

Aus der  
Anatomischen Anstalt  
Lehrstuhl für Vegetative Anatomie  
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. med. J. Waschke



**cAMP-abhängige Regulation der desmosomalen Haftung und ihr  
Einfluss auf die Pemphigus-Pathogenese**

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

vorgelegt von

Sophia Engelmayer

aus  
Immenstadt

2024

Mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Erstes Gutachten: Prof. Dr. Jens Waschke

Zweites Gutachten: Prof. Dr. Miklós Sárdy

Drittes Gutachten: PD Dr. Michael Wehr

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. Franziska Vielmuth

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.05.2024

*Für meine Familie*

# Inhaltsverzeichnis

1	Abstract.....	6
2	Einleitung.....	7
2.1	Hautdecke.....	7
2.1.1	Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte.....	8
2.1.2	Zell-Zell-Kontakte.....	8
2.2	Pemphigus vulgaris.....	15
2.2.1	Klinik und Diagnostik.....	16
2.2.2	Pathogenese.....	19
2.2.3	Therapie.....	22
2.3	Signalmolekül zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP).....	24
2.3.1	Allgemein.....	24
2.3.2	cAMP-vermittelte Regulation der Cadherin-vermittelten Haftung.....	26
2.4	Apremilast.....	28
2.5	Fragestellung.....	30
3	Material und Methoden.....	31
3.1	Testreagenzien und Antikörper.....	31
3.2	Serumaufreinigung.....	33
3.3	Zellkultur.....	34
3.4	Keratinocyten-Dissoziationsversuch.....	35
3.5	Immunfluoreszenzfärbung.....	35
3.6	cAMP-Immunoassay.....	36
3.7	Proteinbestimmung.....	37
3.8	Gelelektrophorese und Western Blot – Analyse.....	38
3.9	Detektion von phosphorylierten Proteinen mittels Phos-Tags.....	41
3.10	Programme und Statistik.....	42
4	Ergebnisse.....	43
4.1	Apremilast ist protektiv gegen PV-IgG-induzierten Zellhaftungsverlust in primären Keratinozyten.....	43
4.1.1	Apremilast bewirkt eine cAMP-Erhöhung in Keratinozyten.....	43
4.1.2	Apremilast vermindert den durch PV-IgG-Inkubation hervorgerufenen Adhäsionsverlust.....	44
4.2	Untersuchung des protektiven Mechanismus von Apremilast.....	46
4.2.1	Apremilast verhindert die PV-IgG-induzierte Depletion von Dsg1 und Dsg3 nicht.....	46
4.2.2	Apremilast verhindert die PV-IgG-induzierte Phosphorylierung von p38MAPK nicht.....	48
4.3	Untersuchung der cAMP-Effektoren PKA und Epac1.....	49
4.3.1	Inhibition von PKA verhindert den protektiven Effekt von Apremilast.....	50
4.3.2	Rolle von Epac bei der protektiven Wirkung von cAMP.....	51
4.4	Rolle von Dsg3 im protektiven Mechanismus von cAMP.....	53

4.4.1	Verminderte Dsg3-Phosphorylierung durch cAMP-Erhöhung .....	53
4.4.2	Die PV-IgG-induzierte cAMP-Erhöhung ist abhängig von Dsg3.....	54
5	Diskussion .....	56
5.1	Therapeutische Einsetzbarkeit von Apremilast.....	56
5.2	Beteiligung verschiedener Signalwege am protektiven Mechanismus von cAMP.....	58
5.2.1	cAMP wirkt über ein Zusammenspiel verschiedener Signalwege.....	58
5.2.2	Rezeptorfunktion von Dsg3 zur Protektion gegen PV-IgG-induzierten Haftungsverlust .....	60
5.3	Die Rolle des cAMP-Effektor Epac1 in der protektiven Wirkung von Apremilast .....	62
6	Zusammenfassung .....	65
7	Literatur .....	67
8	Abkürzungsverzeichnis.....	77
9	Danksagung.....	80
10	Affidativ.....	81
11	Publikationsliste .....	82

---

# 1 Abstract

Pemphigus vulgaris (PV) is a severe autoimmune dermatosis in which autoantibodies against desmosomal cadherins cause loss of intercellular adhesion provided by desmosomes. So far, this disease has been treated by immunotherapy. However, a treatment directly targeting keratinocyte cohesion would be of great clinical interest.

