgartner et al., 2000; Bell, 1978; Evans und Ritchie, 1997). Dies spricht eher für die Formung von „X-Dimers“, die „Catch-bonds“ zugrunde liegen. Allerdings wurden in einigen Studien auch Hinweise auf „Strand-swap“ Dimere gefunden, die eher für „slip bonds“ sprechen würden (Dieding et al., 2017; Rakshit und Sivasankar, 2014; Rakshit et al., 2012).

Um die Interaktionspartner verschiedener desmosomaler Cadherine zu untersuchen, wurden neben dem AFM verschiedene weitere Methoden eingesetzt, die unterschiedliche Ergebnisse erzielten. Die vorliegenden Daten mittels AFM auf lebenden Zellen sprechen dafür, dass dort unter physiologischen Bedingungen überwiegend homophile Interaktionen von Dsg1, Dsg2 und Dsg3 auftreten (Fuchs et al., 2022; Vielmuth et al., 2015a; Vielmuth et al., 2018b; Vielmuth et al., 2018c; Vielmuth et al., 2015b). Passend dazu wurden mittels Quervernetzungs-Experimenten prädominant homophile Interaktionen von desmosomalen Cadherinen in Keratinozyten nachgewiesen (Nie et al., 2011). Auch in einer Studie zu Dsg2 Interaktionen und dem Einfluss von Mutationen an Dsg2 die zu ARVC führen, konnten eindeutig homophile Dsg2 Interaktionen nachgewiesen werden (Dieding et al., 2017).

Im Unterschied dazu wurden in Beadassays nur geringe Affinitäten für homophile Interaktionen beobachtet. Die Homodimere traten v.a. bei hohen Proteinkonzentrationen auf, was aber unter Umständen der dichten Packung im Desmosom ähnelt (Harrison et al., 2016). Passend dazu können in diesen Bead-basierten Studien zahlreiche heterophile Interaktionen detektiert werden (Harrison et al., 2016; Ishii et al., 2020). Hingegen lieferten unsere AFM Daten ein deutlich komplexeres Bild. Wir detektierten heterophile Interaktionen von verschiedenen Isoformen desmosomaler Cadherine untereinander (Fuchs et al., 2022; Sigmund et al., 2020; Vielmuth et al., 2018c), aber auch zu klassischen Cadherinen und weiteren Molekülen wie EGFR (Fuchs et al., 2022; Ungewiss et al., 2018). So wurden beispielsweise heterophile Interaktionen zwischen Dsg1 und Dsc3 gefunden aber nicht von Dsg1 und Dsg3 (Spindler et al., 2009; Vielmuth et al., 2018c). Besonders interessant ist die ebenfalls auftretende heterophile Interaktion von Dsg2 und Dsg3, die im nächsten Abschnitt genauer erläutert wird.

Im Gegensatz zu der Studie von Nelson et al, die nur homophile Dsc2, aber keine homophilen Dsg2 Interaktionen, konnten wir in unseren Studien sowohl für die homophilen Dsg2 wie auch heterophile Dsg2 Interaktion zu klassischen und desmosomalen detektieren, die alle Ca^{2+} -abhängig waren (Fuchs et al., 2022; Lowndes et al., 2014). Auch hier gibt es widersprechende Studien in welchen homophile Dsg2 Interaktionen nicht abhängig von Ca^{2+} waren (Lowndes et al., 2014). In unseren Studien sahen wir einen deutlich inhibitorischen Effekt von EGTA auf homophile Dsg2 Interaktionen. Die verbliebenen Interaktionen ließen sich auch durch das inhibitorische „Singlepeptid“ nicht weiter reduzieren, was andeutet, dass es sich hierbei um unspezifische Interaktionen handelt (Fuchs et al., 2022)

Zur Verifizierung der jeweiligen homo- und heterophilen Interaktionen wurden Inhibitionsversuche mit spezifischen Antikörpern durchgeführt, die die jeweiligen Interaktionen suffizient blockieren konnten (Fuchs et al., 2022; Vielmuth et al., 2018c). Für die homophilen Dsg1 und Dsg3 Interaktionen konnte dies auch auf lebenden Keratinozyten gezeigt werden, was das biologische Vorkommen der homophilen Interaktionen nahe legt (Vielmuth et al., 2015a; Vielmuth et al., 2018b; Vielmuth et al., 2018c). Wir glauben daher, das in lebenden Zellen unterschiedliche Interaktionsmechanismen unter verschiedenen biologischen Umständen auftreten, die jeweils vorteilhaft für die Adhäsion der Zellen unter diesen Bedingungen sind. So ist beispielsweise die heterophile Dsg2-E-Cad Interaktion wichtig für die Desmosomenassemblierung (Shafray et al., 2018) und die heterophile Dsg2-Dsg3 Interaktion als Rettungsmechanismus bei kompromittierter Dsg3 vermittelter Haftung (Sigmund et al., 2020).

Die unterschiedlichen Befunde lassen sich unter Umständen mit der unterschiedlichen Methodik erklären, die sich im Hinblick auf die applizierte mechanische Belastung unterscheiden. Allerdings wurde gerade die mechanische Belastung als grundlegend für die Funktion von Zelladhäsionsstrukturen herausgestellt (Buckley et al., 2014; Daday et al., 2017; Price et al., 2018; Sadhanasatish et al., 2023). Das AFM stellt dabei ein dynamisches System dar, welches eine mechanische Belastung appliziert, was bei Bead-basierten Experimenten nicht der Fall ist. Einen wichtigen Unterschied könnte auch die Verwendung von Fc-Konstrukten im Vergleich zu einfachen Proteinen sein.

Obgleich die Vorteile der AFM Methodik aus den vorbeschriebenen Befunden hervorgeht, muss im Folgenden auch auf die Limitationen eingegangen werden. Zunächst muss angemerkt werden, dass es auch mittels Rasterkraftmikroskopie vielleicht nicht möglich ist, die Bindungseigenschaften von desmosomalen Cadherinen zentral im dicht gepackten Desmosom zu detektieren. Allerdings deuten die hier gefundenen höheren Bindungskräfte von Dsg3 an den Zellgrenzen im Vergleich zur freien Zelloberfläche an sowie die unterschiedliche Verankerung der Dsg3 Moleküle an den gegebenen Lokalisationen an, dass die „Ränder“ von Desmosomen der AFM-Messung durchaus zugänglich sein könnten (Fuchs et al., 2023; Vielmuth et al., 2015a). Darüber hinaus konnten wir an der Zelloberfläche Proteinkomplexe finden, die in ihrer Zusammensetzung „halben“ Desmosomen ähneln (Vielmuth et al., 2018c). Diese Strukturen wurden auch vormals als Halb-Desmosomen beschrieben und es wurde gezeigt, dass diese fortwährend assembliert, zur Zelloberfläche transportiert und dann ins Desmosom eingebaut oder internalisiert werden (Demlehner et al., 1995; Sato et al., 2000). Da diese Strukturen für das AFM erreichbar sind, können nun biophysikalische Parameter in einem physiologischen zellulären Setup bestimmt werden, was den Ergebnissen im Vergleich zu zell-freien Messungen eine höhere biologische Signifikanz zukommen lässt. Zudem lassen sich in Abhängigkeit des adhäsiven Status von Desmosomen in Keratinozyten, unterschiedliche Bindungseigenschaften von Dsg3 detektiert werden, was mit der Gesamtadhäsion korreliert (Fuchs et al., 2020).

Dennoch kann die Strukturierung der Cadherine im Desmosom sowie der dort vorliegende Interaktionsmechanismus weder durch Einzelmolekülinteraktionsstudien noch durch zellfreie Ansätze, wie zellfreiem AFM oder Bead-Versuchen, komplett abgebildet werden. Um dies zu untersuchen wurden einige Studien mit Elektronentomographie und Modellierungen durchgeführt. Die Membran zu Membran Distanz betrug hierbei 35nm (Al-Amoudi et al., 2007). Die Mittellinie wurde als 70 Å dicke Schicht identifiziert, was der adhäsiven Einheit von C-Cadherin, als Vorlage der damals fehlenden Kristallstruktur desmosomaler Cadherine, entspricht (Al-Amoudi et al., 2007; Boggon et al., 2002). Bereits die frühe Studie von Al-Amoudi berichtet, dass die ECD der desmosomalen Cadherine eine hohe Flexibilität aufweisen (Al-Amoudi et al., 2007; Sikora et al., 2020; Tariq et al., 2015). W-förmige Strukturen, die eine trans-Interaktion der ECD1 nahelegen sowie V-förmige Strukturen, die eine cis-Interaktion vermuten lassen, werden bei der Modellierung gefunden. Sie weisen eine gewisse Periodizität auf, in welchen sich trans- und cis-Interaktionen abwechseln und legen nahe, dass ein Clustering in cis wichtig für die spätere trans-Interaktion ist (Al-Amoudi et al., 2007). Dreidimensionale Rekonstruktionen zeigen zudem eine quasi-Periodizität der Cadherine mit Intervallen von ca. 7nm entlang der Mittellinie wobei auch hier eine Mischung aus Interaktionen in cis- und trans- vorzuliegen scheinen (Al-Amoudi und Frangakis, 2008)

Eine weitere Limitation der AFM-Studien besteht sicher darin, dass wir bisher mit 2D Zellkultur arbeiten, in welchen Keratinozyten sich zumindest teilweise anders verhalten als in der Epidermis als komplexes Organ. Trotzdem scheinen sich die zentralen Mechanismen, etwa bei der Aktivierung der p38MAPK und der Zellhaftungsverlust durch Pemphigus-Autoantikörper, zu ähneln. Eine Übertragung auf 3D Modellen der Epidermis stellt aber in Zukunft ein wichtiges Ziel dar. Zusammenfassend ist die Möglichkeit mit dem AFM auf lebenden Zellen unter nahezu

physiologischen Bedingungen Einzelmolekülinteraktionen zu messen, ein entscheidender Vorteil um Interaktionen desmosomaler Proteine und ihre Regulation aufzuklären.

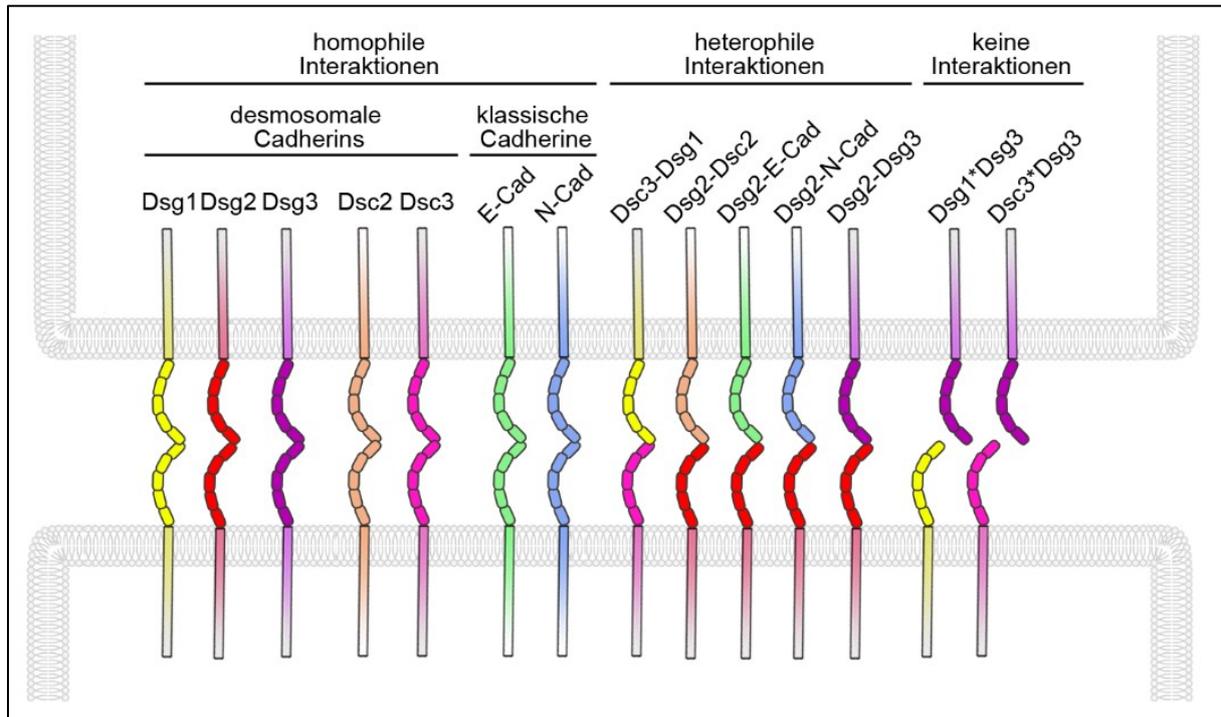


Abb. 17: Zusammenfassung von im AFM detektierten Cadherin-Interaktionen

Mittels AFM wurden verschiedene Interaktionen desmosomaler und klassischer Cadherine identifiziert, deren Ca^{2+} -Abhängigkeit als gemeinsames Charakteristikum herausgestellt werden konnte. Die Zusammenstellung zeigt, dass für Dsg1-3, Dsc2-3 sowie für die klassischen Cadherine E-Cad und N-Cad homophile Interaktionen detektiert werden konnten. Darüber hinaus fanden sich zahlreiche heterophile Interaktionen zwischen desmosomalen Cadherinen aber auch von Dsg2 zu klassischen Cadherinen, was das komplexe Zusammenspiel der Zell-Zell-Kontakte bei der Aufrechterhaltung einer starken interzellulären Adhäsion sowie weiterer zellulärer Prozesse, wie etwa Barrierebildung und Differenzierung von Geweben, unterstreicht (Green et al., 2019). Für einige desmosomale Cadherine, wie etwa Dsg1 und Dsg3 oder Dsc3 und Dsg3 konnten in unseren Studien bisher jedoch keine Anhaltspunkte für heterophile Interaktionen gefunden werden.

4.1.2. Die heterophile Interaktion von Dsg2-Dsg3: Implikationen für die Bedeutung von unterschiedlichen Interaktionen unter verschiedenen biologischen Bedingungen

Die bisher beschriebenen Daten zeigen, dass desmosomale Cadherine in der Lage sind unterschiedliche homo- und heterophile Interaktionen einzugehen, wobei bisher unklar war, ob diese gleichermaßen und nebeneinander vorkommen oder unter unterschiedlichen Bedingungen. Insbesondere für das ubiquitär vorkommende Dsg2 konnten wir über unterschiedliche Studien viele mögliche heterophile Interaktionspartner identifizieren (Fuchs et al., 2022; Vielmuth et al., 2018c). Im Gegensatz dazu konnten wir für Dsg3 neben

homophilen, nur heterophile Interaktionen zu Dsg2 eindeutig nachweisen (Vielmuth et al., 2018c). Dies ist daher besonders interessant, da Dsg2 in der Epidermis allenfalls in geringen Maße im Stratum basale exprimiert wird (Hartlieb et al., 2013; Hegazy et al., 2022) und gezeigt wurde, dass Dsg2 in Keratinozyten hochreguliert wird und stärker an der Membran zu finden ist, wenn die desmosomale Adhäsion kompromittiert ist (Hartlieb et al., 2014; Sigmund et al., 2020; Vielmuth et al., 2018c). Insbesondere wenn die Dsg3-vermittelte desmosomale Adhäsion geschwächt ist, scheint dies deutlich der Fall zu sein. So ist Dsg2 in Dsg3 KO Keratinozyten entlang der Zellmembran verstärkt exprimiert (Hartlieb et al., 2014; Walter et al., 2019). In diesen Zellen befindet sich Dsg2 vor allem in der TritonX-100-unlöslichen, Desmosomen-enthaltenden Zellysate (Sigmund et al., 2020). Die Daten zeigen zudem, dass die Funktion von Dsg3 und die Expression von Dsg2 korrelieren und damit Isoformen desmosomaler Cadherine.

Interessanterweise zeigte sich auch bei einigen Pemphigus-Patienten eine Hochregulation von Dsg2 (Iwatsuki et al., 1999; Sigmund et al., 2020). Diese konnte auch in humaner *ex vivo* Haut nachvollzogen werden (Sigmund et al., 2020). Dabei scheint die Dsg2-Hochregulation für den durch kompromittierte Dsg3-vermittelte Haftung in Teilen zu kompensieren (Hartlieb et al., 2014; Sigmund et al., 2020; Vielmuth et al., 2018c). Das gleiche Muster zeigt sich auch in Keratin-defizienten Zellen. In diesen Zellen ist Dsg3 hochreguliert, aber die Einzelmolekülbindungsstärke reduziert. Im Gegensatz zu WT lassen sich in Keratin-defizienten Keratinozyten eine signifikante Anzahl von Dsg2-Dsg3 heterophilen Bindungen nachweisen (Vielmuth et al., 2018c). Dabei scheint die Dsg2 Hochregulation aufgrund der biophysikalischen Eigenschaft der heterophilen Dsg2-Dsg3 Interaktion vorteilhaft zu sein. Für diese konnte in zellfreien AFM-Experimente zunächst ähnliche Befunde im Hinblick auf Bindungskraft, Bindungsfrequenz und Ca^{2+} -Abhängigkeit im Vergleich zur homophilen Dsg2-Dsg2 und Dsg3-Dsg3 Interaktionen detektiert werden. Allerdings war die Halbwertszeit ($1/k_{off}$) der heterophilen Interaktion im Vergleich zur homophilen Dsg2 Interaktion deutlich verlängert. Ähnliche Ergebnisse wurden für heterophile Interaktionen von Dsg1 zu Dsc3 im Vergleich zur homophilen Dsg1 Interaktionen gezeigt (Spindler et al., 2009). Darüber hinaus ist die heterophile Dsg2-Dsg3 Interaktion weniger anfällig für die PV-IgG-vermittelte direkte Inhibition (Sigmund et al., 2020).

Zusammenfassend, treten also unter Kontrollbedingungen mit intakter Zelladhäsion hauptsächlich homophile Dsg3-Dsg3 Interaktionen auf, während bei kompromittierter Dsg3-vermittelter Zellhaftung vermehrt heterophile Dsg2-Dsg3 Interaktionen detektierbar sind. Dies zeigt, dass unterschiedliche Interaktionen von Dsg3 unter verschiedenen biologischen Umständen in unterschiedlicher Häufigkeit vorkommen. Dass die Hochregulation als zellulärer Rettungsmechanismus in Frage kommt, könnte also durch den Wechsel zu einer unter eben jener Bedingung weniger „anfälligen“ heterophilen Interaktion vermittelt werden. Dafür spricht auch, dass bei für PF-IgG-induzierten Zellhaftungsverlust gezeigt wurde, dass dieser durch ektope Expression von Dsg2 in höheren Hautschichten vermindert werden kann (Brennan et al., 2010).

4.1.3. Die Einzelmolekülbindungseigenschaften desmosomaler Cadherine werden durch unterschiedliche Faktoren reguliert

Desmosomale Adhäsion ist ein stark regulierter Vorgang der fortwährend an unterschiedliche physiologische beziehungsweise pathologische Gegebenheiten angepasst werden muss (Spindler et al., 2023). Somit ist es naheliegend, dass auch die Einzelmolekülbindungseigenschaften desmosomaler Cadherine eng reguliert werden müssen. Die Untersuchung der Einflussfaktoren stellt einen Schwerpunkt der vorliegenden Arbeiten dar.

Zunächst konnten wir in AFM Studien auf lebenden Keratinozyten zeigen, dass sich die Einzelmolekülkräfte von Dsg3 zwischen Messbereichen entlang der Zellgrenze und der freien Zelloberfläche unterscheiden, wobei die Kräfte an der Zellgrenze höher sind (Vielmuth et al., 2015a). Zudem ließ sich mittels der Kombination von AFM mit STED-Mikroskopie nachweisen, dass sich die Verankerung der Moleküle an der Zellgrenze zu solchen auf der Zelloberfläche unterscheiden. Während die Zerstörung des Aktinzytoskeletts mittels Latrunculin B die Bindungseigenschaften von Dsg3 auf der Zelloberfläche drastisch verändert, sind die Dsg3 Interaktionen an der Zellgrenze durch PKC-abhängige Keratinverankerung reguliert (Fuchs et al., 2023). Die jeweiligen Veränderungen zeigten sich neben der Bindungsfrequenz von Dsg3 vor allem im slope der Bindungsereignisse in welchem vermehrt „tether bonds“ auftraten (Friedrichs et al., 2013; Fuchs et al., 2023). Hierzu passend wurde gezeigt, dass der Verlust des Aktin-bindenden Proteins Adducin ähnlich wie die Zerstörung des Aktinzytoskeletts zu vermehrten „tether bonds“ führten, was den Einfluss von Aktin auf Dsg3 Bindungseigenschaften unterstreicht (Hiermaier et al., 2021). Die Verankerung von extradesmosomalen Dsg3 an Aktin wurde bereits vormals beschrieben (Gliem et al., 2010; Tsang et al., 2012a) und die Studien deuten zusammenfassend darauf hin, dass die Aktin-verankerten, Dsg3-haltigen Proteinkomplexe als Vorläufer von Desmosomen angesehen werden können, die im Verlauf in Desmosomen inkorporiert werden können und zudem Signalfunktionen in der Zelle haben (Rotzer et al., 2015a; Waschke und Spindler, 2014). Während der Transition ins Desmosom scheinen sich auch die Bindungseigenschaften zu verändern, was unter Umständen durch den Wechsel der Verankerung an die jeweilige Zytoskelettsystem aber auch durch verändertes Clustering erklärt werden kann.

Um den Unterschied in den Bindungskräften zwischen Zellgrenze und Zelloberfläche genauer zu untersuchen, wurden nachfolgend Arbeiten mit Keratin-defizienten Keratinozyten durchgeführt. Dabei zeigte sich überraschenderweise, dass sowohl der Verlust der Keratinverankerung als auch die Depolarisation von Aktin nicht dazu führten, dass die Bindungskräfte sich komplett angleichen (Vielmuth et al., 2018c). Vielmehr zeigte sich, dass Keratine die Bindungseigenschaften von Dsg1 und Dsg3 verschiedenartig regulieren. Für Dsg3 zeigte sich in den Keratin-defizienten Zellen verringerte Einzelmolekülinteraktionskräfte sowie interessanterweise eine unter Umständen kompensatorische Hochregulation von Dsg3, die sich in Western Blots sowie in der Bindungsfrequenz von Dsg3 am AFM zeigte (Vielmuth et al., 2018c). Die Verteilung der Bindungsereignisse an der Zellgrenze wurde allerdings nicht beeinflusst.

Für Dsg1 bedeutete dies, dass im WT Dsg1 in verstärkten Clustern und damit mit höherer Bindungsfrequenz an der Zellgrenze auftreten. Diese konzentrierte Verteilung war in den Keratin-defizienten Keratinozyten nicht vorhanden, was die Befunde der unterschiedlichen Verankerung von Dsg3 in Abhängigkeit der zellulären Lokalisation stützt und zeigt, dass Keratine auch das Clustering von Dsg1 an der Zellgrenze beeinflussen. Hierzu passend fanden sich in Keratin-defizienten Keratinozyten ähnlich wie beim Verlust von Dsg1 bzw. seiner Mutation in Patienten mit SAM-Syndrom, in der Ultrastruktur kleinere und weniger Desmosomen (Kroger et al., 2013; Samuelov et al., 2013). Im Gegensatz dazu fanden sich in den Keratin-defizienten Keratinozyten geringere Expressionslevel von Dsg1 und passend hierzu weniger Dsg1-vermittelte Bindungsereignisse (Buchau et al., 2022).

Bei der Charakterisierung der Keratin-defizienten Zellen fiel auf, dass diese passend zur vorherbeschriebenen Literatur eine stark aktivierte p38MAPK aufwiesen (Strnad et al., 2003; Woll et al., 2007). Da p38MAPK auch zentral für die desmosomale Haftung ist, was insbesondere durch die Aktivierung bei Pemphigus deutlich wird (Berkowitz et al., 2005; Egu et al., 2017; Jolly et al., 2010; Mavropoulos et al., 2013; Rotzer et al., 2015b; Spindler et al., 2013), haben wir diesen Signalweg auch im Hinblick auf Dsg Bindungseigenschaften untersucht. Inhibition von p38MAPK führte neben der Wiederherstellung einer normalen Adhäsion, auch zu einer Normalisierung der geminderten Dsg3 Interaktionskraft in Keratin-defizienten Keratinozyten (Vielmuth et al., 2018b). Im Umkehrschluss führt eine Aktivierung der p38MAPK zu einer Keratin-abhängigen Umverteilung von Dsg1- und Dsg3- abhängigen Bindungsereignissen weg von Zell-Zell-Kontaktarealen und führt damit zu ähnlichen Veränderungen wie PV-IgGs, die ihrerseits ebenfalls p38MAPK aktivieren (Vielmuth et al., 2018b).

Zudem ist in Keratin-defizienten Keratinozyten, durch die abwesende Sequestrierung, PKC an die Membran transloziert und aktiviert (Kroger et al., 2013; Loschke et al., 2016). Daher wurde der Einfluss von PKC untersucht, die ein wichtiger Regulator des desmosomalen Umsatzes und insbesondere in die Ausbildung der desmosomalen Hyper-adhäsion ist (Dehner et al., 2014; Garrod und Taberner, 2014; Loschke et al., 2016; Tucker et al., 2014). Obgleich sich die Expression von Dsg2 und 3 an der Membran durch PKC-Inhibition nicht ändert, erhöht sich die Bindungsfrequenz, was andeutet, dass PKC-abhängige Mechanismen zu einer Stabilisierung der Interaktionspartner führen, was unter Umständen ähnlichen Mechanismen wie der Entwicklung der Hyper-adhäsion folgt. Weiterhin reguliert auch protektives cAMP-Signaling bei Pemphigus, das Keratinzytoskelett. Interessanterweise hatte in Keratinozyten aber nur eine starke Erhöhung der cAMP Spiegel einen Einfluss auf die PV-IgG-induzierte Dsg-Depletion, während Apremilast hierauf keinen Effekt zeigte. Daher ist es konklusiv, dass Apremilast keinen Effekt auf Dsg3 Bindungseigenschaften hat (Sigmund et al., 2023; Spindler et al., 2010). Hohe cAMP-Spiegel in Keratinozyten wurden nicht untersucht. Dagegen konnte in Kardiomyozyten durch cAMP-Erhöhung eine Translokation von Dsg2-abhängigen Bindungsereignissen zu Zellgrenzen beobachtet werden, die zudem stärkere Einzelmolekülbindungseigenschaften aufwiesen. Die Veränderung der biophysikalischen Parameter korreliert auch hier mit der Gesamthaftung, die durch cAMP-Erhöhung gesteigert wird (Schinner et al., 2017).

Schließlich wurde auch der Einfluss der desmosomalen Plaqueproteine untersucht. Interessanterweise fanden sich für Dp- und Pg-defiziente Zellen keine deutlichen

Veränderungen der biophysikalischen Charakteristika von Dsg2, Dsg3 und Dsc3 Interaktionen, was insbesondere deswegen interessant ist, weil sich die Membranlevel der entsprechenden Moleküle teilweise veränderten und gerade der Dp KO zu einem kompletten Verlust von Desmosomen führte (Wanuske et al., 2021). Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass Pkp1 zum Clustering von Dsg3 beiträgt und insgesamt Pkp1 und 3 einen Einfluss auf die Membranverfügbarkeit von Dsg1 und 3 haben, was sich in einer stark reduzierten Bindungsfrequenz der beiden desmosomalen Cadherine zeigte (Fuchs et al., 2019).

Zusammenfassend wurde herausgestellt, dass die Bindungseigenschaften desmosomaler Cadherine von unterschiedlichen Faktoren abhängen. Dazu zählt die Lokalisation der Moleküle auf der Zelle, ihre intrazelluläre Verankerung am Zytoskelett sowie die Regulation durch desmosomalen Plaqueproteine und weiteren an das Desmosom assoziierten Strukturproteinen und Signalkomplexen. Schließlich, spielen die Einzelmolekülbindungseigenschaften desmosomaler Cadherine auch eine Rolle für den Wechsel von Ca^{2+} -abhängigen zu Ca^{2+} -unabhängigen, hyper-adhäsiven Desmosomen. Die hierbei auftretenden Veränderungen in den biophysikalischen Parametern sowie der zugrundeliegenden Mechanismen war Fragestellung der folgenden Projekte und soll im nächsten Abschnitt zusammenfassend diskutiert werden.

4.2. Desmoglein Bindungseigenschaften tragen zur Ausbildung und Regulation der desmosomalen Hyperadhäsion bei

Hyperadhäsion ist ein Konzept in der Desmosomenforschung, bei dem unterschiedliche adhäsive Zustände von Desmosomen definiert werden. Demnach wurden die meisten Desmosomen in intakter, adulter Epidermis als hyperadhäsiv bezeichnet (Garrod, 2010; Garrod und Kimura, 2008). Mittels Ca^{2+} -Chelations-Versuchen konnten wir allerdings in humaner Haut zeigen, dass sich die Ca^{2+} -Sensitivität verschiedener Cadherin-Isoformen unterscheidet. Während die Färbung von Dsg3 und Dsc3 sich nicht signifikant veränderte, konnte eine deutliche Fragmentierung und ein Verlust der Färbung von Dsg1 und Dsc1 als Folge einer Ca^{2+} -Chelation nachgewiesen werden (Fuchs et al., 2020). Somit lässt sich vermuten das Hyperadhäsion vielleicht kein Zustand ist, den ganze Desmosomen in der Epidermis erreichen, sondern vielmehr unterschiedliche Isoformen desmosomaler Cadherine in unterschiedlicher Weise dazu beitragen. Dafür spricht auch die unterschiedliche Expression der desmosomalen Cadherine in der Epidermis (Delva et al., 2009; Green et al., 2019) sowie deren unterschiedliche Beteiligung an der Regulation von Signalwegen, Differenzierung und weiterer biologischer Prozesse (Johnson et al., 2014; Walter et al., 2019).

Mittels AFM konnte die unterschiedliche Bedeutung von Dsg3 und 1 für die desmosomale Hyperadhäsion auf Einzelmolekülbindungsebene weiter untersucht werden. Hierbei ergab sich interessanterweise, dass nur für Dsg3, nicht aber für Dsg1, Interaktionen ein Anstieg der Einzelmolekülbindungskraft von 24 auf 72h Differenzierung zu beobachten ist, während die Zellen hyperadhäsiv wurden (Fuchs et al., 2020). Höhere Dsg3 Bindungskräfte konnten in mehreren Studien mit einer verstärkten interzellulären Haftung in Zusammenhang gebracht

werden, was daher gut mit der Entwicklung der Hyperadhäsion zusammenpasst (Vielmuth et al., 2018a). Dabei war der Anstieg an Einzelzellinteraktionskraft kein Vielfaches der ursprünglichen Bindungskraft und daher ist es wahrscheinlicher, dass sich tatsächlich die Einzelmolekülinteraktion in ihrer Eigenschaft ändert und nicht mehrere Bindungsereignisse gleichzeitig auftreten und der erhöhten Kraft zugrunde liegt (Baumgartner et al., 2000; Waschke et al., 2005). Nicht auszuschließen ist, dass sich die Eigenschaften von Dsg1 erst zu einem späteren Zeitpunkt der Differenzierung verändern. Dafür spricht, dass Dsg1 erst in den superfiziellen Schichten der Epidermis zunehmend exprimiert wird und auch die Tatsache, dass neben Dsg3 KO auch Dsg2 KO Keratinozyten nicht hyperadhäsiv werden, was eine Beteiligung aller desmosomaler Cadherine vermuten lässt (Fuchs et al., 2020). Eine weitere biophysikalische Eigenschaft der Dsg3 Interaktionen, die sich während des Erlangens der Hyperadhäsion ändert, ist die Halbwertszeit der Bindungen. Sie verlängert sich signifikant im Vergleich von 24 auf 72h und erreicht Werte, die zu klassischen Cadherinen vergleichbar sind (Baumgartner et al., 2003; Baumgartner et al., 2000; Vielmuth et al., 2018a). Dies deutet an, dass die Bindungskraft sowie die Halbwertszeit voneinander abhängen (Rakshit und Sivasankar, 2014).

Aus vorherigen Studien war bereits bekannt, dass unterschiedliche Faktoren für die Entwicklung der desmosomalen Hyperadhäsion von Bedeutung sind – darunter die Ordnung der desmosomalen Cadherine und Plakophiline (Bartle et al., 2020; Bartle et al., 2017; Keil et al., 2016; Tucker et al., 2014).

Dsg3 liegt in Desmosomen in einem geordneten Zustand vor, der bei Adhäsionsverlust verloren geht (Bartle et al., 2020; Bartle et al., 2017). Unsere Daten zeigen, dass Dsg3 entscheidend zur Akquirierung der desmosomalen Hyperadhäsion beiträgt (Fuchs et al., 2020). Dazu passen wurde gezeigt, dass die Dsg3-W2A-Mutante, welche putativ nicht in trans interagieren kann, eine geringere Ordnung im Extrazellulärraum aufweist, als dies für den WT der Fall ist (Bartle et al., 2020). Im Widerspruch hierzu konnte für Dsg3 in einer Studie keine erhöhte Ordnung unter hyper-adhäsiven Bedingungen nachgewiesen werden (Bartle et al., 2020). Allerdings wurde, die verminderte Molekülmobilität von Dsg3 unter hyperadhäsiven Bedingungen durch die W2A-Mutante aufgehoben (Bartle et al., 2020; Bartle et al., 2017).

Insgesamt, wurde eine reduzierte Mobilität von Molekülen mit Hyperadhäsion und starker Haftung in Verbindung gebracht. Dies trifft sowohl für desmosomale Cadherine als auch für Plaqueproteine wie Dp, nicht aber für Pkp2 zu (Bartle et al., 2020; Fulle et al., 2021). Insbesondere bei Dp konnte auch gezeigt werden, dass eine phosphodefiziente Mutante an Ser2849, die mit Hyperadhäsion assoziiert ist (Albrecht et al., 2015; Hobbs und Green, 2012), in der Lage ist, den Proteinumsatz im Desmosomen zu senken (Bartle et al., 2020).

Auch trägt die Pkp1 Überexpression zum Erlangen des hyperadhäsiven Status bei. Hierbei kommt es zu Veränderungen im desmosomalen Plaque im Sinne einer Verkleinerung der Plaque-zu-Plaque-Distanz für den C-terminalen Teil von Dsg3, die Dp rod- und c-terminale Domäne. Dagegen gab es keine Veränderung in PG und dem N-terminalen Desmoplakin (Stahley et al., 2016a). Für Pemphigus konnte in Übereinstimmung mit Vordaten zur Hyperadhäsion gezeigt werden, dass eine Pkp1 Überexpression durch die Bildung Ca²⁺-insensitiver Desmosomen protektiv gegen den Pemphigus-Autoantikörper vermittelten

Haftungsverlust wirkt (Tucker et al., 2014). Dazu passend zeigte sich in unseren Studien, dass Pkp1, aber nicht Pkp3 zum Dsg3-Clustering in der Zellmembran beiträgt und dies wiederum für die desmosomale Hyperadhäsion wichtig ist (Fuchs et al., 2019; Fuchs et al., 2020). Darüber hinaus zeigten unsere Daten, dass Pkp1 und Pkp3-defiziente Keratinozyten nicht hyperadhäsiv werden (Fuchs et al., 2020). Dies steht in Gegensatz zu publizierten Daten in welchen Pkp1, aber nicht Pkp3 zur desmosomalen Hyperadhäsion beiträgt (Keil et al., 2016). AFM-Experimente auf lebenden Keratinozyten demonstrierten, dass unter hyperadhäsiven Bedingungen die Einzelmolekülbindungskräfte von Dsg3 in WT, nicht aber in Pkp1- oder Pkp3-defizienten Keratinozyten erhöht sind (Fuchs et al., 2020).