It is known that pemphigus autoantibodies generate a slight increase of cAMP in keratinocytes. This was suggested to be an insufficient rescue mechanism. In contrast, a stronger cAMP increase by distinct mediators revealed a protective effect on loss of intercellular adhesion in pemphigus.

Apremilast is a PDE4 inhibitor already being deployed to treat psoriasis and Behcet's disease. Therefore, the aim of this work is to determine whether Apremilast has a protective effect on keratinocyte cohesion by increasing cAMP in pemphigus. This work shows that Apremilast abrogates PV-IgG-induced loss of desmosomal adhesion, but not by preventing Dsg depletion. Downstream signaling involves phosphorylation of plakoglobin at S665A by PKA and is dependent on Epac. In addition, PV-IgG-mediated cAMP increase depends on Dsg3 and, vice versa, cAMP increase leads to a dephosphorylation of Dsg3, identifying Dsg3 to be involved in the cAMP signaling cascade in PV.

Some of the results presented here have already been published:

Apremilast prevents blistering in human epidermis and stabilizes keratinocyte adhesion in pemphigus

Anna M. Sigmund, Markus Winkler, Sophia Engelmayer, Daniela Kugelmann, Desalegn T. Egu, Letyfee S. Steinert, Michael Fuchs, Matthias Hiermair, Mariya Y. Radeva, Franziska C. Bayerbach, Elisabeth Butz, Stefan Kotschi, Christoph Hudemann, Michael Hertl, Sunil Yeruva, Enno Schmidt, Amir S. Yazdi, Kamran Ghoreschi, Franziska Vielmuth, Jens Waschke

*Nat Commun* 14, 116 (2023)

---

## 2 Einleitung

### 2.1 Hautdecke

Die Hautdecke als größtes Organ des Menschen ist aus drei verschiedenen Schichten aufgebaut: der Epidermis, Dermis, und der Subkutis. Spricht man von der Haut (lat. Kutis) meint man damit die Einheit aus Dermis und Epidermis (Lüllmann-Rauch und Asan 2019; Welsch, Kummer, und Deller 2018). Die Epidermis ist dabei die oberste Schicht, die direkt mit der Umwelt in Kontakt steht und gegen sie eine Barriere bildet. Neben der Schutzfunktion erfüllt die Haut noch eine Reihe weiterer Aufgaben wie die der Schmerzempfindung, dem Tastsinn und der Thermoregulation (Lüllmann-Rauch und Asan 2019; Welsch, Kummer, und Deller 2018).

Die Epidermis besteht aus einem mehrschichtigen, verhornenden Plattenepithel, das hauptsächlich aus Keratinozyten aufgebaut ist. Je nach Differenzierungsgrad dieser Zellen können innerhalb der Epidermis vier verschiedene Schichten unterschieden werden (Welsch, Kummer, und Deller 2018). Die unterste Schicht, das Stratum basale, stellt die Verbindung zur Basallamina und somit zu dem unter der Epidermis liegenden Bindegewebe dar. Hier sind die Zellen mitotisch aktiv und differenzieren innerhalb von vier Wochen bis in die oberste, zellkernlose Schicht, dem Stratum corneum. In der zweiten Schicht, dem Stratum spinosum, finden sich polygonale Zellen, die reich an Desmosomen sind. Im Stratum granulosum sind die Zellen mit dem Protein Profilaggrin gefüllt, das die Filamente in den Zellen aggregiert und so zum Verhornungsprozess beiträgt. Dieses Aggregat stellt lichtmikroskopisch erkennbare Keratohyalin granula dar. Das Stratum lucidum bildet den Übergang von zellkernhaltigen, lebenden Zellen zum Stratum corneum, in dem die Keratinozyten kernlos und tot sind, weshalb man dort von Korneozyten spricht (Abb. 1). Die Epidermis enthält neben den Keratinozyten auch Melanozyten, die das Pigment Melanin bilden. Sie machen ca. 10% der epidermalen Zellen aus. Langerhans-Zellen, die einen Teil des Immunsystems bilden und Merkel Zellen,

die Mechanorezeptoren darstellen, sind ebenfalls Bestandteil der Epidermis (Lüllmann-Rauch und Asan 2019).

### **2.1.1 Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte**

Zellen sind untereinander über Zellkontakte und mit der darunter liegenden Basallamina über Zell-Matrix-Kontakte verbunden. Sie tragen zur mechanischen Stabilität von Geweben bei, trennen Kompartimente ab oder dienen der Kommunikation. Nach ihrer Funktion und Morphologie lassen sich drei Arten von Zell-Zell-Kontakten unterscheiden: Verschlusskontakte, Kommunikationskontakte und Adhäsionskontakte (Green et al. 2010). Zu den Zell-Matrix-Kontakten zählen Hemidesmosomen, die über das Transmembranprotein Integrin eine Verbindung zwischen der Basallamina und dem intrazellulären Netzwerk der Intermediärfilamente herstellen. Zu den Zell-Matrix-Kontakten gehören außerdem Fokalkontakte, die ebenfalls durch Integrin an die extrazelluläre Matrix binden und intrazellulär mit Aktinfilamenten verbunden sind (Berrier und Yamada 2007).

### **2.1.2 Zell-Zell-Kontakte**

#### 2.1.2.1 Kommunikationskontakte

Kommunikationskontakte (lat. Nexus) sind essenziell zum Austausch benachbarter Zellen. Durch sie bilden Zellen metabolische und elektrische Funktionseinheiten (Green et al. 2010). Sie kommen unter anderem in Epithelien und in Herzmuskelzellen vor, fehlen allerdings in der Skelettmuskulatur. Sie sind aus Connexinen aufgebaut, von welchen Kanäle geformt werden, durch die Ionen und hydrophile Moleküle passieren können (Goodenough und Paul 2009).

#### 2.1.2.2 Verschlusskontakte

Verschlusskontakte (lat. Zonula occludens) bilden zusammen mit Adhärensjunktionen und Desmosomen einen Schlussleistenkomplex in einfachen Epithelien, der für die Polarität der



Zellen und für die elektrische Abdichtung entscheidend ist (Green, Jaiganesh, und Broussard 2019). Durch den junktionalen Komplex können apikale und basolaterale Membranabschnitte verschiedene Aufgaben erfüllen, und es kann ein gerichteter Transport erfolgen. Die Verschlusskontakte (*engl. Tight Junctions*), die den apikalen Teil des Komplexes bilden, haben dabei eine Barrierefunktion, da sie nur einen größen- bzw. ionenspezifischen Austausch erlauben. In der Epidermis sind sie im Stratum granulosum zu finden und bilden gemeinsam mit dem Stratum corneum eine funktionelle Hautbarriere (Green et al. 2022; Brandner, Haftek, und Niessen 2010). Als Transmembranproteine kommen Occludin, Claudine und JAMs (*engl. Junctional adhesion molecules*) in Verschlusskontakten vor. An diese binden auf der zytoplasmatischen Seite Zonula-occludens-Proteine (ZO), die die Verbindung zum Aktingerüst herstellen (Saito, Higashi, und Chiba 2023).

### 2.1.2.3 Adhäsionskontakte

Zu den Adhäsionskontakten gehören die Adhärensjunktionen und die Desmosomen. Sie sind nah miteinander verwandt und teilen sich grundsätzlich denselben Aufbau: Ihre Transmembranproteine gehören der Familie der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Cadherine an, die sich unter anderem in die klassischen Cadherine und die desmosomalen Cadherine unterteilen lässt. Intrazellulär binden die Cadherine an Proteine der Armadillo-Familie, die wiederum über zytoskelettale Adaptoren an das Zytoskelett anknüpfen. Dabei verbinden Adhärensjunktionen die Plasmamembran meist mit Aktin, während Desmosomen die Verbindung mit Intermediärfilamenten aufbauen (Green, Jaiganesh, und Broussard 2019; Hegazy et al. 2022).

In den Adhärenskontakten (lat. Zonula adhaerens) der Epidermis ist das klassische Cadherin E-Cadherin vertreten, welches in allen Epidermisschichten zu finden ist (Hegazy et al. 2022; Green, Jaiganesh, und Broussard 2019). Außerdem findet sich in der Nähe von Haarfollikeln das Adhäsionsmolekül P-Cadherin (Brandner, Haftek, und Niessen 2010). Die Armadilloproteine beta-Catenin und p120-Catenin und das Adaptorprotein alpha-Catenin stellen intrazellulär eine Verbindung zum Aktinzytoskelett her. In der Haut sind Zonula

adhaerens für die interzelluläre Adhäsion mitverantwortlich und wahrscheinlich auch an der Mechanotransduktion beteiligt, indem sie auf äußere Signale reagieren und so zum Umbau des Aktinnetzwerkes führen (Jones et al. 2017; Broussard et al. 2020). Sie regulieren außerdem verschiedene zelluläre Prozesse, da sie auch als Signalempfänger fungieren. Beta-Catenin kann an Signalmoleküle, z.B. EGF (*engl. epidermal growth factor*), binden und diese so regulieren (Brandner, Haftek, und Niessen 2010; Niessen 2007; Rübsam et al. 2018).