Plakophiline wurden auch in Verbindung mit dem PKC-Signalweg gebracht, der im Hinblick auf die Hyperadhäsion als zentral identifiziert wurde (Bass-Zubek et al., 2008; Cirillo et al., 2010; Hobbs und Green, 2012; Thomason et al., 2012). Früh war bekannt, dass PKC die Expression von desmosomalen Cadherinen in allgemeinen reguliert (Denning et al., 1998). Darüber hinaus ist eine Inhibition der PKC entscheidend damit sich hyperadhäsive Desmosomen entwickeln können, während für die epidermale Wundheilung die Umkehr der Hyperadhäsion zu Ca^{2+} -sensitiven Desmosomen mit einer Aktivierung von PKC einhergeht (Thomason et al., 2012; Wallis et al., 2000) und PKC-Aktivierung die Formation stabiler, hyperadhäsiver Desmosomen verhindert (Dehner et al., 2014; Garrod und Taberner, 2014; Loschke et al., 2016; Tucker et al., 2014). PKC reguliert hierbei den Phosphorylierungsgrad von Dp, insbesondere an Serin 2849 was für die Hyperadhäsion wichtig ist (Hobbs und Green, 2012), wobei Dp entscheidend zum Clustering desmosomaler Cadherine beiträgt (Wanuske et al., 2021). Vorgesaltet kontrollieren Keratin-Isoformen differentiell die PKC-Aktivität durch Sequestrierung und sind somit entscheidend für desmosomale Adhäsion (Kroger et al., 2013; Loschke et al., 2015a) wie auch die Ausbildung von Hyperadhäsion (Buchau et al., 2022). Hierzu passend zeigen unsere Daten, dass Keratine differentiell die Bindungseigenschaften von Dsg1 und 3 regulieren (Vielmuth et al., 2018b), die sich auch in der Ausbildung der Ca^{2+} -Insensitivität unterschiedlich verhalten (Fuchs et al., 2020) und durch Regulation der Bindungseigenschaften desmosomaler Cadherine einen Einfluss auf die Ausbildung der Hyperadhäsion haben (Buchau et al., 2022). Insbesondere sind in Keratin-defizienten Keratinozyten die Einzelmolekülbindungskräfte von Dsg3 reduziert (Vielmuth et al., 2018c) und es fehlt der im WT beobachtete Anstieg der Dsg3 Einzelmolekülbindungskräfte unter hyperadhäsiven Bedingungen (Buchau et al., 2022). Dabei verhindert nicht nur Keratin-Defizienz, sondern auch das Auftreten von bestimmten Keratinisoformen, wie z.B. K17, das Auftreten der desmosomalen Hyperadhäsion (Buchau et al., 2022). Da dieses Keratin auch bei der Wundheilung auftritt, verdeutlicht dies das Wechselspiel in der Adaption der adhäsiven Zustände zwischen Hyperadhäsion und Wundheilungsbedingungen (Garrod et al., 2005; Loschke et al., 2015a; Zhang et al., 2019). Interessanterweise führt eine Inhibition der PKC in den Keratin-defizienten Zellen zwar zu einer Verbesserung der Haftung und zu einer vermehrten Dsg3-abhängigen Bindungsfrequenz, jedoch kann die in den Keratin-defizienten Zellen kompromittierte Interaktionskraft der Dsg3-Interaktionen nicht wiederhergestellt werden (Vielmuth et al., 2018c). Dies lässt sich unter Umständen damit begründen, dass die PKC insbesondere die Bindungseigenschaften von Keratin-verankertem Dsg3 an der Zellgrenze aber nicht jenen Pool von Dsg3, der an das Aktinzytoskelett gebunden ist, reguliert (Fuchs et al., 2023). Umgekehrt führt K17 neben instabilen, Ca^{2+} -abhängigen Desmosomen auch zu reduzierten Dp und PKP

Leveln an der Zellgrenze, die allerdings durch Überexpression von Dp ausgeglichen werden konnten. Eine Dp Überexpression führte darüber hinaus in diesen Zellen zu vermehrten Pkp1 Rekrutierung sowie Dsg3 Clustering, was die Komplexität der Ausbildung der desmosomalen Hyperadhäsion unterstreicht (Buchau et al., 2022).

Schließlich konnten wir durch Daten im *ex vivo* Hautmodell in Kombination mit Zellkulturexperimenten mittels Quervernetzung weiter ausarbeiten, dass die unterschiedlichen Isoformen der desmosomalen Cadherine unterschiedliche zur Ausbildung der desmosomalen Hyperadhäsion beitragen (Fuchs et al., 2020). Während wir für Dsg3 unter hyperadhäsiven Bedingungen höhere Einzelmolekülbindungskräfte und vermehrte Ca²⁺-insensitive Oligomere unter hyperadhäsiven Bedingungen detektieren konnten, war dies im gleichen Zeitverlauf für Dsg1 nicht nachweisbar. Dabei kann die Einbindung der jeweiligen Dsg- und Dsc- Isoformen in unterschiedliche Signalkaskaden (Cho et al., 2018; Schmitt und Waschke, 2021; Walter et al., 2017; Walter et al., 2019), die Haftung regulieren, ein entscheidender Faktor sein. Darüber hinaus deuten diese Daten an, dass die desmosomale Hyperadhäsion als Vorgang von der Differenzierung der Keratinozyten in mehrschichtigen Epithelien abgegrenzt werden muss. Zukünftige Arbeiten müssen zeigen, welche Mechanismen zu beiden zellulären Prozessen beitragen bzw. Unterschiede definieren.

Zusammenfassend ergibt sich ein komplexes Bild der Regulation der desmosomalen Hyperadhäsion, wobei klar wird, dass das Desmosom in seiner Gesamtheit benötigt wird, um den starken adhäsiven Zustand herzustellen. Daher führt sowohl der Verlust eines bestimmten desmosomalen Cadherins, z.B. Dsg3 (Fuchs et al., 2020) ebenso zu einer verzögerten oder fehlenden Ausbildung der desmosomalen Hyperadhäsion, wie das Fehlen bestimmter Plaqueproteine wie Pkp1 (Fuchs et al., 2020; Keil et al., 2016) und Dp (Hobbs und Green, 2012), als auch die suffiziente Verankerung an das Keratinytoskelett (Buchau et al., 2022). Insbesondere eine aktuelle Studie aus der Gruppe von Prof. Magin, zu welcher wir AFM-Experimente beigetragen haben, unterstreichen dieses Konzept, da sie zeigen, dass die Expressionsmuster desmosomaler Komponenten sowie spezifischer Keratin-Isoformen sich gegenseitig beeinflussen und Hyperadhäsion wechselseitig regulieren (Buchau et al., 2022). Signalkaskaden, bei welchen desmosomale Komponenten regulierend oder als Adhäsionsrezeptoren vorkommen, sind gleichwohl involviert wie auch nachgeschaltete posttranslationale Modifikationen wie beispielsweise die PKC-abhängige Phosphorylierung von Dp an S2849 (Hobbs und Green, 2012).

4.3. AFM-Studien liefern wichtige Einblicke in die Pathogenese der Pemphigus-Erkrankung

Bei der Pemphiguspathogenese treten neben einer Dysregulation zahlreicher Signalwege (Spindler et al., 2018) auch eine direkte Inhibition von Dsg3, nicht aber von Dsg1 Interaktionen auf. Die Erkenntnisse über die direkte Inhibition basierten allerdings ausschließlich auch zellfrei durchgeführten AFM-Studien und reflektieren somit vielleicht nicht das Bild in komplex aufgebauten Keratinozyten, die mehrere Dsg- und Dsc-Isoformen exprimieren und die zudem einer Regulation über Signalwege die bei Pemphigus dysreguliert werden unterliegen

(Brennan et al., 2004; Galichet et al., 2014; Spindler und Waschke, 2014; Waschke und Spindler, 2014). Die hier zusammengefassten Studien zeigen nun, dass eine direkte Inhibition auch auf Keratinozyten nur für Dsg3, nicht aber für Dsg1 auftritt (Vielmuth et al., 2018b; Vielmuth et al., 2015b). Auch hier finden sich in der Literatur teilweise nicht übereinstimmende Daten, die etwa in Bead-Versuchen die Hemmung von heterophilen Dsg1-Dsc1 und Dsg3-Dsc3 Interaktionen durch Pemphigus-Autoantikörper nachweisen konnten (Ishii et al., 2020). Ein Vorteil der AFM-Daten kann hierbei sein, dass sie auf lebenden Zellen durchgeführt werden können und somit neben der Bindungsfrequenz wichtige weitere Einblicke in die desmosomale Adhäsion liefern. Für Dsg1-Antikörper konnten wir dadurch eine Umverteilung von Dsg1-abhängigen Bindungsereignissen weg von den Zellgrenzen, gefolgt von einer Verminderung der Einzelmolekülinteraktionsstärke, zeigen, die abhängig von p38MAPK und Keratinen war (Vielmuth et al., 2018b).

Interessanterweise war bereits 15min nach PV-IgG das Auftreten der direkten Inhibition von Dsg3, die Aktivierung von p38MAPK sowie der beginnende Zellhaftungsverlust nachweisbar. Diese waren von in den AFM-Studien detektierbaren morphologischen Veränderungen begleitet, die auf beginnende Keratinretraktion sowie interdesmosomaler Lückenbildung schließen lassen (Vielmuth et al., 2015b). In einer Studie mit „Live cell imaging“ war der Verlust des Keratin-Netzwerkes in der Zellperipherie 60min nach PV-IgG Inkubation detektierbar, gefolgt von einer fortschreitenden Kondensierung der Keratinfilamente zu dicken Bündeln in den folgenden Stunden. Eine Dsg3 Internalisierung war dagegen nach 90 min erstmals zu sehen (Schlogl et al., 2018). Daraus wird deutlich, dass AFM als Technik sehr sensitiv ist und sich auch beginnende Veränderungen etwa des Zytoskeletts unter der Zellmembran veranschaulichen lassen.

Während die morphologischen Veränderungen sowie der Zellhaftungsverlust weiter fortschreiten, bleibt die direkte Inhibition von Dsg3 Interaktionen aber auf einem gleichen Level (Vielmuth et al., 2015b). Die vormals als protektiv beschriebene Inhibition von p38MAPK (Berkowitz et al., 2008b; Berkowitz et al., 2005; Berkowitz et al., 2006; Jolly et al., 2010) ist protektiv ohne das Auftreten der direkten Inhibition komplett zu verhindern. Diese Daten zeigen deutlich, dass die direkte Inhibition nicht alleinig für den Zellhaftungsverlust verantwortlich sein kann (Vielmuth et al., 2015b). Für die Vorstellung, dass bei Pemphigus Signalwege, die zur Depletion von Dsg1 und Dsg3 von der Zellmembran führen, entscheidend zum Zellhaftungsverlust beitragen, spricht auf morphologischer Ebene auch, dass sich in einer Studie mit „structured illumination microscopy“ (SIM) gesplittete Desmosomen auftraten. Diese könnten zwar auch als Korrelat einer direkten Inhibition angesehen werden, waren jedoch auch deutlich kleiner als in der Epidermis von Kontrollpatienten, was auf regulierte Veränderungen an jedem Desmosom schließen lässt. Außerdem traten gesplittete Desmosomen nur bei mechanisch beanspruchten Keratinozyten auf (Stahley et al., 2016b).

Die Wichtigkeit der Veränderungen des Keratinzytoskeletts für die desmosomale Haftung von Keratinozyten sowie bei der Pemphiguspathogenese wurde vielfach nachgewiesen (Berkowitz et al., 2005; Buchau et al., 2022; Hatzfeld et al., 2017; Karsch et al., 2020; Loschke et al., 2016; Quinlan et al., 2017; Spindler et al., 2018; Stahley et al., 2016b; Toivola et al., 2015; Wang et al., 2016). Keratine verankern Desmosomen und sind wichtig für die mechanische Integrität der Epidermis, da sie die mechanischen Eigenschaften und die Stabilität von Keratinozyten

wesentlich mitbestimmen (Loschke et al., 2015b; Osmani und Labouesse, 2014; Ramms et al., 2013; Seltmann et al., 2013). Darüber hinaus beeinflussen sie den Umsatz von desmosomalen Komponenten wie Dp und Pkp-Isoformen (Godsel et al., 2005; Nekrasova und Green, 2013; Olivry et al., 2012) und regulieren die desmosomale Adhäsion über die Beeinflussung verschiedener Signalwege (Kroger et al., 2013; Loschke et al., 2015a). Des Weiteren ist die Veränderung des Keratinzytoskeletts ein strukturelles Charakteristikum der Pemphigus-Pathogenese und korreliert mit dem Zellhaftungsverlust sowie der Dsg-Depletion. Somit scheinen die Vorgänge miteinander verwoben zu sein (Schlogl et al., 2018). Dabei gibt es eine Koinzidenz der Signalwege die von Keratinen reguliert und bei Pemphigus dysreguliert werden (Muller et al., 2007; Vielmuth et al., 2018c). Passend hierzu zeigen Keratin-defiziente Keratinozyten eine deutlich kompromittierte Zelladhäsion (Kroger et al., 2013). In diesem Zusammenhang konnten wir zeigen, dass Keratine die Bindungseigenschaften von Dsg1 und 3 regulieren und damit direkten Einfluss auf die desmosomale Haftung nehmen. Interessanterweise hat der komplette Verlust der Keratine in Keratin-defizienten Keratinozyten einen ähnlichen Effekt auf die Bindungseigenschaften von Dsg1 und 3 wie die Behandlung mit Pemphigus-Autoantikörpern in WT Keratinozyten. So zeigen Keratin-defiziente Keratinozyten verminderte Dsg3 Einzelmolekülinteraktionskräfte sowie eine veränderte Verteilung von Dsg1 mit weniger Kondensation von Dsg1-Interaktionen an den Zellgrenzen der Keratinozyten. Des Weiteren scheint das Keratinzytoskelett auch die Mobilität von Dsg3 zu regulieren und somit ist die Dsg3 Mobilität in Keratin-defizienten Keratinozyten erhöht (Vielmuth et al., 2018c). Auch für Pkp1 wurde die Verknüpfung von verminderter Haftung und gesteigerter Cadherinmobilität beschrieben (Keil et al., 2016; Rietscher et al., 2016). Mechanistisch wurde für Pkp1 hier vor allem das laterale Clustering der desmosomalen Cadherine vorgeschlagen. Hierzu passt, dass von klassischen Cadherinen bekannt ist, dass laterales Clustering entscheidend für die adhäsive Funktion ist (Brasch et al., 2012; Wu et al., 2014; Yap et al., 1997). Die auf der Keratinverankerung beruhenden starken Dsg3 Einzelmolekülinteraktionskräfte gehen dabei unter Umständen auch auf konformationale Änderungen durch die durch das Clustering auftretenden cis Interaktionen zurück. Aber auch Signalwegsregulationen sowie posttranslationale Modifikationen könnten hierbei eine Rolle spielen. So korreliert die Phosphorylierung von Dsg3 mit reduzierter interzellulärer Haftung, was durch Hemmung von Tyrosinkinasen aufgehoben werden kann (Aoyama et al., 1999; Delva et al., 2008). Auch konnte für E-Cadherin gezeigt werden, dass eine allosterische Regulation der Bindungsaffinitäten auf dem Phosphorylierungsstatus von p120-catenin beruht (Shashikanth et al., 2015). Eine Dysregulation von PKC und p38MAPK in Keratin-defizienten Zellen passt zu diesem Mechanismus.

Da Keratine die Aktivierung von p38MAPK modulieren und p38MAPK in Keratin-defizienten Keratinozyten ähnlich bei Pemphigus stärker phosphoryliert und somit aktiviert wird, ist es folgerichtig, dass p38MAPK auch die Bindungseigenschaften desmosomaler Cadherine reguliert (Berkowitz et al., 2005; Mavropoulos et al., 2013; Vielmuth et al., 2018c; Woll et al., 2007). p38MAPK hatte interessanterweise keinen Einfluss auf die Bindungsfrequenz. Dagegen wurden die erniedrigten Dsg3 Bindungskräfte in Keratin-defizienten Keratinozyten durch p38MAPK Inhibition normalisiert. Hierbei muss angenommen werden, dass auch p38MAPK durch Keratine sequestriert wird. Auch bei Pemphigus kommt es vermittelt durch die

Autoantikörper zu einer Aktivierung von p38MAPK, die zur Keratinretraktion entscheidend beiträgt (Berkowitz et al., 2005; Spindler et al., 2013).

Das Vorhandensein von Keratinen ist kritisch für die korrekte Lokalisation von Dsg1 an der Zellmembran. Sowohl Keratin-Defizienz wie auch Pemphigus-Autoantikörper führen zu einer Umverteilung der Dsg1 Moleküle weg von der Zellmembran (Vielmuth et al., 2018c). Für Dsg1-Antikörper bei PF wurde zudem gezeigt, dass es sich hierbei vorwiegend um extradesmosomales Dsg1 handelt (Hiermaier et al., 2022). Mechanistisch könnten auch hier veränderte posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen oder Palmitoylation zu einer veränderten Expression oder Membranlokalisation beitragen (Aoyama et al., 1999; Roberts et al., 2014).

Im Gegensatz zu den Keratinen konnten keine deutlichen Veränderungen der Bindungseigenschaften durch die Zerstörung des Aktinzytoskeletts nachgewiesen werden, obgleich diskutiert wird, dass extradesmosomales Dsg3 an Aktin verankert ist (Tsang et al., 2012a). Allerdings ging die Zerstörung des Aktinzytoskeletts mit einer verminderten Membranstabilität von Dsg3 einher. Denkbar wäre hier das Aktin am lateralen Clustering von Dsg3 beteiligt ist (Kusumi und Suzuki, 2005) oder am Umsatz der desmosomalen Cadherine beteiligt ist. Ein aktuelles Paper zeigt, dass die Verankerung von Dsg3 sich zwischen Zellkontaktarealen und der freien Zelloberfläche unterscheidet. Während die Kontakte auf der freien Zelloberfläche Aktin-abhängig waren, waren die an der Zellgrenze abhängig von Keratinen. Dabei könnte es sich bei den um Aktin verankerten Molekülen um Vorläuferkomplexe handeln (Fuchs et al., 2023)

Keratinozyten sind in der Lage als Reaktion auf eine kompromittierte desmosomale Haftung mit Rettungsmechanismen zu reagieren. Ein Beispiel hierfür ist die zuvor besprochene Hochregulation von Dsg2, wenn die Dsg3 Haftung wie etwa durch Pemphigus-Autoantikörper vermindert wird. Die AFM Daten deuten an, dass diesem Rettungsmechanismus heterophile Dsg2-Dsg3 Interaktionen zugrunde liegen, die weniger anfällig für die PV-IgG-vermittelte direkte Inhibition von Dsg trans-Interaktionen sind (Sigmund et al., 2020).

Gleichermaßen gehört die durch Pemphigus-Autoantikörper-induzierte cAMP-Erhöhung zu den zellulären Rettungsmechanismen (Spindler et al., 2010). Allerdings reicht diese nicht aus, um den PV-IgG-vermittelten Zellhaftungsverlust zu verhindern. Hierfür ist eine pharmakologische Augmentation notwendig (Spindler et al., 2010). Keratinozyten exprimieren alle Komponenten der adrenergen Signalkaskade, darunter Adenylatcyclasen, Phosphodiesterase 4, PKA, Epac1 und β 2-Rezeptoren (Mitev und Miteva, 1999; Simard et al., 2020; Steinkraus et al., 1996; Takahashi et al., 1998; Tenor et al., 1995). Interessanterweise wurde der β 2-Rezeptor in Zusammenhang mit verschiedenen biologischen Prozessen in der Epidermis gebracht wurde, darunter PKC-Signaling, Barrierewiederherstellung sowie PKA-abhängige Differenzierung in der Epidermis gebracht (Denda et al., 2003; Grando et al., 2006; Mammone et al., 1998). In Pemphigus, konnte eine pharmakologische cAMP-Erhöhung den Autoantikörper-vermittelten Zellhaftungsverlust blockieren und damit verbunden die morphologischen Korrelate der Keratinretraktion und Dosis-abhängig auch die Dsg-Depletion verhindert (Sigmund et al., 2023; Spindler et al., 2010). Dazu passend wird auch nur in hohen Dosen die Autoantikörper-vermittelte p38MAPK Aktivierung verhindert (Spindler et al., 2010).

Da sowohl PKC- als auch p38MAPK-Signaling die Bindungseigenschaften desmosomaler Cadherine verändern, könnte dieser Mechanismus zum protektiven Effekt bei Pemphigus beitragen. Für die moderate cAMP Erhöhung durch Apremilast konnten aber keine Veränderungen der Dsg3-Bindungseigenschaften gefunden werden, aber eben auch kein Effekt auf die PV-IgG-vermittelte Dsg3-Depletion (Sigmund et al., 2023). Insbesondere der Einsatz des Phosphodiesterase-Inhibitors Apremilast, welcher für die Anwendung in Psoriasis-Patienten und Behcet Erkrankten klinisch erprobt ist, wurde als *in vitro* und *in vivo* effektiv bei Pemphigus beschrieben und zusätzlich auch in einer Fallstudie mit Erfolg eingesetzt (Meier et al., 2020; Sigmund et al., 2023). Mechanistisch induziert Apremilast eine PKA-abhängige Phosphorylierung des Plaqueproteins Pg an Serin665, was auch in Kardiomyozyten als haftungssteigernd herausgestellt werden konnte und über einen bisher unbekanntem Mechanismus die Bindung von Intermediärfilamenten an den desmosomalen Plaque reguliert (Schinner et al., 2017; Sigmund et al., 2023). Im Gegensatz dazu führt eine PKC-vermittelte Phosphorylierung von Dp an Serin2849 zu einer Verminderung der desmosomalen Adhäsion, da es die Verbindung von Dp an das Intermediärfilamentzytoskelett kompromittiert (Albrecht et al., 2015; Dehner et al., 2014; Hobbs und Green, 2012). In die Regulation der Phosphorylierung des C-Terminus von Dp, in welchem auch S2849 liegt, ist entscheidend die Proteinphosphatase PP2A-B55alpha involviert und wurde daher zuletzt als wichtig für die desmosomale Adhäsion identifiziert (Perl et al., 2023). Pg und Dp regulieren daher entgegengesetzt die desmosomale Haftung durch ihren Phosphorylierungszustand (Vielmuth et al., 2023). Darüber hinaus wurden Phosphorylierungen desmosomaler Plaqueproteine auch in weiteren Studien als wichtiger Modulator der desmosomalen Adhäsion identifiziert, etwa für Pkp3, welches Src abhängig phosphoryliert wird und in der Folge von Dsg3 dissoziiert (Cirillo et al., 2014; Neuber et al., 2015). Des Weiteren hängt von der Phosphorylierung von Pkp-Isoformen ab, inwieweit 14-3-3 Proteine an sie assoziiert werden und darüber desmosomale Haftung stabilisiert oder destabilisiert wird (Rietscher et al., 2018) und die RIPK4-abhängige Phosphorylierung reguliert epidermale Differenzierung und Tumorgenese (Lee et al., 2017). Auch der Phosphorylierungsstand der desmosomalen Cadherine selbst, trägt entscheidend zur desmosomalen Adhäsion bei, was sich insbesondere am Phosphorylierungsstand von Dsg3 bei Pemphigus nachweisen lässt (Aoyama et al., 1999; Aoyama et al., 2009; Kawasaki et al., 2006). Auch tragen posttranslationale Modifikationen, wie etwa der Palmitoylation von Pkp und Dsg2, zur Regulation desmosomaler Adhäsion und zum Umsatz von Desmosomen bei (Roberts et al., 2014; Roberts et al., 2016). Da Studien zur Auswirkung von posttranslationalen Modifikationen desmosomaler Cadherine auf die Einzelmolekülbindungseigenschaften fehlen, kann dies ein Fokus für weitere Studien sein.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass AFM Studien, die biophysikalische Parameter der Bindungseigenschaften desmosomaler Cadherine auf Einzelmolekülebene mit molekularbiologischen und biochemischen Methoden kombinieren, einen wertvollen Beitrag zur Aufklärung der Interaktionsmechanismen desmosomaler Cadherine sowie ihrer jeweiligen Bedeutung unter physiologischen und pathologischen Bedingungen leisten. Die Arbeiten der vergangenen Jahre demonstrieren, dass desmosomale Cadherine unterschiedliche Interaktionen in Abhängigkeit der biologischen Umstände eingehen. Ihre jeweiligen Bindungseigenschaften stehen in einem direkten Bezug zur Gesamtadhäsion der jeweiligen Zelle und werden von der Lokalisation des Moleküls in der Zelle, Plaqueproteinen, der

Verankerung an das zelluläre Zytoskelett sowie durch Signalwege moduliert. Im Zusammenspiel dieser Faktoren können Zellen in Abhängigkeit der biologischen Umstände einen starken adhäsiven Status annehmen, in welchem die Desmosomen hyperadhäsiv und somit Ca^{2+} -unabhängig interagieren. Obwohl viele Faktoren der Regulation der Bindungseigenschaften desmosomaler Cadherine und physiologischen und pathologischen Bedingungen identifiziert werden konnten, sind die Mechanismen insbesondere der Hyperadhäsion sowie der genaue Interaktionsmechanismus weiterhin unzureichend verstanden und sollen auch zukünftig im Fokus unserer Forschung stehen. Durch ein genaueres Verständnis der biophysikalischen Eigenschaften von Interaktionen desmosomaler Cadherine und der Regulation der desmosomalen Haftung bei Pemphigus können neue Erkenntnisse gewonnen werden, die langfristig zu therapeutischen Strategien zur Stabilisierung der desmosomalen Haftung eingesetzt werden sollen. Hierfür ist Apremilast ein erstes erfolgreiches Beispiel.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die hier zusammengefassten Arbeiten untersuchten mit biophysikalischen Methoden die Mechanismen von Dsg-Interaktionen. Wir konnten hierbei homo- und heterophile Interaktionen desmosomaler Cadherine detektieren, die teilweise abhängig von den biologischen Situationen präferentiell eingegangen wurden. Darüber hinaus zeigte sich, dass die Bindungseigenschaften der Dsg-Isoformen einer komplexen Regulation unterliegen und sowohl von der zellulären Lokalisation, der intrazellulären Kopplung an desmosomale Plaqueproteine sowie der Verankerung an das Zytoskelett abhängig sind. Auch die Einbindung in Signalwege und deren Regulation trägt wichtiger Weise zu einer adäquaten Haftung auf Einzelmolekülebene bei. Auch Hyper-adhäsivität verändert vermutlich Isoform-abhängig die Bindungseigenschaften desmosomaler Cadherine. Darüber hinaus konnten dadurch Mechanismen der Pemphigus-Pathogenese untersucht und aufgeklärt werden, was zukünftig die Grundlage für neue Therapieoptionen bei Pemphigus bilden soll. Insbesondere bei Apremilast und protektiven cAMP-Signaling bei Pemphigus ist damit ein Therapieansatz, der direkt an der Keratinozytenhaftung ansetzt, identifiziert worden.

Mit dem Ansatz, dass die eingegangenen Bindungsmodalitäten von den biologischen Umständen abhängen, soll auch weiterhin die Regulation der Bindungseigenschaften desmosomaler Cadherine, insbesondere beim Wechselspiel zwischen epidermaler Wundheilung und desmosomaler Hyperadhäsion in der Epidermis untersucht werden. Dabei steht zukünftig auch die Applikation von mechanischer Belastung sowie die Aufklärung des Bindungsmechanismus von homo- und heterophilen Interaktionen desmosomaler Cadherine im Fokus.

6. Literaturverzeichnis

- Acehan, D., C. Petzold, I. Gumper, D.D. Sabatini, E.J. Muller, P. Cowin, and D.L. Stokes. 2008. Plakoglobin is required for effective intermediate filament anchorage to desmosomes. *J Invest Dermatol.* 128:2665-2675.
- Akhyani, M., A. Keshtkar-Jafari, C. Chams-Davatchi, V. Lajevardi, S. Beigi, N. Aghazadeh, M. Rayati Damavandi, and S. Arami. 2014. Ocular involvement in pemphigus vulgaris. *J Dermatol.* 41:618-621.
- Aktary, Z., M. Alaei, and M. Pasdar. 2017. Beyond cell-cell adhesion: Plakoglobin and the regulation of tumorigenesis and metastasis. *Oncotarget.* 8:32270-32291.
- Al-Amoudi, A., D. Castano-Diez, D.P. Devos, R.B. Russell, G.T. Johnson, and A.S. Frangakis. 2011. The three-dimensional molecular structure of the desmosomal plaque. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:6480-6485.
- Al-Amoudi, A., D.C. Diez, M.J. Betts, and A.S. Frangakis. 2007. The molecular architecture of cadherins in native epidermal desmosomes. *Nature.* 450:832-837.
- Al-Amoudi, A., J. Dubochet, and L. Norlen. 2005. Nanostructure of the epidermal extracellular space as observed by cryo-electron microscopy of vitreous sections of human skin. *J Invest Dermatol.* 124:764-777.
- Al-Amoudi, A., and A.S. Frangakis. 2008. Structural studies on desmosomes. *Biochem Soc Trans.* 36:181-187.
- Al-Jassar, C., T. Knowles, M. Jeeves, K. Kami, E. Behr, H. Bikker, M. Overduin, and M. Chidgey. 2011. The nonlinear structure of the desmoplakin plakin domain and the effects of cardiomyopathy-linked mutations. *J Mol Biol.* 411:1049-1061.
- Albrecht, L.V., L. Zhang, J. Shabanowitz, E. Purevjav, J.A. Towbin, D.F. Hunt, and K.J. Green. 2015. GSK3- and PRMT-1-dependent modifications of desmoplakin control desmoplakin-cytoskeleton dynamics. *J Cell Biol.* 208:597-612.
- Allison, D.P., N.P. Mortensen, C.J. Sullivan, and M.J. Doktycz. 2010. Atomic force microscopy of biological samples. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2:618-634.
- Amagai, M. 2010. Autoimmune and infectious skin diseases that target desmogleins. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 86:524-537.
- Amagai, M., S. Karpati, R. Prussick, V. Klaus-Kovtun, and J.R. Stanley. 1992. Autoantibodies against the amino-terminal cadherin-like binding domain of pemphigus vulgaris antigen are pathogenic. *J Clin Invest.* 90:919-926.
- Amagai, M., N. Matsuyoshi, Z.H. Wang, C. Andl, and J.R. Stanley. 2000. Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1. *Nat Med.* 6:1275-1277.
- Amber, K.T., M. Valdebran, and S.A. Grando. 2018. Non-Desmoglein Antibodies in Patients With Pemphigus Vulgaris. *Front Immunol.* 9:1190.
- Aoyama, Y., and Y. Kitajima. 1999. Pemphigus vulgaris-IgG causes a rapid depletion of desmoglein 3 (Dsg3) from the Triton X-100 soluble pools, leading to the formation of Dsg3-depleted desmosomes in a human squamous carcinoma cell line, DJM-1 cells. *J Invest Dermatol.* 112:67-71.
- Aoyama, Y., M.K. Owada, and Y. Kitajima. 1999. A pathogenic autoantibody, pemphigus vulgaris-IgG, induces phosphorylation of desmoglein 3, and its dissociation from plakoglobin in cultured keratinocytes. *Eur J Immunol.* 29:2233-2240.
- Aoyama, Y., Y. Yamamoto, F. Yamaguchi, and Y. Kitajima. 2009. Low to high Ca²⁺ -switch causes phosphorylation and association of desmocollin 3 with plakoglobin and desmoglein 3 in cultured keratinocytes. *Exp Dermatol.* 18:404-408.
- Balica, S., C. Bulai Livideanu, P. Fournie, F. Fortenfant, V. Soler, S. Barbarot, and C. Paul. 2013. Is conjunctival mucous involvement a marker of severity in pemphigus vulgaris? *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 27:520-521.

- Bar, J., V. Kumar, W. Roth, N. Schwarz, M. Richter, R.E. Leube, and T.M. Magin. 2014. Skin fragility and impaired desmosomal adhesion in mice lacking all keratins. *J Invest Dermatol.* 134:1012-1022.
- Bartle, E.I., T.C. Rao, R.R. Beggs, W.F. Dean, T.M. Urner, A.P. Kowalczyk, and A.L. Mattheyses. 2020. Protein exchange is reduced in calcium-independent epithelial junctions. *J Cell Biol.* 219.
- Bartle, E.I., T.M. Urner, S.S. Raju, and A.L. Mattheyses. 2017. Desmoglein 3 Order and Dynamics in Desmosomes Determined by Fluorescence Polarization Microscopy. *Biophys J.* 113:2519-2529.
- Bass-Zubek, A.E., R.P. Hobbs, E.V. Amargo, N.J. Garcia, S.N. Hsieh, X. Chen, J.K. Wahl, 3rd, M.F. Denning, and K.J. Green. 2008. Plakophilin 2: a critical scaffold for PKC alpha that regulates intercellular junction assembly. *J Cell Biol.* 181:605-613.
- Baumgartner, W., N. Golenhofen, N. Grundhofer, J. Wiegand, and D. Drenckhahn. 2003. Ca²⁺ dependency of N-cadherin function probed by laser tweezer and atomic force microscopy. *J Neurosci.* 23:11008-11014.
- Baumgartner, W., P. Hinterdorfer, W. Ness, A. Raab, D. Vestweber, H. Schindler, and D. Drenckhahn. 2000. Cadherin interaction probed by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:4005-4010.
- Beek, N.V., D. Zillikens, and E. Schmidt. 2021. Bullous Autoimmune Dermatoses: Clinical Features, Diagnostic Evaluation, and Treatment Options. *Dtsch Arztebl Int.* 118.
- Beggs, R.R., T.C. Rao, W.F. Dean, A.P. Kowalczyk, and A.L. Mattheyses. 2022. Desmosomes undergo dynamic architectural changes during assembly and maturation. *Tissue Barriers.* 10:2017225.
- Bell, G.I. 1978. Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science.* 200:618-627.
- Benito-Martinez, S., Y. Zhu, R.A. Jani, D.C. Harper, M.S. Marks, and C. Delevoye. 2020. Research Techniques Made Simple: Cell Biology Methods for the Analysis of Pigmentation. *J Invest Dermatol.* 140:257-268 e258.
- Berkowitz, P., M. Chua, Z. Liu, L.A. Diaz, and D.S. Rubenstein. 2008a. Autoantibodies in the autoimmune disease pemphigus foliaceus induce blistering via p38 mitogen-activated protein kinase-dependent signaling in the skin. *Am J Pathol.* 173:1628-1636.
- Berkowitz, P., L.A. Diaz, R.P. Hall, and D.S. Rubenstein. 2008b. Induction of p38MAPK and HSP27 phosphorylation in pemphigus patient skin. *J Invest Dermatol.* 128:738-740.
- Berkowitz, P., P. Hu, Z. Liu, L.A. Diaz, J.J. Enghild, M.P. Chua, and D.S. Rubenstein. 2005. Desmosome signaling. Inhibition of p38MAPK prevents pemphigus vulgaris IgG-induced cytoskeleton reorganization. *J Biol Chem.* 280:23778-23784.
- Berkowitz, P., P. Hu, S. Warren, Z. Liu, L.A. Diaz, and D.S. Rubenstein. 2006. p38MAPK inhibition prevents disease in pemphigus vulgaris mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:12855-12860.
- Blanpain, C., and E. Fuchs. 2006. Epidermal stem cells of the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 22:339-373.
- Blanpain, C., and E. Fuchs. 2009. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:207-217.
- Block, J., V. Schroeder, P. Pawelzyk, N. Willenbacher, and S. Koster. 2015. Physical properties of cytoplasmic intermediate filaments. *Biochim Biophys Acta.* 1853:3053-3064.
- Boggon, T.J., J. Murray, S. Chappuis-Flament, E. Wong, B.M. Gumbiner, and L. Shapiro. 2002. C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science.* 296:1308-1313.
- Bonne, S., B. Gilbert, M. Hatzfeld, X. Chen, K.J. Green, and F. van Roy. 2003. Defining desmosomal plakophilin-3 interactions. *J Cell Biol.* 161:403-416.
- Boukamp, P., R.T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham, and N.E. Fusenig. 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol.* 106:761-771.
- Brasch, J., O.J. Harrison, B. Honig, and L. Shapiro. 2012. Thinking outside the cell: how cadherins drive adhesion. *Trends Cell Biol.* 22:299-310.
- Brennan, D., Y. Hu, A. Kljuic, Y. Choi, S. Joubert, M. Bashkin, J. Wahl, A. Fertala, L. Pulkkinen, J. Uitto, A.M. Christiano, A. Panteleyev, and M.G. Mahoney. 2004. Differential structural properties

- and expression patterns suggest functional significance for multiple mouse desmoglein 1 isoforms. *Differentiation*. 72:434-449.
- Brennan, D., Y. Hu, W. Medhat, A. Dowling, and M.G. Mahoney. 2010. Superficial dsG2 expression limits epidermal blister formation mediated by pemphigus foliaceus antibodies and exfoliative toxins. *Dermatol Res Pract*. 2010:410278.
- Broussard, J.A., S. Getsios, and K.J. Green. 2015. Desmosome regulation and signaling in disease. *Cell Tissue Res*. 360:501-512.
- Buchau, F., F. Vielmuth, J. Waschke, and T.M. Magin. 2022. Bidirectional regulation of desmosome hyperadhesion by keratin isoforms and desmosomal components. *Cell Mol Life Sci*. 79:223.
- Buckley, C.D., J. Tan, K.L. Anderson, D. Hanein, N. Volkmann, W.I. Weis, W.J. Nelson, and A.R. Dunn. 2014. Cell adhesion. The minimal cadherin-catenin complex binds to actin filaments under force. *Science*. 346:1254211.
- Burmester, I.A.K., S. Flaswinkel, C.S. Thies, A. Kasprick, M. Kamaguchi, V. Bumiller-Bini, S. Emtenani, N. Feldmann, K. Kridin, E. Schmidt, N. van Beek, D. Zillikens, C.M. Hammers, J.E. Hundt, and R.J. Ludwig. 2020. Identification of novel therapeutic targets for blocking acantholysis in pemphigus. *Br J Pharmacol*. 177:5114-5130.
- Calkins, C.C., and S.V. Setzer. 2007. Spotting Desmosomes: The First 100 Years. *J Invest Dermatol*. 127 Suppl 3:E2-3.
- Calkins, C.C., S.V. Setzer, J.M. Jennings, S. Summers, K. Tsunoda, M. Amagai, and A.P. Kowalczyk. 2006. Desmoglein endocytosis and desmosome disassembly are coordinated responses to pemphigus autoantibodies. *J Biol Chem*. 281:7623-7634.
- Candi, E., R. Schmidt, and G. Melino. 2005. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6:328-340.
- Chen, X., S. Bonne, M. Hatzfeld, F. van Roy, and K.J. Green. 2002. Protein binding and functional characterization of plakophilin 2. Evidence for its diverse roles in desmosomes and beta-catenin signaling. *J Biol Chem*. 277:10512-10522.
- Chen, Y.J., J.T. Chang, L. Lee, H.M. Wang, C.T. Liao, C.C. Chiu, P.J. Chen, and A.J. Cheng. 2007. DSG3 is overexpressed in head neck cancer and is a potential molecular target for inhibition of oncogenesis. *Oncogene*. 26:467-476.
- Chitaev, N.A., and S.M. Troyanovsky. 1997. Direct Ca²⁺-dependent heterophilic interaction between desmosomal cadherins, desmoglein and desmocollin, contributes to cell-cell adhesion. *J Cell Biol*. 138:193-201.
- Cho, J.A., A.H. Lee, B. Platzer, B.C.S. Cross, B.M. Gardner, H. De Luca, P. Luong, H.P. Harding, L.H. Glimcher, P. Walter, E. Fiebigler, D. Ron, J.C. Kagan, and W.I. Lencer. 2018. Retraction Notice to: The Unfolded Protein Response Element IRE1 α Senses Bacterial Proteins Invading the ER to Activate RIG-I and Innate Immune Signaling. *Cell Host Microbe*. 23:571.
- Choi, H.J., J.C. Gross, S. Pokutta, and W.I. Weis. 2009. Interactions of plakoglobin and beta-catenin with desmosomal cadherins: basis of selective exclusion of alpha- and beta-catenin from desmosomes. *J Biol Chem*. 284:31776-31788.
- Choi, H.J., and W.I. Weis. 2005. Structure of the armadillo repeat domain of plakophilin 1. *J Mol Biol*. 346:367-376.
- Cirillo, N., E. AlShwaimi, M. McCullough, and S.S. Prime. 2014. Pemphigus vulgaris autoimmune globulin induces Src-dependent tyrosine-phosphorylation of plakophilin 3 and its detachment from desmoglein 3. *Autoimmunity*. 47:134-140.
- Cirillo, N., F. Femiano, A. Dell'Ermo, P. Arnese, F. Gombos, and A. Lanza. 2007a. A novel method to investigate pemphigus-induced keratinocyte dysmorphisms through living cell immunofluorescence microscopy. *Virchows Arch*. 450:683-690.
- Cirillo, N., F. Gombos, and A. Lanza. 2007b. Changes in desmoglein 1 expression and subcellular localization in cultured keratinocytes subjected to anti-desmoglein 1 pemphigus autoimmunity. *J Cell Physiol*. 210:411-416.