### 2.1.2.4 Desmosomen

Desmosomen sind wichtig für die Zell-Zell-Adhäsion und verankern Intermediärfilamente an der Zellmembran (Abb. 1). Dadurch tragen Desmosomen zur mechanischen Widerstandsfähigkeit von Geweben bei und sind deshalb z.B. in der Haut und im Herzen zu finden, da diese besonders stark mechanisch belastet werden (Kowalczyk und Green 2013; Green, Jaiganesh, und Broussard 2019). Außerdem kommen sie im Gastrointestinaltrakt und der Hirnhaut vor (Holthöfer et al. 2007; Delva, Tucker, und Kowalczyk 2009).

#### 2.1.2.4.1 Bestandteile der Desmosomen

Desmosomen sind aus Proteinen dreier Protein-Familien zusammengesetzt: den desmosomalen Cadherinen, den Armadillo- und den Plakinproteinen. Die beiden Letzteren bilden gemeinsam die Plaqueproteine, die für die Verbindung der Cadherine an die Intermediärfilamente sorgen (Kowalczyk und Green 2013; Green, Jaiganesh, und Broussard 2019).

Zu den desmosomalen Cadherinen gehören Desmogleine (Dsg), von welchen vier (Dsg1-4), und Desmocolline (Dsc), von welchen drei (Dsc1-3) Isoformen bekannt sind. Sie bestehen aus vier Extrazellulärdomänen, einem extrazellulären Anker, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne, wobei diese aus einem intrazellulären Anker und variablen Subdomänen zusammengesetzt sind. Die desmosomale Adhäsion erfolgt über die Extrazellulärdomänen desmosomaler Cadherine, die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig mit den ihnen

gegenüberliegenden Cadherinen interagieren können (Berika und Garrod 2014). Desmosomale Cadherine besitzen zwischen den Extrazellulärdomänen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen, die bei einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt von  $>1$  mM besetzt sind und so die Cadherine in adhäsionskompetenter Konfiguration stabilisieren (Berika und Garrod 2014). Die Interaktion in trans von Dsg und Dsc erfolgt wahrscheinlich, wie bei klassischen Cadherinen, an ihrer Extrazellulärdomäne 1 über einen sog. Austausch eines Tryptophan-Restes und einer hydrophoben Bindungstasche (Green, Jaiganesh, und Broussard 2019; Berika und Garrod 2014). Außerdem ist bekannt, dass desmosomale Cadherine homo- und heterophil interagieren können, wobei die biologische Bedeutung der unterschiedlichen Interaktionsmechanismen und ihres jeweiligen Auftretens nicht umfassend verstanden sind (Nie et al. 2011; Vielmuth, Spindler, und Waschke 2018; Harrison et al. 2016). Desmosomale Cadherine regulieren über verschiedene Signalwege die Zelladhäsion, die Differenzierung und die Proliferation von Zellen. Dsg1 kann in vitro durch Hemmung der ERK (*engl. extracellular signal-regulated kinase*) die epidermale Differenzierung fördern (Yulis, Kusters, und Nusrat 2018). Außerdem kann Dsg1 die Aktivität der Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) regulieren und ist so an der Differenzierung von Keratinozyten beteiligt (Broussard, Getsios, und Green 2015). Dsg3 bildet mit der p38 mitogen-aktivierte Proteinkinase (p38MAP) einen Komplex und kann so die Zelladhäsion beeinflussen, was beispielsweise für die Wundheilung eine wichtige Rolle spielt (Waschke 2019; Rötzer et al. 2016). Zusätzlich beeinflusst Dsg3 die Aktivität der Tyrosinkinase Src und wirkt dadurch an der Desmosomenbildung und Adhäsion mit (Rötzer et al. 2015).