- Cirillo, N., A. Lanza, and S.S. Prime. 2010. Induction of hyper-adhesion attenuates autoimmune-induced keratinocyte cell-cell detachment and processing of adhesion molecules via mechanisms that involve PKC. *Exp Cell Res.* 316:580-592.
- Cohen-Barak, E., L.M. Godsel, J.L. Koetsier, M. Hegazy, D. Kushnir-Grinbaum, H. Hammad, N. Danial-Farran, R. Harmon, M. Khayat, R. Bochner, A. Peled, M. Rozenblat, J. Krausz, O. Sarig, J.L. Johnson, M. Ziv, S.A. Shalev, E. Sprecher, and K.J. Green. 2020. The Role of Desmoglein 1 in Gap Junction Turnover Revealed through the Study of SAM Syndrome. *J Invest Dermatol.* 140:556-567 e559.
- Coulombe, P.A., and M.B. Omary. 2002. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol.* 14:110-122.
- Cowin, P., H.P. Kapprell, W.W. Franke, J. Tamkun, and R.O. Hynes. 1986. Plakoglobin: a protein common to different kinds of intercellular adhering junctions. *Cell.* 46:1063-1073.
- Daday, C., K. Kolsek, and F. Grater. 2017. The mechano-sensing role of the unique SH3 insertion in plakin domains revealed by Molecular Dynamics simulations. *Sci Rep.* 7:11669.
- Dean, W.F., and A.L. Mattheyses. 2022. Defining domain-specific orientational order in the desmosomal cadherins. *Biophys J.* 121:4325-4341.
- Dehner, C., V. Rotzer, J. Waschke, and V. Spindler. 2014. A desmoplakin point mutation with enhanced keratin association ameliorates pemphigus vulgaris autoantibody-mediated loss of cell cohesion. *Am J Pathol.* 184:2528-2536.
- Delva, E., J.M. Jennings, C.C. Calkins, M.D. Kottke, V. Faundez, and A.P. Kowalczyk. 2008. Pemphigus vulgaris IgG-induced desmoglein-3 endocytosis and desmosomal disassembly are mediated by a clathrin- and dynamin-independent mechanism. *J Biol Chem.* 283:18303-18313.
- Delva, E., D.K. Tucker, and A.P. Kowalczyk. 2009. The desmosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1:a002543.
- Demlehner, M.P., S. Schafer, C. Grund, and W.W. Franke. 1995. Continual assembly of half-desmosomal structures in the absence of cell contacts and their frustrated endocytosis: a coordinated Sisyphus cycle. *J Cell Biol.* 131:745-760.
- Denda, M., S. Fuziwara, and K. Inoue. 2003. Beta2-adrenergic receptor antagonist accelerates skin barrier recovery and reduces epidermal hyperplasia induced by barrier disruption. *J Invest Dermatol.* 121:142-148.
- Denning, M.F., S.G. Guy, S.M. Ellerbroek, S.M. Norvell, A.P. Kowalczyk, and K.J. Green. 1998. The expression of desmoglein isoforms in cultured human keratinocytes is regulated by calcium, serum, and protein kinase C. *Exp Cell Res.* 239:50-59.
- Di Zeno, G., G. Di Lullo, D. Corti, V. Calabresi, A. Sinistro, F. Vanzetta, B. Didona, G. Cianchini, M. Hertl, R. Eming, M. Amagai, B. Ohyama, T. Hashimoto, J. Sloostra, F. Sallusto, G. Zambruno, and A. Lanzavecchia. 2012. Pemphigus autoantibodies generated through somatic mutations target the desmoglein-3 cis-interface. *J Clin Invest.* 122:3781-3790.
- Dieding, M., J.D. Debus, R. Kerkhoff, A. Gaertner-Rommel, V. Walhorn, H. Milting, and D. Anselmetti. 2017. Arrhythmogenic cardiomyopathy related DSG2 mutations affect desmosomal cadherin binding kinetics. *Sci Rep.* 7:13791.
- Diercks, G.F., H.H. Pas, and M.F. Jonkman. 2009. The ultrastructure of acantholysis in pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol.* 160:460-461.
- Dufrene, Y.F., T. Ando, R. Garcia, D. Alsteens, D. Martinez-Martin, A. Engel, C. Gerber, and D.J. Muller. 2017. Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology. *Nat Nanotechnol.* 12:295-307.
- Dufrene, Y.F., and P. Hinterdorfer. 2008. Recent progress in AFM molecular recognition studies. *Pflugers Arch.* 456:237-245.
- Dufrene, Y.F., D. Martinez-Martin, I. Medalsy, D. Alsteens, and D.J. Muller. 2013. Multiparametric imaging of biological systems by force-distance curve-based AFM. *Nat Methods.* 10:847-854.
- Dusek, R.L., and L.D. Attardi. 2011. Desmosomes: new perpetrators in tumour suppression. *Nat Rev Cancer.* 11:317-323.

- Egu, D.T., D. Kugelmann, and J. Waschke. 2019. Role of PKC and ERK Signaling in Epidermal Blistering and Desmosome Regulation in Pemphigus. *Front Immunol.* 10:2883.
- Egu, D.T., T. Schmitt, and J. Waschke. 2022. Mechanisms Causing Acantholysis in Pemphigus-Lessons from Human Skin. *Front Immunol.* 13:884067.
- Egu, D.T., E. Walter, V. Spindler, and J. Waschke. 2017. Inhibition of p38MAPK signaling prevents epidermal blistering and alterations of desmosome structure induced by pemphigus autoantibodies in human epidermis. *Br J Dermatol.*
- Evans, E. 1998. Energy landscapes of biomolecular adhesion and receptor anchoring at interfaces explored with dynamic force spectroscopy. *Faraday Discuss:*1-16.
- Evans, E., and K. Ritchie. 1997. Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophys J.* 72:1541-1555.
- Franke, W.W. 2009. Discovering the molecular components of intercellular junctions--a historical view. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1:a003061.
- Franke, W.W., S. Rickelt, M. Barth, and S. Pieperhoff. 2009. The junctions that don't fit the scheme: special symmetrical cell-cell junctions of their own kind. *Cell Tissue Res.* 338:1-17.
- Friedrichs, J., K.R. Legate, R. Schubert, M. Bharadwaj, C. Werner, D.J. Muller, and M. Benoit. 2013. A practical guide to quantify cell adhesion using single-cell force spectroscopy. *Methods.* 60:169-178.
- Fuchs, M., M. Foresti, M.Y. Radeva, D. Kugelmann, R. Keil, M. Hatzfeld, V. Spindler, J. Waschke, and F. Vielmuth. 2019. Plakophilin 1 but not plakophilin 3 regulates desmoglein clustering. *Cell Mol Life Sci.*
- Fuchs, M., D. Kugelmann, N. Schlegel, F. Vielmuth, and J. Waschke. 2022. Desmoglein 2 can undergo Ca(2+)-dependent interactions with both desmosomal and classical cadherins including E-cadherin and N-cadherin. *Biophys J.*
- Fuchs, M., M.Y. Radeva, V. Spindler, F. Vielmuth, D. Kugelmann, and J. Waschke. 2023. Cytoskeletal anchorage of different Dsg3 pools revealed by combination of hybrid STED/SMFS-AFM. *Cell Mol Life Sci.* 80:25.
- Fuchs, M., A.M. Sigmund, J. Waschke, and F. Vielmuth. 2020. Desmosomal Hyperadhesion Is Accompanied with Enhanced Binding Strength of Desmoglein 3 Molecules. *Biophys J.* 119:1489-1500.
- Fulle, J.B., H. Huppert, D. Liebl, J. Liu, R. Alves de Almeida, B. Yanes, G.D. Wright, E.B. Lane, D.R. Garrod, and C. Ballestrem. 2021. Desmosome dualism - most of the junction is stable, but a plakophilin moiety is persistently dynamic. *J Cell Sci.* 134.
- Furuse, M., M. Hata, K. Furuse, Y. Yoshida, A. Haratake, Y. Sugitani, T. Noda, A. Kubo, and S. Tsukita. 2002. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol.* 156:1099-1111.
- Galichet, A., L. Borradori, and E.J. Muller. 2014. A new light on an old disease: adhesion signaling in pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol.* 134:8-10.
- Garcia-Saez, A.J., and P. Schwillle. 2007. Single molecule techniques for the study of membrane proteins. *Appl Microbiol Biotechnol.* 76:257-266.
- Garcia-Vega, L., E.M. O'Shaughnessy, A. Albuloushi, and P.E. Martin. 2021. Connexins and the Epithelial Tissue Barrier: A Focus on Connexin 26. *Biology (Basel).* 10.
- Garrod, D. 2010. Desmosomes in vivo. *Dermatol Res Pract.* 2010:212439.
- Garrod, D., and T.E. Kimura. 2008. Hyper-adhesion: a new concept in cell-cell adhesion. *Biochem Soc Trans.* 36:195-201.
- Garrod, D., and L. Taberner. 2014. Hyper-adhesion: a unique property of desmosomes. *Cell Commun Adhes.* 21:249-256.
- Garrod, D.R. 2013. The assay that defines desmosome hyper-adhesion. *J Invest Dermatol.* 133:576-577.
- Garrod, D.R., M.Y. Berika, W.F. Bardsley, D. Holmes, and L. Taberner. 2005. Hyper-adhesion in desmosomes: its regulation in wound healing and possible relationship to cadherin crystal structure. *J Cell Sci.* 118:5743-5754.

- Gliem, M., W.M. Heupel, V. Spindler, G.S. Harms, and J. Waschke. 2010. Actin reorganization contributes to loss of cell adhesion in pemphigus vulgaris. *Am J Physiol Cell Physiol.* 299:C606-613.
- Godsel, L.M., A.D. Dubash, A.E. Bass-Zubek, E.V. Amargo, J.L. Klessner, R.P. Hobbs, X. Chen, and K.J. Green. 2010. Plakophilin 2 couples actomyosin remodeling to desmosomal plaque assembly via RhoA. *Mol Biol Cell.* 21:2844-2859.
- Godsel, L.M., S.N. Hsieh, E.V. Amargo, A.E. Bass, L.T. Pascoe-McGillicuddy, A.C. Huen, M.E. Thorne, C.A. Gaudry, J.K. Park, K. Myung, R.D. Goldman, T.L. Chew, and K.J. Green. 2005. Desmoplakin assembly dynamics in four dimensions: multiple phases differentially regulated by intermediate filaments and actin. *J Cell Biol.* 171:1045-1059.
- Gonzales, K.A.U., and E. Fuchs. 2017. Skin and Its Regenerative Powers: An Alliance between Stem Cells and Their Niche. *Dev Cell.* 43:387-401.
- Grando, S.A. 2000. Autoimmunity to keratinocyte acetylcholine receptors in pemphigus. *Dermatology.* 201:290-295.
- Grando, S.A., M.R. Pittelkow, and K.U. Schallreuter. 2006. Adrenergic and cholinergic control in the biology of epidermis: physiological and clinical significance. *J Invest Dermatol.* 126:1948-1965.
- Green, K.J., A. Jaiganesh, and J.A. Broussard. 2019. Desmosomes: Essential contributors to an integrated intercellular junction network. *F1000Res.* 8.
- Gurjar, M., K. Raychaudhuri, S. Mahadik, D. Reddy, A. Atak, T. Shetty, K. Rao, M.S. Karkhanis, P. Gosavi, L. Sehgal, S. Gupta, and S.N. Dalal. 2018. Plakophilin3 increases desmosome assembly, size and stability by increasing expression of desmocollin2. *Biochem Biophys Res Commun.* 495:768-774.
- Harmon, R.M., and K.J. Green. 2013. Structural and functional diversity of desmosomes. *Cell Commun Adhes.* 20:171-187.
- Harrison, O.J., F. Bahna, P.S. Katsamba, X. Jin, J. Brasch, J. Vendome, G. Ahlsen, K.J. Carroll, S.R. Price, B. Honig, and L. Shapiro. 2010. Two-step adhesive binding by classical cadherins. *Nat Struct Mol Biol.* 17:348-357.
- Harrison, O.J., J. Brasch, G. Lasso, P.S. Katsamba, G. Ahlsen, B. Honig, and L. Shapiro. 2016. Structural basis of adhesive binding by desmocollins and desmogleins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 113:7160-7165.
- Hartlieb, E., B. Kempf, M. Partilla, B. Vigh, V. Spindler, and J. Waschke. 2013. Desmoglein 2 is less important than desmoglein 3 for keratinocyte cohesion. *PLoS One.* 8:e53739.
- Hartlieb, E., V. Rotzer, M. Radeva, V. Spindler, and J. Waschke. 2014. Desmoglein 2 compensates for desmoglein 3 but does not control cell adhesion via regulation of p38-mitogen-activated protein-kinase in keratinocytes. *J Biol Chem.*
- Hatzfeld, M. 2007. Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion? *Biochim Biophys Acta.* 1773:69-77.
- Hatzfeld, M., R. Keil, and T.M. Magin. 2017. Desmosomes and Intermediate Filaments: Their Consequences for Tissue Mechanics. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 9.
- Hatzfeld, M., A. Wolf, and R. Keil. 2014. Plakophilins in desmosomal adhesion and signaling. *Cell Commun Adhes.* 21:25-42.
- He, W., P. Cowin, and D.L. Stokes. 2003. Untangling desmosomal knots with electron tomography. *Science.* 302:109-113.
- Hegazy, M., A.L. Perl, S.A. Svoboda, and K.J. Green. 2022. Desmosomal Cadherins in Health and Disease. *Annu Rev Pathol.* 17:47-72.
- Heid, H.W., A. Schmidt, R. Zimbelmann, S. Schafer, S. Winter-Simanowski, S. Stumpp, M. Keith, U. Figge, M. Schnolzer, and W.W. Franke. 1994. Cell type-specific desmosomal plaque proteins of the plakoglobin family: plakophilin 1 (band 6 protein). *Differentiation.* 58:113-131.
- Herrmann, H., S.V. Strelkov, P. Burkhard, and U. Aebi. 2009. Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity. *J Clin Invest.* 119:1772-1783.

- Heupel, W.M., A. Efthymiadis, N. Schlegel, T. Muller, Y. Baumer, W. Baumgartner, D. Drenckhahn, and J. Waschke. 2009a. Endothelial barrier stabilization by a cyclic tandem peptide targeting VE-cadherin transinteraction in vitro and in vivo. *J Cell Sci.* 122:1616-1625.
- Heupel, W.M., T. Muller, A. Efthymiadis, E. Schmidt, D. Drenckhahn, and J. Waschke. 2009b. Peptides Targeting the Desmoglein 3 Adhesive Interface Prevent Autoantibody-induced Acantholysis in Pemphigus. *J Biol Chem.* 284:8589-8595.
- Heupel, W.M., D. Zillikens, D. Drenckhahn, and J. Waschke. 2008. Pemphigus vulgaris IgG directly inhibit desmoglein 3-mediated transinteraction. *J Immunol.* 181:1825-1834.
- Hiermaier, M., F. Kliewe, C. Schinner, C. Studle, I.P. Maly, M.T. Wanuske, V. Rotzer, N. Endlich, F. Vielmuth, J. Waschke, and V. Spindler. 2021. The Actin-Binding Protein alpha-Adducin Modulates Desmosomal Turnover and Plasticity. *J Invest Dermatol.* 141:1219-1229 e1211.
- Hiermaier, M., D. Kugelmann, M.Y. Radeva, D. Didona, K. Ghoreschi, S. Farzan, M. Hertl, and J. Waschke. 2022. Pemphigus Foliaceus Autoantibodies Induce Redistribution Primarily of Extrademosomal Desmoglein 1 in the Cell Membrane. *Front Immunol.* 13:882116.
- Hobbs, R.P., and K.J. Green. 2012. Desmoplakin regulates desmosome hyperadhesion. *J Invest Dermatol.* 132:482-485.
- Hofmann, I. 2020. Plakophilins and their roles in diseased states. *Cell Tissue Res.* 379:5-12.
- Hu, C.H., B. Michel, and J.R. Schiltz. 1978. Epidermal acantholysis induced in vitro by pemphigus autoantibody. An ultrastructural study. *Am J Pathol.* 90:345-362.
- Huber, O., and I. Petersen. 2015. 150th Anniversary Series: Desmosomes and the Hallmarks of Cancer. *Cell Commun Adhes.* 22:15-28.
- Hudemann, C., Y. Exner, R. Pollmann, K. Schneider, A. Zakrzewicz, S. Feldhoff, T. Schmidt, V. Spindler, D. Rafei-Shamsabadi, F. Vollner, J. Waschke, R. Tikkanen, M. Hertl, and R. Eming. 2023. IgG against the Membrane-Proximal Portion of the Desmoglein 3 Ectodomain Induces Loss of Keratinocyte Adhesion, a Hallmark in Pemphigus Vulgaris. *J Invest Dermatol.* 143:254-263 e253.
- Hudemann, C., R. Maglie, M. Llamazares-Prada, B. Beckert, D. Didona, R. Tikkanen, T. Schmitt, T. Hashimoto, J. Waschke, M. Hertl, and R. Eming. 2022. Human Desmocollin 3 Specific IgG Antibodies Are Pathogenic in a Humanized HLA Class II Transgenic Mouse Model of Pemphigus. *J Invest Dermatol.* 142:915-923 e913.
- Hunt, D.M., V.K. Sahota, K. Taylor, D. Simrak, N. Hornigold, J. Arnemann, J. Wolfe, and R.S. Buxton. 1999. Clustered cadherin genes: a sequence-ready contig for the desmosomal cadherin locus on human chromosome 18. *Genomics.* 62:445-455.
- Ishii, K., K. Yoshida, J.R. Stanley, J. Yamagami, M. Amagai, and A. Ishiko. 2020. Pemphigus vulgaris and foliaceus IgG autoantibodies directly block heterophilic trans-interaction between desmoglein and desmocollin. *J Invest Dermatol.*
- Iwatsuki, K., G.W. Han, R. Fukuti, M. Ohtsuka, S. Kikuchi, H. Akiba, and F. Kaneko. 1999. Internalization of constitutive desmogleins with the subsequent induction of desmoglein 2 in pemphigus lesions. *Br J Dermatol.* 140:35-43.
- Jennings, J.M., D.K. Tucker, M.D. Kottke, M. Saito, E. Delva, Y. Hanakawa, M. Amagai, and A.P. Kowalczyk. 2011. Desmosome disassembly in response to pemphigus vulgaris IgG occurs in distinct phases and can be reversed by expression of exogenous Dsg3. *J Invest Dermatol.* 131:706-718.
- Johnson, J.L., N.A. Najor, and K.J. Green. 2014. Desmosomes: regulators of cellular signaling and adhesion in epidermal health and disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 4:a015297.
- Jolly, P.S., P. Berkowitz, M. Bektas, H.E. Lee, M. Chua, L.A. Diaz, and D.S. Rubenstein. 2010. p38MAPK signaling and desmoglein-3 internalization are linked events in pemphigus acantholysis. *J Biol Chem.* 285:8936-8941.
- Joly, P., B. Horvath, A. Patsatsi, S. Uzun, R. Bech, S. Beissert, R. Bergman, P. Bernard, L. Borradori, M. Caproni, F. Caux, G. Cianchini, M. Daneshpazhoo, D. De, M. Dmochowski, K. Drenovska, J. Ehrchen, C. Feliciani, M. Goebeler, R. Groves, C. Guenther, S. Hofmann, D. Ioannides, C. Kowalewski, R. Ludwig, Y.L. Lim, B. Marinovic, A.V. Marzano, J.M. Mascaró, Jr., D. Mimouni,

- D.F. Murrell, C. Pincelli, C.P. Squarcioni, M. Sardy, J. Setterfield, E. Sprecher, S. Vassileva, K. Wozniak, S. Yayli, G. Zambruno, D. Zillikens, M. Hertl, and E. Schmidt. 2020. Updated S2K guidelines on the management of pemphigus vulgaris and foliaceus initiated by the european academy of dermatology and venereology (EADV). *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 34:1900-1913.
- Joly, P., and N. Litrowski. 2011. Pemphigus group (vulgaris, vegetans, foliaceus, herpetiformis, brasiliensis). *Clin Dermatol.* 29:432-436.
- Karsch, S., F. Buchau, T.M. Magin, and A. Janshoff. 2020. An intact keratin network is crucial for mechanical integrity and barrier function in keratinocyte cell sheets. *Cell Mol Life Sci.* 77:4397-4411.
- Kasperkiewicz, M., C.T. Ellebrecht, H. Takahashi, J. Yamagami, D. Zillikens, A.S. Payne, and M. Amagai. 2017. Pemphigus. *Nat Rev Dis Primers.* 3:17026.
- Kawasaki, Y., Y. Aoyama, K. Tsunoda, M. Amagai, and Y. Kitajima. 2006. Pathogenic monoclonal antibody against desmoglein 3 augments desmoglein 3 and p38 MAPK phosphorylation in human squamous carcinoma cell line. *Autoimmunity.* 39:587-590.
- Keating, G.M. 2017. Apremilast: A Review in Psoriasis and Psoriatic Arthritis. *Drugs.* 77:459-472.
- Keil, R., K. Rietscher, and M. Hatzfeld. 2016. Antagonistic regulation of intercellular cohesion by plakophilins 1 and 3. *J Invest Dermatol.*
- Kitajima, Y. 2013. New insights into desmosome regulation and pemphigus blistering as a desmosome-remodeling disease. *Kaohsiung J Med Sci.* 29:1-13.
- Kneisel, A., and M. Hertl. 2011a. Autoimmune bullous skin diseases. Part 1: Clinical manifestations. *J Dtsch Dermatol Ges.* 9:844-856; quiz 857.
- Kneisel, A., and M. Hertl. 2011b. Autoimmune bullous skin diseases. Part 2: diagnosis and therapy. *J Dtsch Dermatol Ges.* 9:927-947.
- Koch, P.J., M.G. Mahoney, H. Ishikawa, L. Pulkkinen, J. Uitto, L. Shultz, G.F. Murphy, D. Whitaker-Menezes, and J.R. Stanley. 1997. Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris. *J Cell Biol.* 137:1091-1102.
- Korman, N.J., R.W. Eyre, V. Klaus-Kovtun, and J.R. Stanley. 1989. Demonstration of an adhering-junction molecule (plakoglobin) in the autoantigens of pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris. *N Engl J Med.* 321:631-635.
- Kowalczyk, A.P., and K.J. Green. 2013. Structure, function, and regulation of desmosomes. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 116:95-118.
- Kroger, C., F. Loschke, N. Schwarz, R. Windoffer, R.E. Leube, and T.M. Magin. 2013. Keratins control intercellular adhesion involving PKC- α -mediated desmoplakin phosphorylation. *J Cell Biol.* 201:681-692.
- Krug, S.M., J.D. Schulzke, and M. Fromm. 2014. Tight junction, selective permeability, and related diseases. *Semin Cell Dev Biol.* 36:166-176.
- Kugelmann, D., M.Y. Radeva, V. Spindler, and J. Waschke. 2019a. Desmoglein 1 Deficiency Causes Lethal Skin Blistering. *J Invest Dermatol.* 139:1596-1599 e1592.
- Kugelmann, D., V. Rotzer, E. Walter, D.T. Egu, M.T. Fuchs, F. Vielmuth, H. Vargas-Robles, M. Schnoor, M. Hertl, R. Eming, K. Rottner, A. Schmidt, V. Spindler, and J. Waschke. 2019b. Role of Src and Cortactin in Pemphigus Skin Blistering. *Front Immunol.* 10:626.
- Kusumi, A., and K. Suzuki. 2005. Toward understanding the dynamics of membrane-raft-based molecular interactions. *Biochim Biophys Acta.* 1746:234-251.
- Lambert, M.W., S. Maddukuri, K.M. Karanflian, M.L. Elias, and W.C. Lambert. 2019. The physiology of melanin deposition in health and disease. *Clin Dermatol.* 37:402-417.
- Langenhan, J., J. Dworschak, S. Saschenbrecker, L. Komorowski, W. Schlumberger, W. Stocker, J. Westermann, A. Recke, D. Zillikens, E. Schmidt, and C. Probst. 2014. Specific immunoadsorption of pathogenic autoantibodies in pemphigus requires the entire ectodomains of desmogleins. *Exp Dermatol.* 23:253-259.

- Lee, P., S. Jiang, Y. Li, J. Yue, X. Gou, S.Y. Chen, Y. Zhao, M. Schober, M. Tan, and X. Wu. 2017. Phosphorylation of Pkp1 by RIPK4 regulates epidermal differentiation and skin tumorigenesis. *EMBO J.* 36:1963-1980.
- Lewis, J.D., A.L. Caldara, S.E. Zimmer, S.N. Stahley, A. Seybold, N.L. Strong, A.S. Frangakis, I. Levental, J.K. Wahl, 3rd, A.L. Mattheyses, T. Sasaki, K. Nakabayashi, K. Hata, Y. Matsubara, A. Ishida-Yamamoto, M. Amagai, A. Kubo, and A.P. Kowalczyk. 2019. The desmosome is a mesoscale lipid raft-like membrane domain. *Mol Biol Cell.* 30:1390-1405.
- Lewis, J.E., J.K. Wahl, 3rd, K.M. Sass, P.J. Jensen, K.R. Johnson, and M.J. Wheelock. 1997. Cross-talk between adherens junctions and desmosomes depends on plakoglobin. *J Cell Biol.* 136:919-934.
- Li, M., D. Dang, N. Xi, Y. Wang, and L. Liu. 2017. Nanoscale imaging and force probing of biomolecular systems using atomic force microscopy: from single molecules to living cells. *Nanoscale.* 9:17643-17666.
- Loschke, F., M. Homberg, and T.M. Magin. 2015a. Keratin Isoforms Control Desmosome Stability and Dynamics through PKC α . *J Invest Dermatol.*
- Loschke, F., M. Homberg, and T.M. Magin. 2016. Keratin Isoforms Control Desmosome Stability and Dynamics through PKC α . *J Invest Dermatol.* 136:202-213.
- Loschke, F., K. Seltmann, J.E. Bouameur, and T.M. Magin. 2015b. Regulation of keratin network organization. *Curr Opin Cell Biol.* 32:56-64.
- Lowndes, M., S. Rakshit, O. Shafraz, N. Borghi, R. Harmon, K. Green, S. Sivasankar, and W.J. Nelson. 2014. Different roles of cadherins in the assembly and structural integrity of the desmosome complex. *J Cell Sci.*
- Lüllmann-Rauch, R., and E. Asan. 2019. Zellenlehre. In Taschenlehrbuch Histologie. R. Lüllmann-Rauch and E. Asan, editors. Georg Thieme Verlag.
- Magin, T.M., P. Vijayaraj, and R.E. Leube. 2007. Structural and regulatory functions of keratins. *Exp Cell Res.* 313:2021-2032.
- Mahoney, M.G., Z. Wang, K. Rothenberger, P.J. Koch, M. Amagai, and J.R. Stanley. 1999. Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. *J Clin Invest.* 103:461-468.
- Mammone, T., K. Marenus, D. Maes, and R.A. Lockshin. 1998. The induction of terminal differentiation markers by the cAMP pathway in human HaCaT keratinocytes. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 11:152-160.
- Mao, X., M.J.T. Cho, C.T. Ellebrecht, E.M. Mukherjee, and A.S. Payne. 2017. Stat3 regulates desmoglein 3 transcription in epithelial keratinocytes. *JCI Insight.* 2.
- Mao, X., A.R. Nagler, S.A. Farber, E.J. Choi, L.H. Jackson, K.M. Leiferman, N. Ishii, T. Hashimoto, M. Amagai, J.J. Zone, and A.S. Payne. 2010. Autoimmunity to desmocollin 3 in pemphigus vulgaris. *Am J Pathol.* 177:2724-2730.
- Mavropoulos, A., T. Orfanidou, C. Liaskos, D.S. Smyk, V. Spyrou, L.I. Sakkas, E.I. Rigopoulou, and D.P. Bogdanos. 2013. p38 MAPK Signaling in Pemphigus: Implications for Skin Autoimmunity. *Autoimmune Dis.* 2013:728529.
- Mazzalupo, S., P. Wong, P. Martin, and P.A. Coulombe. 2003. Role for keratins 6 and 17 during wound closure in embryonic mouse skin. *Dev Dyn.* 226:356-365.
- McGrath, J.A., J.R. McMillan, C.S. Shemanko, S.K. Runswick, I.M. Leigh, E.B. Lane, D.R. Garrod, and R.A. Eady. 1997. Mutations in the plakophilin 1 gene result in ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome. *Nat Genet.* 17:240-244.
- McGrath, J.A., and J.E. Mellerio. 2010. Ectodermal dysplasia-skin fragility syndrome. *Dermatol Clin.* 28:125-129.
- Mege, R.M., and N. Ishiyama. 2017. Integration of Cadherin Adhesion and Cytoskeleton at Adherens Junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 9.
- Meier, K., J. Holstein, F. Solimani, J. Waschke, and K. Ghoreschi. 2020. Case Report: Apremilast for Therapy-Resistant Pemphigus Vulgaris. *Front Immunol.* 11:588315.

- Mertens, C., C. Kuhn, R. Moll, I. Schwetlick, and W.W. Franke. 1999. Desmosomal plakophilin 2 as a differentiation marker in normal and malignant tissues. *Differentiation*. 64:277-290.
- Michels, C., T. Buchta, W. Bloch, T. Krieg, and C.M. Niessen. 2009. Classical cadherins regulate desmosome formation. *J Invest Dermatol*. 129:2072-2075.
- Mitev, V., and L. Miteva. 1999. Signal transduction in keratinocytes. *Exp Dermatol*. 8:96-108.
- Mohammed, F., and M. Chidgey. 2021. Desmosomal protein structure and function and the impact of disease-causing mutations. *J Struct Biol*. 213:107749.
- Moreci, R.S., and T. Lechler. 2020. Epidermal structure and differentiation. *Curr Biol*. 30:R144-R149.
- Muller, D.J., K.T. Sapra, S. Scheuring, A. Kedrov, P.L. Frederix, D. Fotiadis, and A. Engel. 2006. Single-molecule studies of membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol*. 16:489-495.
- Muller, E.J., T. Hunziker, and M.M. Suter. 2007. Keratin intermediate filament retraction is linked to plakoglobin-dependent signaling in pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol*. 56:890-891; author reply 891-892.
- Nekrasova, O., and K.J. Green. 2013. Desmosome assembly and dynamics. *Trends Cell Biol*. 23:537-546.
- Nekrasova, O.E., E.V. Amargo, W.O. Smith, J. Chen, G.E. Kreitzer, and K.J. Green. 2011. Desmosomal cadherins utilize distinct kinesins for assembly into desmosomes. *J Cell Biol*. 195:1185-1203.
- Nelson, W.J., and W.I. Weis. 2016. 25 Years of Tension over Actin Binding to the Cadherin Cell Adhesion Complex: The Devil is in the Details. *Trends Cell Biol*. 26:471-473.
- Neuber, S., S. Jager, M. Meyer, V. Wischmann, P.J. Koch, R. Moll, and A. Schmidt. 2015. c-Src mediated tyrosine phosphorylation of plakophilin 3 as a new mechanism to control desmosome composition in cells exposed to oxidative stress. *Cell Tissue Res*. 359:799-816.
- Neuman, K.C., and A. Nagy. 2008. Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nat Methods*. 5:491-505.
- Nie, Z., A. Merritt, M. Rouhi-Parkouhi, L. Tabernero, and D. Garrod. 2011. Membrane-impermeable cross-linking provides evidence for homophilic, isoform-specific binding of desmosomal cadherins in epithelial cells. *J Biol Chem*. 286:2143-2154.
- Niessen, C.M. 2007. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol*. 127:2525-2532.
- Niessen, C.M., and B.M. Gumbiner. 2002. Cadherin-mediated cell sorting not determined by binding or adhesion specificity. *J Cell Biol*. 156:389-399.
- Niessen, C.M., D. Leckband, and A.S. Yap. 2011. Tissue organization by cadherin adhesion molecules: dynamic molecular and cellular mechanisms of morphogenetic regulation. *Physiol Rev*. 91:691-731.
- Nilles, L.A., D.A. Parry, E.E. Powers, B.D. Angst, R.M. Wagner, and K.J. Green. 1991. Structural analysis and expression of human desmoglein: a cadherin-like component of the desmosome. *J Cell Sci*. 99 (Pt 4):809-821.
- North, A.J., W.G. Bardsley, J. Hyam, E.A. Bornslaeger, H.C. Cordingley, B. Trinnaman, M. Hatzfeld, K.J. Green, A.I. Magee, and D.R. Garrod. 1999. Molecular map of the desmosomal plaque. *J Cell Sci*. 112 (Pt 23):4325-4336.
- O'Shaughnessy, E.M., W. Duffy, L. Garcia-Vega, K. Hussey, A.D. Burden, M. Zamiri, and P.E. Martin. 2021. Dysregulation of Connexin Expression Plays a Pivotal Role in Psoriasis. *Int J Mol Sci*. 22.
- Ohata, C., N. Ishii, and M. Furumura. 2014. Locations of acantholysis in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *J Cutan Pathol*. 41:880-889.
- Oktarina, D.A., G. van der Wier, G.F. Diercks, M.F. Jonkman, and H.H. Pas. 2011. IgG-induced clustering of desmogleins 1 and 3 in skin of patients with pemphigus fits with the desmoglein nonassembly depletion hypothesis. *Br J Dermatol*. 165:552-562.
- Olivry, T., K.E. Linder, P. Wang, P. Bizikova, J.A. Bernstein, S.M. Dunston, J.S. Paps, and M.L. Casal. 2012. Deficient plakophilin-1 expression due to a mutation in PKP1 causes ectodermal dysplasia-skin fragility syndrome in Chesapeake Bay retriever dogs. *PLoS One*. 7:e32072.
- Omary, M.B. 2009. "IF-pathies": a broad spectrum of intermediate filament-associated diseases. *J Clin Invest*. 119:1756-1762.