Die Armadillo-Proteine der Desmosomen sind Plakoglobin (PG) und Plakophiline mit 3 Vertretern (Pkp 1-3). PG, das 12 Armadillodomänen enthält, bindet an die Intrazellulärdomäne der Cadherine und interagiert mit dem N-Terminus von Desmoplakin (Kowalczyk und Green 2013). PG kann anders als beta-Catenin, mit dem es nah verwandt ist, an klassische und desmosomale Cadherine binden und deshalb auch einen Verlust von beta-Catenin ausgleichen (Green, Jaiganesh, und Broussard 2019; Fukunaga et al. 2005). Neben seiner Rolle als Verbindungsmolekül spielt PG auch eine wichtige Rolle in der Tumorsuppression und

hat in der Haut eine wichtige Signalfunktion. PG reguliert die Aktivität der p38MAPK und wirkt so bei der Zelladhäsion mit (Broussard, Getsios, und Green 2015; Spindler et al. 2014). Plakophiline besitzen 9 Armadillo-Domänen und interagieren mit PG und Desmoplakin. Auf diese Weise fördern Plakophiline die Plauebildung und tragen mit zur Adhäsion bei (Kowalczyk und Green 2013). Es wurde beispielsweise gezeigt, dass durch eine Überexpression von Pkp1 Desmosomen einen hyperadhäsiven Zustand annehmen, und so z.B. der durch Pemphigus-Autoantikörper-vermittelte Adhäsionsverlust verhindert werden kann (Tucker, Stahley, und Kowalczyk 2014). Außerdem spielen Plakophiline eine Rolle bei der Regulation der Zellproliferation und der Proteinbiosynthese (Broussard, Getsios, und Green 2015).

Das Plakinprotein Desmoplakin (DP) stellt die Verbindung zwischen den Armadillo-Proteinen und den Intermediärfilamenten her. Über seinen C-Terminus kann es direkt an Keratine binden und sie so am Desmosom verankern. Außerdem ist es DP über seine Spectrin-Sequenz möglich, mit Mikrotubuli, einem weiteren Zytoskelettbestandteil, zu interagieren (Kowalczyk und Green 2013). DP kann durch seine Plakindomäne mit PG und allen Pkp-Vertretern Bindungen eingehen und unterstützt so den Komplex aus Cadherinen und Armadillo-Proteinen (Jones et al. 2017). Zellen, die kein DP besitzen, können keine Desmosomen mehr bilden, wodurch die Zelladhäsion massiv gestört ist (Wanuske et al. 2021). Dies zeigt die Bedeutung von DP für die Aufrechterhaltung einer funktionierenden Hautbarriere.

Intermediärfilamente bestehen aus Heterodimeren, die im Hautepithel aus den Proteinen Keratin Typ I und II bestehen. Diese lagern sich zu Tetrameren zusammen, von denen vier gemeinsam unipolare Filamente bilden, die sich bündeln und das Intermediärfilament-Netzwerk formen (Hatzfeld, Keil, und Magin 2017). Sie sind über DP am Desmosom gebunden und tragen ebenfalls zur Adhäsion bei, denn ohne die Verankerung der Intermediärfilamente erfolgt ein Adhäsionsverlust der Desmosomen (Jones et al. 2017; Vielmuth et al. 2018; Bär et al. 2014). Intermediärfilamente sind sehr flexibel und bruchfest. Damit tragen sie zur Aufrechterhaltung der Gewebeintegrität bei und verleihen den Zellen eine starke mechanische Stabilität (Hatzfeld, Keil, und Magin 2017). Zusätzlich modulieren sie durch Wechselwirkungen

mit anderen Bestandteilen des Zytoskeletts Signalwege und können durch den Aufbau eines komplexen intrazellulären Netzwerks auf äußere Kräfte reagieren (Jones et al. 2017; Broussard, Getsios, und Green 2015). Es konnte gezeigt werden, dass Keratine über eine Proteinkinase-C-abhängige Phosphorylierung von DP die Adhäsion von Desmosomen regulieren (Kröger et al. 2013).