- Osmani, N., and M. Labouesse. 2014. Remodeling of keratin-coupled cell adhesion complexes. *Curr Opin Cell Biol.* 32C:30-38.
- Owen, G.R., and D.L. Stokes. 2010. Exploring the Nature of Desmosomal Cadherin Associations in 3D. *Dermatol Res Pract.* 2010:930401.
- Padmanabhan, A., M.V. Rao, Y. Wu, and R. Zaidel-Bar. 2015. Jack of all trades: functional modularity in the adherens junction. *Curr Opin Cell Biol.* 36:32-40.
- Palka, H.L., and K.J. Green. 1997. Roles of plakoglobin end domains in desmosome assembly. *J Cell Sci.* 110 (Pt 19):2359-2371.
- Pan, M., X. Liu, and J. Zheng. 2011. The pathogenic role of autoantibodies in pemphigus vulgaris. *Clin Exp Dermatol.* 36:703-707.
- Parot, P., Y.F. Dufrene, P. Hinterdorfer, C. Le Grimellec, D. Navajas, J.L. Pellequer, and S. Scheuring. 2007. Past, present and future of atomic force microscopy in life sciences and medicine. *J Mol Recognit.* 20:418-431.
- Pasdar, M., and Z. Li. 1993. Disorganization of microfilaments and intermediate filaments interferes with the assembly and stability of desmosomes in MDCK epithelial cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 26:163-180.
- Pasdar, M., Z. Li, and H. Chan. 1995a. Desmosome assembly and disassembly are regulated by reversible protein phosphorylation in cultured epithelial cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 30:108-121.
- Pasdar, M., Z. Li, and V. Chlumecky. 1995b. Plakoglobin: kinetics of synthesis, phosphorylation, stability, and interactions with desmoglein and E-cadherin. *Cell Motil Cytoskeleton.* 32:258-272.
- Perl, A.L., J.L. Koetsier, and K.J. Green. 2023. PP2A-B55alpha controls keratinocyte adhesion through dephosphorylation of the Desmoplakin C-terminus. *Sci Rep.* 13:12720.
- Pollmann, R., and R. Eming. 2017. Research Techniques Made Simple: Mouse Models of Autoimmune Blistering Diseases. *J Invest Dermatol.* 137:e1-e6.
- Pollmann, R., T. Schmidt, R. Eming, and M. Hertl. 2018. Pemphigus: a Comprehensive Review on Pathogenesis, Clinical Presentation and Novel Therapeutic Approaches. *Clin Rev Allergy Immunol.* 54:1-25.
- Prakasam, A., Y.H. Chien, V. Maruthamuthu, and D.E. Leckband. 2006. Calcium site mutations in cadherin: impact on adhesion and evidence of cooperativity. *Biochemistry.* 45:6930-6939.
- Price, A.J., A.L. Cost, H. Ungewiss, J. Waschke, A.R. Dunn, and C. Grashoff. 2018. Mechanical loading of desmosomes depends on the magnitude and orientation of external stress. *Nat Commun.* 9:5284.
- Priest, A.V., R. Koirala, and S. Sivasankar. 2019. Single-molecule studies of classical and desmosomal cadherin adhesion. *Curr Opin Biomed Eng.* 12:43-50.
- Puchner, E.M., and H.E. Gaub. 2009. Force and function: probing proteins with AFM-based force spectroscopy. *Curr Opin Struct Biol.* 19:605-614.
- Quinlan, R.A., N. Schwarz, R. Windoffer, C. Richardson, T. Hawkins, J.A. Broussard, K.J. Green, and R.E. Leube. 2017. A rim-and-spoke hypothesis to explain the biomechanical roles for cytoplasmic intermediate filament networks. *J Cell Sci.* 130:3437-3445.
- Rafei, D., R. Muller, N. Ishii, M. Llamazares, T. Hashimoto, M. Hertl, and R. Eming. 2011. IgG autoantibodies against desmocollin 3 in pemphigus sera induce loss of keratinocyte adhesion. *Am J Pathol.* 178:718-723.
- Rakshit, S., and S. Sivasankar. 2014. Biomechanics of cell adhesion: how force regulates the lifetime of adhesive bonds at the single molecule level. *Phys Chem Chem Phys.* 16:2211-2223.
- Rakshit, S., Y. Zhang, K. Manibog, O. Shafraz, and S. Sivasankar. 2012. Ideal, catch, and slip bonds in cadherin adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:18815-18820.
- Ramms, L., G. Fabris, R. Windoffer, N. Schwarz, R. Springer, C. Zhou, J. Lazar, S. Stiefel, N. Hersch, U. Schnakenberg, T.M. Magin, R.E. Leube, R. Merkel, and B. Hoffmann. 2013. Keratins as the main component for the mechanical integrity of keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:18513-18518.

- Resnik, N., K. Sepcic, A. Plemenitas, R. Windoffer, R. Leube, and P. Veranic. 2011. Desmosome assembly and cell-cell adhesion are membrane raft-dependent processes. *J Biol Chem.* 286:1499-1507.
- Rice, G., and P. Rompolas. 2020. Advances in resolving the heterogeneity and dynamics of keratinocyte differentiation. *Curr Opin Cell Biol.* 67:92-98.
- Richard, G. 2000. Connexins: a connection with the skin. *Exp Dermatol.* 9:77-96.
- Rickelt, S., S. Winter-Simanowski, E. Noffz, C. Kuhn, and W.W. Franke. 2009. Upregulation of plakophilin-2 and its acquisition to adherens junctions identifies a novel molecular ensemble of cell-cell-attachment characteristic for transformed mesenchymal cells. *Int J Cancer.* 125:2036-2048.
- Rietscher, K., R. Keil, A. Jordan, and M. Hatzfeld. 2018. 14-3-3 proteins regulate desmosomal adhesion via plakophilins. *J Cell Sci.* 131.
- Rietscher, K., A. Wolf, G. Hause, A. Rother, R. Keil, T.M. Magin, M. Glass, C.M. Niessen, and M. Hatzfeld. 2016. Growth retardation, loss of desmosomal adhesion and impaired tight junction function identify a unique role of plakophilin 1 in vivo. *J Invest Dermatol.*
- Roberts, B.J., K.E. Johnson, K.P. McGuinn, J. Saowapa, R.A. Svoboda, M.G. Mahoney, K.R. Johnson, and J.K. Wahl, 3rd. 2014. Palmitoylation of plakophilin is required for desmosome assembly. *J Cell Sci.* 127:3782-3793.
- Roberts, B.J., R.A. Svoboda, A.M. Overmiller, J.D. Lewis, A.P. Kowalczyk, M.G. Mahoney, K.R. Johnson, and J.K. Wahl, 3rd. 2016. Palmitoylation of Desmoglein 2 Is a Regulator of Assembly Dynamics and Protein Turnover. *J Biol Chem.* 291:24857-24865.
- Rompolas, P., K.R. Mesa, K. Kawaguchi, S. Park, D. Gonzalez, S. Brown, J. Boucher, A.M. Klein, and V. Greco. 2016. Spatiotemporal coordination of stem cell commitment during epidermal homeostasis. *Science.* 352:1471-1474.
- Rotzer, V., A. Breit, J. Waschke, and V. Spindler. 2014. Adducin is required for desmosomal cohesion in keratinocytes. *J Biol Chem.* 289:14925-14940.
- Rotzer, V., E. Hartlieb, F. Vielmuth, M. Gliem, V. Spindler, and J. Waschke. 2015a. E-cadherin and Src associate with extradesmosomal Dsg3 and modulate desmosome assembly and adhesion. *Cell Mol Life Sci.* 72:4885-4897.
- Rotzer, V., E. Hartlieb, J. Winkler, E. Walter, A. Schlipp, M. Sardy, V. Spindler, and J. Waschke. 2015b. Desmoglein 3-Dependent Signaling Regulates Keratinocyte Migration and Wound Healing. *J Invest Dermatol.*
- Rubsam, M., J.A. Broussard, S.A. Wickstrom, O. Nekrasova, K.J. Green, and C.M. Niessen. 2018. Adherens Junctions and Desmosomes Coordinate Mechanics and Signaling to Orchestrate Tissue Morphogenesis and Function: An Evolutionary Perspective. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 10.
- Rubsam, M., A.F. Mertz, A. Kubo, S. Marg, C. Jungst, G. Goranci-Buzhala, A.C. Schauss, V. Horsley, E.R. Dufresne, M. Moser, W. Ziegler, M. Amagai, S.A. Wickstrom, and C.M. Niessen. 2017. E-cadherin integrates mechanotransduction and EGFR signaling to control junctional tissue polarization and tight junction positioning. *Nat Commun.* 8:1250.
- Sadhanasatish, T., K. Augustin, L. Windgasse, A. Chrostek-Grashoff, M. Rief, and C. Grashoff. 2023. A molecular optomechanics approach reveals functional relevance of force transduction across talin and desmoplakin. *Sci Adv.* 9:eadg3347.
- Saito, M., S.N. Stahley, C.Y. Caughman, X. Mao, D.K. Tucker, A.S. Payne, M. Amagai, and A.P. Kowalczyk. 2012. Signaling dependent and independent mechanisms in pemphigus vulgaris blister formation. *PLoS One.* 7:e50696.
- Sajda, T., and A.A. Sinha. 2018. Autoantibody Signaling in Pemphigus Vulgaris: Development of an Integrated Model. *Front Immunol.* 9:692.
- Samuelov, L., O. Sarig, R.M. Harmon, D. Rapaport, A. Ishida-Yamamoto, O. Isakov, J.L. Koetsier, A. Gat, I. Goldberg, R. Bergman, R. Spiegel, O. Eytan, S. Geller, S. Peleg, N. Shomron, C.S.M. Goh, N.J. Wilson, F.J.D. Smith, E. Pohler, M.A. Simpson, W.H.I. McLean, A.D. Irvine, M. Horowitz,

- J.A. McGrath, K.J. Green, and E. Sprecher. 2013. Desmoglein 1 deficiency results in severe dermatitis, multiple allergies and metabolic wasting. *Nat Genet.* 45:1244-1248.
- Samuelov, L., E. Sprecher, and R. Paus. 2015. The role of P-cadherin in skin biology and skin pathology: lessons from the hair follicle. *Cell Tissue Res.* 360:761-771.
- Sariisik, E., C. Popov, J.P. Muller, D. Docheva, H. Clausen-Schaumann, and M. Benoit. 2015. Decoding Cytoskeleton-Anchored and Non-Anchored Receptors from Single-Cell Adhesion Force Data. *Biophys J.* 109:1330-1333.
- Sato, M., Y. Aoyama, and Y. Kitajima. 2000. Assembly pathway of desmoglein 3 to desmosomes and its perturbation by pemphigus vulgaris-IgG in cultured keratinocytes, as revealed by time-lapsed labeling immunoelectron microscopy. *Lab Invest.* 80:1583-1592.
- Schafer, S., P.J. Koch, and W.W. Franke. 1994. Identification of the ubiquitous human desmoglein, Dsg2, and the expression catalogue of the desmoglein subfamily of desmosomal cadherins. *Exp Cell Res.* 211:391-399.
- Schinner, C., F. Vielmuth, V. Rotzer, M. Hiermaier, M.Y. Radeva, T.K. Co, E. Hartlieb, A. Schmidt, A. Imhof, A. Messoudi, A. Horn, A. Schlipp, V. Spindler, and J. Waschke. 2017. Adrenergic Signaling Strengthens Cardiac Myocyte Cohesion. *Circ Res.* 120:1305-1317.
- Schinner, C., L. Xu, H. Franz, A. Zimmermann, M.T. Wanuske, M. Rathod, P. Hanns, F. Geier, P. Pelczar, Y. Liang, V. Lorenz, C. Studle, P.I. Maly, S. Kaufenstein, B.M. Beckmann, F. Sheikh, G.M. Kuster, and V. Spindler. 2022. Defective Desmosomal Adhesion Causes Arrhythmogenic Cardiomyopathy by Involving an Integrin-alphaVbeta6/TGF-beta Signaling Cascade. *Circulation.* 146:1610-1626.
- Schlipp, A., C. Schinner, V. Spindler, F. Vielmuth, K. Gehmlich, P. Syrris, W.J. McKenna, A. Dendorfer, E. Hartlieb, and J. Waschke. 2014. Desmoglein-2 interaction is crucial for cardiomyocyte cohesion and function. *Cardiovasc Res.* 104:245-257.
- Schlogl, E., M.Y. Radeva, F. Vielmuth, C. Schinner, J. Waschke, and V. Spindler. 2018. Keratin Retraction and Desmoglein3 Internalization Independently Contribute to Autoantibody-Induced Cell Dissociation in Pemphigus Vulgaris. *Front Immunol.* 9:858.
- Schmidt, A., and S. Jager. 2005. Plakophilins--hard work in the desmosome, recreation in the nucleus? *Eur J Cell Biol.* 84:189-204.
- Schmidt, A., L. Langbein, S. Pratzel, M. Rode, H.R. Rackwitz, and W.W. Franke. 1999. Plakophilin 3--a novel cell-type-specific desmosomal plaque protein. *Differentiation.* 64:291-306.
- Schmidt, E., M. Kasperkiewicz, and P. Joly. 2019. Pemphigus. *Lancet.* 394:882-894.
- Schmidt, E., V. Spindler, R. Eming, M. Amagai, F. Antonicelli, J.F. Baines, M. Belheouane, P. Bernard, L. Borradori, M. Caproni, G. Di Zenzo, S. Grando, K. Harman, M.F. Jonkman, H. Koga, R.J. Ludwig, A.P. Kowalczyk, E.J. Muller, W. Nishie, H. Pas, A.S. Payne, C.D. Sadik, A. Seppanen, J. Setterfield, H. Shimizu, A.A. Sinha, E. Sprecher, M. Sticherling, H. Ujjiie, D. Zillikens, M. Hertl, and J. Waschke. 2017. Meeting Report of the Pathogenesis of Pemphigus and Pemphigoid Meeting in Munich, September 2016. *J Invest Dermatol.* 137:1199-1203.
- Schmidt, E., M. Sticherling, M. Sardy, R. Eming, M. Goebeler, M. Hertl, S.C. Hofmann, N. Hunzelmann, J.S. Kern, H. Kramer, A. Nast, H.D. Orzechowski, C. Pfeiffer, V. Schuster, C. Sitaru, M. Zidane, D. Zillikens, and M. Worm. 2020. S2k guidelines for the treatment of pemphigus vulgaris/foiaceus and bullous pemphigoid: 2019 update. *J Dtsch Dermatol Ges.* 18:516-526.
- Schmitt, T., D.T. Egu, E. Walter, A.M. Sigmund, R. Eichkorn, A. Yazdi, E. Schmidt, M. Sardy, R. Eming, M. Goebeler, and J. Waschke. 2021. Ca(2+) signalling is critical for autoantibody-induced blistering of human epidermis in pemphigus. *Br J Dermatol.* 185:595-604.
- Schmitt, T., C. Hudemann, S. Mozarzadeh, M. Hertl, R. Tikkanen, and J. Waschke. 2023. Dsg3 epitope-specific signalling in pemphigus. *Front Immunol.* 14:1163066.
- Schmitt, T., and J. Waschke. 2021. Autoantibody-Specific Signalling in Pemphigus. *Front Med (Lausanne).* 8:701809.
- Seiffert-Sinha, K., S. Khan, K. Attwood, J.A. Gerlach, and A.A. Sinha. 2018. Anti-Thyroid Peroxidase Reactivity Is Heightened in Pemphigus Vulgaris and Is Driven by Human Leukocyte Antigen Status and the Absence of Desmoglein Reactivity. *Front Immunol.* 9:625.

- Sekiguchi, M., Y. Futei, Y. Fujii, T. Iwasaki, T. Nishikawa, and M. Amagai. 2001. Dominant autoimmune epitopes recognized by pemphigus antibodies map to the N-terminal adhesive region of desmogleins. *J Immunol.* 167:5439-5448.
- Seltmann, K., A.W. Fritsch, J.A. Kas, and T.M. Magin. 2013. Keratins significantly contribute to cell stiffness and impact invasive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:18507-18512.
- Sezgin, E., I. Levental, S. Mayor, and C. Eggeling. 2017. The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 18:361-374.
- Shafraz, O., M. Rubsam, S.N. Stahley, A.L. Caldara, A.P. Kowalczyk, C.M. Niessen, and S. Sivasankar. 2018. E-cadherin binds to desmoglein to facilitate desmosome assembly. *Elife.* 7.
- Shafraz, O., B. Xie, S. Yamada, and S. Sivasankar. 2020. Mapping transmembrane binding partners for E-cadherin ectodomains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 117:31157-31165.
- Shashikanth, N., Y.I. Petrova, S. Park, J. Chekan, S. Maiden, M. Spano, T. Ha, B.M. Gumbiner, and D.E. Leckband. 2015. Allosteric Regulation of E-Cadherin Adhesion. *J Biol Chem.* 290:21749-21761.
- Shimizu, A., A. Ishiko, T. Ota, H. Saito, H. Oka, K. Tsunoda, M. Amagai, and T. Nishikawa. 2005. In vivo ultrastructural localization of the desmoglein 3 adhesive interface to the desmosome mid-line. *J Invest Dermatol.* 124:984-989.
- Shin, K., V.C. Fogg, and B. Margolis. 2006. Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 22:207-235.
- Sigmund, A.M., L.S. Steinert, D.T. Egu, F.C. Bayerbach, J. Waschke, and F. Vielmuth. 2020. Dsg2 Upregulation as a Rescue Mechanism in Pemphigus. *Front Immunol.* 11:581370.
- Sigmund, A.M., M. Winkler, S. Engelmayer, D. Kugelmann, D.T. Egu, L.S. Steinert, M. Fuchs, M. Hiermaier, M.Y. Radeva, F.C. Bayerbach, E. Butz, S. Kotschi, C. Hudemann, M. Hertl, S. Yeruva, E. Schmidt, A.S. Yazdi, K. Ghoreschi, F. Vielmuth, and J. Waschke. 2023. Apremilast prevents blistering in human epidermis and stabilizes keratinocyte adhesion in pemphigus. *Nat Commun.* 14:116.
- Sikora, M., U.H. Ermel, A. Seybold, M. Kunz, G. Calloni, J. Reitz, R.M. Vabulas, G. Hummer, and A.S. Frangakis. 2020. Desmosome architecture derived from molecular dynamics simulations and cryo-electron tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 117:27132-27140.
- Simard, M., S. Morin, G. Rioux, R. Seguin, E. Loing, and R. Pouliot. 2020. A Tissue-Engineered Human Psoriatic Skin Model to Investigate the Implication of cAMP in Psoriasis: Differential Impacts of Cholera Toxin and Isoproterenol on cAMP Levels of the Epidermis. *Int J Mol Sci.* 21.
- Sklyarova, T., S. Bonne, P. D'Hooge, G. Denecker, S. Goossens, R. De Rycke, G. Borgonie, M. Bosl, F. van Roy, and J. van Hengel. 2008. Plakophilin-3-deficient mice develop hair coat abnormalities and are prone to cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol.* 128:1375-1385.
- Snider, N.T., and M.B. Omary. 2014. Post-translational modifications of intermediate filament proteins: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15:163-177.
- Sokol, E., D. Kramer, G.F.H. Diercks, J. Kuipers, M.F. Jonkman, H.H. Pas, and B.N.G. Giepmans. 2015. Large-Scale Electron Microscopy Maps of Patient Skin and Mucosa Provide Insight into Pathogenesis of Blistering Diseases. *J Invest Dermatol.* 135:1763-1770.
- Sotomayor, M., and K. Schulten. 2008. The allosteric role of the Ca²⁺ switch in adhesion and elasticity of C-cadherin. *Biophys J.* 94:4621-4633.
- Spindler, V., C. Dehner, S. Hubner, and J. Waschke. 2014. Plakoglobin but not desmoplakin regulates keratinocyte cohesion via modulation of p38MAPK signaling. *J Invest Dermatol.* 134:1655-1664.
- Spindler, V., D. Drenckhahn, D. Zillikens, and J. Waschke. 2007. Pemphigus IgG causes skin splitting in the presence of both desmoglein 1 and desmoglein 3. *Am J Pathol.* 171:906-916.
- Spindler, V., R. Eming, E. Schmidt, M. Amagai, S. Grando, M.F. Jonkman, A.P. Kowalczyk, E.J. Muller, A.S. Payne, C. Pincelli, A.A. Sinha, E. Sprecher, D. Zillikens, M. Hertl, and J. Waschke. 2018. Mechanisms Causing Loss of Keratinocyte Cohesion in Pemphigus. *J Invest Dermatol.* 138:32-37.

- Spindler, V., A. Endlich, E. Hartlieb, F. Vielmuth, E. Schmidt, and J. Waschke. 2011. The extent of desmoglein 3 depletion in pemphigus vulgaris is dependent on Ca(2+)-induced differentiation: a role in suprabasal epidermal skin splitting? *Am J Pathol.* 179:1905-1916.
- Spindler, V., B. Gerull, K.J. Green, A.P. Kowalczyk, R. Leube, A.J. Marian, H. Milting, E.J. Muller, C. Niessen, A.S. Payne, N. Schlegel, E. Schmidt, P. Strnad, R. Tikkanen, F. Vielmuth, and J. Waschke. 2023. Meeting report - Desmosome dysfunction and disease: Alpine desmosome disease meeting. *J Cell Sci.* 136.
- Spindler, V., W.M. Heupel, A. Efthymiadis, E. Schmidt, R. Eming, C. Rankl, P. Hinterdorfer, T. Muller, D. Drenckhahn, and J. Waschke. 2009. Desmocollin 3-mediated binding is crucial for keratinocyte cohesion and is impaired in pemphigus. *J Biol Chem.* 284:30556-30564.
- Spindler, V., V. Rotzer, C. Dehner, B. Kempf, M. Gliem, M. Radeva, E. Hartlieb, G.S. Harms, E. Schmidt, and J. Waschke. 2013. Peptide-mediated desmoglein 3 crosslinking prevents pemphigus vulgaris autoantibody-induced skin blistering. *J Clin Invest.* 123:800-811.
- Spindler, V., F. Vielmuth, E. Schmidt, D.S. Rubenstein, and J. Waschke. 2010. Protective endogenous cyclic adenosine 5'-monophosphate signaling triggered by pemphigus autoantibodies. *J Immunol.* 185:6831-6838.
- Spindler, V., and J. Waschke. 2014. Desmosomal cadherins and signaling: lessons from autoimmune disease. *Cell Commun Adhes.* 21:77-84.
- Spindler, V., and J. Waschke. 2018. Pemphigus-A Disease of Desmosome Dysfunction Caused by Multiple Mechanisms. *Front Immunol.* 9:136.
- Stahley, S.N., E.I. Bartle, C.E. Atkinson, A.P. Kowalczyk, and A.L. Mattheyses. 2016a. Molecular organization of the desmosome as revealed by direct stochastic optical reconstruction microscopy. *J Cell Sci.* 129:2897-2904.
- Stahley, S.N., and A.P. Kowalczyk. 2015. Desmosomes in acquired disease. *Cell Tissue Res.* 360:439-456.
- Stahley, S.N., M. Saito, V. Faundez, M. Koval, A.L. Mattheyses, and A.P. Kowalczyk. 2014. Desmosome assembly and disassembly are membrane raft-dependent. *PLoS One.* 9:e87809.
- Stahley, S.N., M.F. Warren, R.J. Feldman, R.A. Swerlick, A.L. Mattheyses, and A.P. Kowalczyk. 2016b. Super-Resolution Microscopy Reveals Altered Desmosomal Protein Organization in Tissue from Patients with Pemphigus Vulgaris. *J Invest Dermatol.* 136:59-66.
- Steinkraus, V., J.C. Mak, U. Pichlmeier, H. Mensing, J. Ring, and P.J. Barnes. 1996. Autoradiographic mapping of beta-adrenoceptors in human skin. *Arch Dermatol Res.* 288:549-553.
- Strnad, P., R. Windoffer, and R.E. Leube. 2003. Light-induced resistance of the keratin network to the filament-disrupting tyrosine phosphatase inhibitor orthovanadate. *J Invest Dermatol.* 120:198-203.
- Suzuki, H., T. Nishizawa, K. Tani, Y. Yamazaki, A. Tamura, R. Ishitani, N. Dohmae, S. Tsukita, O. Nureki, and Y. Fujiyoshi. 2014. Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions. *Science.* 344:304-307.
- Syed, S.E., B. Trinnaman, S. Martin, S. Major, J. Hutchinson, and A.I. Magee. 2002. Molecular interactions between desmosomal cadherins. *Biochem J.* 362:317-327.
- Takahashi, H., M. Kinouchi, T. Tamura, A. Ishida-Yamamoto, and H. Iizuka. 1998. Adenylate cyclases in keratinocytes: FRSK cells express types I, II, III, IV, VI and VIII, and 1,25(OH)2D3, retinoic acid and TPA augment forskolin-induced cyclic AMP accumulation in the absence of altered isozyme expression. *Arch Dermatol Res.* 290:407-412.
- Takahashi, Y., H.P. Patel, R.S. Labib, L.A. Diaz, and G.J. Anhalt. 1985. Experimentally induced pemphigus vulgaris in neonatal BALB/c mice: a time-course study of clinical, immunologic, ultrastructural, and cytochemical changes. *J Invest Dermatol.* 84:41-46.
- Tariq, H., J. Bella, T.A. Jowitt, D.F. Holmes, M. Rouhi, Z. Nie, C. Baldock, D. Garrod, and L. Taberner. 2015. Cadherin flexibility provides a key difference between desmosomes and adherens junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112:5395-5400.

- Teh, M.T., E.K. Parkinson, J.K. Thurlow, F. Liu, F. Fortune, and H. Wan. 2011. A molecular study of desmosomes identifies a desmoglein isoform switch in head and neck squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 40:67-76.
- Tenor, H., A. Hatzelmann, A. Wendel, and C. Schudt. 1995. Identification of phosphodiesterase IV activity and its cyclic adenosine monophosphate-dependent up-regulation in a human keratinocyte cell line (HaCaT). *J Invest Dermatol.* 105:70-74.
- Thomason, H.A., N.H. Cooper, D.M. Ansell, M. Chiu, A.J. Merrit, M.J. Hardman, and D.R. Garrod. 2012. Direct evidence that PKC α positively regulates wound re-epithelialization: correlation with changes in desmosomal adhesiveness. *J Pathol.* 227:346-356.
- Thomason, H.A., A. Scothern, S. McHarg, and D.R. Garrod. 2010. Desmosomes: adhesive strength and signalling in health and disease. *Biochem J.* 429:419-433.
- Todorovic, V., J.L. Koetsier, L.M. Godsel, and K.J. Green. 2014. Plakophilin 3 mediates Rap1-dependent desmosome assembly and adherens junction maturation. *Mol Biol Cell.* 25:3749-3764.
- Toivola, D.M., P. Boor, C. Alam, and P. Strnad. 2015. Keratins in health and disease. *Curr Opin Cell Biol.* 32C:73-81.
- Torres, T., and L. Puig. 2018. Apremilast: A Novel Oral Treatment for Psoriasis and Psoriatic Arthritis. *Am J Clin Dermatol.* 19:23-32.
- Troyanovsky, S.M., R.B. Troyanovsky, L.G. Eshkind, V.A. Krutovskikh, R.E. Leube, and W.W. Franke. 1994a. Identification of the plakoglobin-binding domain in desmoglein and its role in plaque assembly and intermediate filament anchorage. *J Cell Biol.* 127:151-160.
- Troyanovsky, S.M., R.B. Troyanovsky, L.G. Eshkind, R.E. Leube, and W.W. Franke. 1994b. Identification of amino acid sequence motifs in desmocollin, a desmosomal glycoprotein, that are required for plakoglobin binding and plaque formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:10790-10794.
- Tsang, S.M., L. Brown, H. Gadmor, L. Gammon, F. Fortune, A. Wheeler, and H. Wan. 2012a. Desmoglein 3 acting as an upstream regulator of Rho GTPases, Rac-1/Cdc42 in the regulation of actin organisation and dynamics. *Exp Cell Res.* 318:2269-2283.
- Tsang, S.M., L. Brown, K. Lin, L. Liu, K. Piper, E.A. O'Toole, R. Grose, I.R. Hart, D.R. Garrod, F. Fortune, and H. Wan. 2012b. 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. *J Pathol.* 227:81-93.
- Tsunoda, K., T. Ota, M. Aoki, T. Yamada, T. Nagai, T. Nakagawa, S. Koyasu, T. Nishikawa, and M. Amagai. 2003. Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. *J Immunol.* 170:2170-2178.
- Tucker, D.K., S.N. Stahley, and A.P. Kowalczyk. 2014. Plakophilin-1 protects keratinocytes from pemphigus vulgaris IgG by forming calcium-independent desmosomes. *J Invest Dermatol.* 134:1033-1043.
- Ungewiss, H., V. Rotzer, M. Meir, C. Fey, M. Diefenbacher, N. Schlegel, and J. Waschke. 2018. Dsg2 via Src-mediated transactivation shapes EGFR signaling towards cell adhesion. *Cell Mol Life Sci.* 75:4251-4268.
- van der Wier, G., M.F. Jonkman, H.H. Pas, and G.F. Diercks. 2012. Ultrastructure of acantholysis in pemphigus foliaceus re-examined from the current perspective. *Br J Dermatol.* 167:1265-1271.
- van der Wier, G., H.H. Pas, and M.F. Jonkman. 2010. Experimental human cell and tissue models of pemphigus. *Dermatol Res Pract.* 2010:143871.
- van der Wier, G., H.H. Pas, D. Kramer, G.F.H. Diercks, and M.F. Jonkman. 2014. Smaller desmosomes are seen in the skin of pemphigus patients with anti-desmoglein 1 antibodies but not in patients with anti-desmoglein 3 antibodies. *J Invest Dermatol.* 134:2287-2290.
- Van Itallie, C.M., and J.M. Anderson. 2014. Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Semin Cell Dev Biol.* 36:157-165.

- Vasioukhin, V., E. Bowers, C. Bauer, L. Degenstein, and E. Fuchs. 2001. Desmoplakin is essential in epidermal sheet formation. *Nat Cell Biol.* 3:1076-1085.
- Vestweber, D., and R. Kemler. 1984. Some structural and functional aspects of the cell adhesion molecule uvomorulin. *Cell Differ.* 15:269-273.
- Vielmuth, F., E. Hartlieb, D. Kugelmann, J. Waschke, and V. Spindler. 2015a. Atomic force microscopy identifies regions of distinct desmoglein 3 adhesive properties on living keratinocytes. *Nanomedicine.* 11:511-520.
- Vielmuth, F., M.Y. Radeva, S. Yeruva, A.M. Sigmund, and J. Waschke. 2023. cAMP: A master regulator of cadherin-mediated binding in endothelium, epithelium and myocardium. *Acta Physiol (Oxf):*e14006.
- Vielmuth, F., V. Rotzer, E. Hartlieb, C. Hirneiss, J. Waschke, and V. Spindler. 2016. Pemphigus Autoantibodies Induce Blistering in Human Conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 57:4442-4449.
- Vielmuth, F., V. Spindler, and J. Waschke. 2018a. Atomic Force Microscopy Provides New Mechanistic Insights into the Pathogenesis of Pemphigus. *Front Immunol.* 9:485.
- Vielmuth, F., E. Walter, M. Fuchs, M.Y. Radeva, F. Buechau, T.M. Magin, V. Spindler, and J. Waschke. 2018b. Keratins Regulate p38MAPK-Dependent Desmoglein Binding Properties in Pemphigus. *Front Immunol.* 9:528.
- Vielmuth, F., M.T. Wanuske, M.Y. Radeva, M. Hiermaier, D. Kugelmann, E. Walter, F. Buechau, T.M. Magin, J. Waschke, and V. Spindler. 2018c. Keratins Regulate the Adhesive Properties of Desmosomal Cadherins through Signaling. *J Invest Dermatol.* 138:121-131.
- Vielmuth, F., J. Waschke, and V. Spindler. 2015b. Loss of Desmoglein Binding Is Not Sufficient for Keratinocyte Dissociation in Pemphigus. *J Invest Dermatol.* 135:3068-3077.
- Vodo, D., O. Sarig, and E. Sprecher. 2018. The Genetics of Pemphigus Vulgaris. *Front Med (Lausanne).* 5:226.
- Vollner, F., J. Ali, N. Kurrle, Y. Exner, R. Eming, M. Hertl, A. Banning, and R. Tikkanen. 2016. Loss of flotillin expression results in weakened desmosomal adhesion and Pemphigus vulgaris-like localisation of desmoglein-3 in human keratinocytes. *Sci Rep.* 6:28820.
- Wagner, P. 1998. Immobilization strategies for biological scanning probe microscopy. *FEBS Lett.* 430:112-115.
- Wallis, S., S. Lloyd, I. Wise, G. Ireland, T.P. Fleming, and D. Garrod. 2000. The alpha isoform of protein kinase C is involved in signaling the response of desmosomes to wounding in cultured epithelial cells. *Mol Biol Cell.* 11:1077-1092.
- Walter, E., F. Vielmuth, L. Rotkopf, M. Sardy, O.N. Horvath, M. Goebeler, E. Schmidt, R. Eming, M. Hertl, V. Spindler, and J. Waschke. 2017. Different signaling patterns contribute to loss of keratinocyte cohesion dependent on autoantibody profile in pemphigus. *Sci Rep.* 7:3579.
- Walter, E., F. Vielmuth, M.T. Wanuske, M. Seifert, R. Pollmann, R. Eming, and J. Waschke. 2019. Role of Dsg1- and Dsg3-Mediated Signaling in Pemphigus Autoantibody-Induced Loss of Keratinocyte Cohesion. *Front Immunol.* 10:1128.
- Wang, F., A. Ziemann, and P.A. Coulombe. 2016. Skin Keratins. *Methods Enzymol.* 568:303-350.
- Wanuske, M.T., D. Brantschen, C. Schinner, C. Studle, E. Walter, M. Hiermaier, F. Vielmuth, J. Waschke, and V. Spindler. 2021. Clustering of desmosomal cadherins by desmoplakin is essential for cell-cell adhesion. *Acta Physiol (Oxf).* 231:e13609.
- Waschke, J. 2008. The desmosome and pemphigus. *Histochem Cell Biol.* 130:21-54.
- Waschke, J. 2018. Desmogleins as signaling hubs regulating cell cohesion and tissue/organ function in skin and heart - EFEM lecture 2018. *Ann Anat.*
- Waschke, J., P. Bruggeman, W. Baumgartner, D. Zillikens, and D. Drenckhahn. 2005. Pemphigus foliaceus IgG causes dissociation of desmoglein 1-containing junctions without blocking desmoglein 1 transinteraction. *J Clin Invest.* 115:3157-3165.
- Waschke, J., C. Menendez-Castro, P. Bruggeman, R. Koob, M. Amagai, H.J. Gruber, D. Drenckhahn, and W. Baumgartner. 2007. Imaging and force spectroscopy on desmoglein 1 using atomic

- force microscopy reveal multivalent Ca(2+)-dependent, low-affinity trans-interaction. *J Membr Biol.* 216:83-92.
- Waschke, J., and V. Spindler. 2014. Desmosomes and Extradесmosomal Adhesive Signaling Contacts in Pemphigus. *Med Res Rev*:10.1002/med.21310
- Welsch, U.K., W.; Deller, T. 2022. Histologie - Lehrbuch und Atlas, Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie. *Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.* 6.
- Wieland, J.A., A.A. Gewirth, and D.E. Leckband. 2005. Single molecule adhesion measurements reveal two homophilic neural cell adhesion molecule bonds with mechanically distinct properties. *J Biol Chem.* 280:41037-41046.
- Wilgram, G.F., J.B. Caulfield, and W.F. Lever. 1961. An electron microscopic study of acantholysis in pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol.* 36:373-382.
- Woll, S., R. Windoffer, and R.E. Leube. 2007. p38 MAPK-dependent shaping of the keratin cytoskeleton in cultured cells. *J Cell Biol.* 177:795-807.
- Wu, S.K., G.A. Gomez, M. Michael, S. Verma, H.L. Cox, J.G. Lefevre, R.G. Parton, N.A. Hamilton, Z. Neufeld, and A.S. Yap. 2014. Cortical F-actin stabilization generates apical-lateral patterns of junctional contractility that integrate cells into epithelia. *Nat Cell Biol.* 16:167-178.
- Xiao, Y., J.S. Williams, and I. Brownell. 2014. Merkel cells and touch domes: more than mechanosensory functions? *Exp Dermatol.* 23:692-695.
- Yang, R., J.A. Broussard, K.J. Green, and H.D. Espinosa. 2018. Techniques to stimulate and interrogate cell-cell adhesion mechanics. *Extreme Mech Lett.* 20:125-139.
- Yap, A.S., W.M. Brieher, M. Pruschy, and B.M. Gumbiner. 1997. Lateral clustering of the adhesive ectodomain: a fundamental determinant of cadherin function. *Curr Biol.* 7:308-315.
- Yap, A.S., K. Duszyc, and V. Viasnoff. 2018. Mechanosensing and Mechanotransduction at Cell-Cell Junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 10.
- Yin, H., M. Hu, and D. Li. 2023. Regulation of epidermal stratification and development by basal keratinocytes. *J Cell Physiol.*
- Yokouchi, M., and A. Kubo. 2018. Maintenance of tight junction barrier integrity in cell turnover and skin diseases. *Exp Dermatol.* 27:876-883.
- Yoshida, K., M. Yokouchi, K. Nagao, K. Ishii, M. Amagai, and A. Kubo. 2013. Functional tight junction barrier localizes in the second layer of the stratum granulosum of human epidermis. *J Dermatol Sci.* 71:89-99.
- Zhang, X., M. Yin, and L.J. Zhang. 2019. Keratin 6, 16 and 17-Critical Barrier Alarmin Molecules in Skin Wounds and Psoriasis. *Cells.* 8.
- Zimmer, S.E., and A.P. Kowalczyk. 2020. The desmosome as a model for lipid raft driven membrane domain organization. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 1862:183329.
- Zlatanova, J., S.M. Lindsay, and S.H. Leuba. 2000. Single molecule force spectroscopy in biology using the atomic force microscope. *Prog Biophys Mol Biol.* 74:37-61.

7. Abkürzungsverzeichnis

AFM	Engl. : Atomic force microscopy, Rasterkraftmikroskopie
AK23	Antikörper 23, monoklonaler muriner Antikörper der die N-terminale Region von Dsg3 bindet und aus einem Pemphigus Mausmodell stammt (Tsunoda et al., 2003)
DC	Desmosomale Cadherine
Dp	Desmoplakin
Dsc	Desmocollin
Dsg	Desmoglein
E-Cad	E-Cadherin
ECD	Engl.: Extracellular domain, Extrazelluläre Domäne
EGFR	Epidermal growth factor receptor
Erk	Extracellular Signal-regulated Kinases
FRAP	Engl.: Fluorescence recovery after photobleaching
HaCaT	human low calcium elevated temperature cells
IFAP	Intermediärfilament-assoziierte Proteine
IP	Immunopräzipitation
KO	Knock out
L-Tryp	L-Tryptophan
MK2	MAP-Kinase aktivierte Proteinkinase 2
N-Cad	N-Cadherin
P-Cad	P-Cadherin
p38MAPK	Engl.: p38 mitogen activated kinase
PF-IgG	IgG Fraktion von Pemphigus foliaceus Patient
Pg	Plakoglobin
PI4K	Phosphatidylinositol 4-Kinase
PKC	Proteinkinase C
Pkp	Plakophilin
PLC	Phospholipase C
PV-IgG	IgG Fraktion von Pemphigus vulgaris Patient
RhoA	Ras homolog family member A
SEM	Engl.: Scanning electron microscopy, Rasterelektronenmikroskopie
SIM	Engl.: structured illumination microscopy
SP	Single peptide
STED Mikroskopie	Engl.: Stimulated Emission Depletion Mikroskopie
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TP	Tandem peptide
UF	Unbinding Force
UP	Unbinding Position
WT	Wildtyp