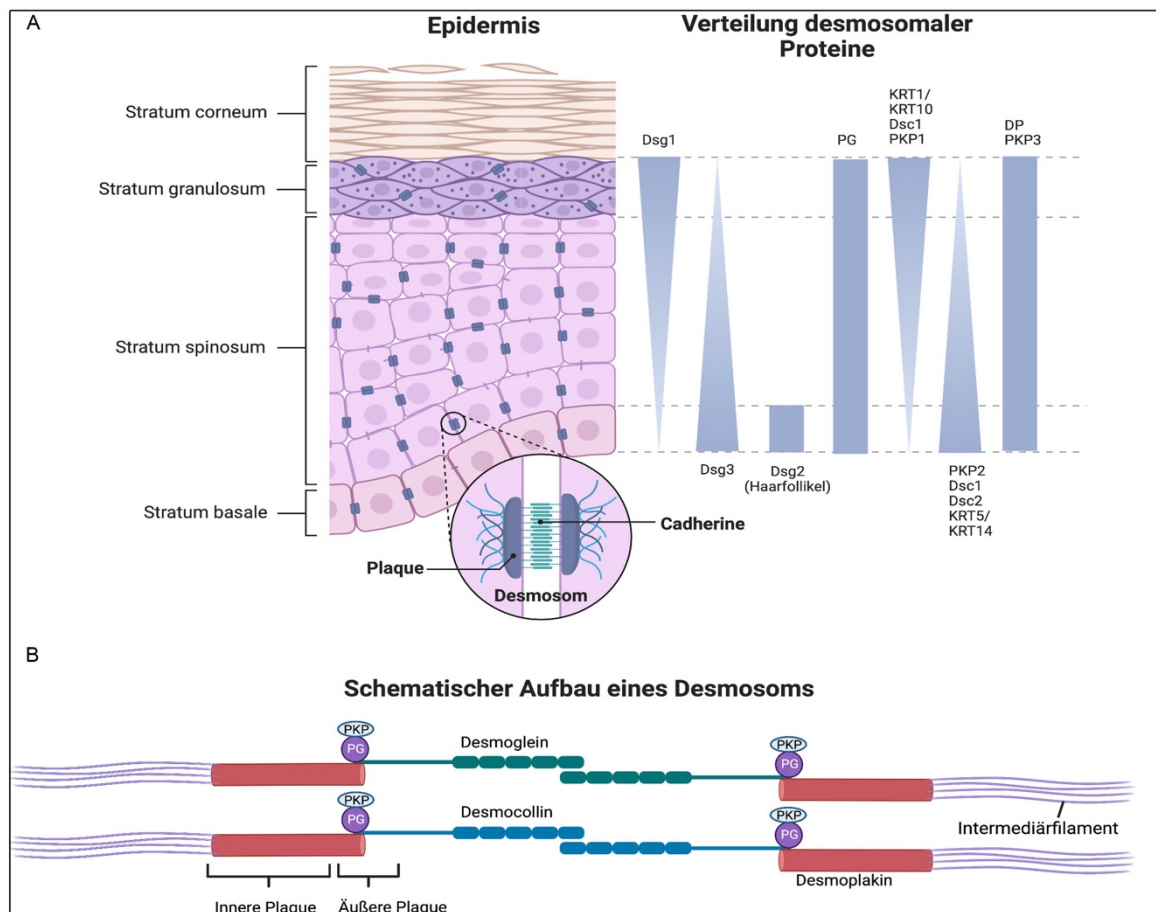


Abb. 1 Verteilung desmosomaler Proteine in der Epidermis und Aufbau von Desmosomen

(A) Aufbau der Epidermis und die Verteilung desmosomaler Proteine in den verschiedenen Schichten.

Dsg: Desmoglein; Dsc: Desmocollin; KRT: Keratin; DP: Desmoplakin

(B) Schematischer Aufbau eines Desmosoms. Die äußere Plaque wird von Plakophilin (PKP), Plakoglobin (PG) und dem N-Terminus von Desmoplakin gebildet. Sie stellt die Bindungsstelle an die Cadherine dar.

Die Innere Plaque besteht aus dem C-Terminus von Desmoplakin, an den die Keratinfilamente binden.

### 2.1.2.4.2 Ultrastruktur und Hyperadhäsion der Desmosomen

Aus dem zuvor beschriebenen Aufbau ergibt sich eine typische Ultrastruktur von Desmosomen: In der Desmoglea, dem Bereich zwischen den Membranen, ist eine elektronendichte Mittellinie sichtbar, die durch die Überlagerung der N-Termini der Cadherine hervorgerufen wird. Intrazellulär finden sich eine äußere, dichte und eine innere, weniger dichte Plaque. Die äußere Plaque beinhaltet Plakophilin, das am nächsten an der Zellmembran liegt, PG und den N-Terminus von DP. Der C-Terminus von DP bildet zusammen mit inserierenden Keratinfilamenten die innere Plaque (Berika und Garrod 2014; Al-Amoudi et al. 2007; Owen et al. 2008)

Die elektronendichte Mittellinie ist als morphologisches Charakteristikum der desmosomalen Hyperadhäsion vorgeschlagen worden. Darunter versteht man einen Zustand der Differenzierung von Desmosomen, in dem es trotz  $\text{Ca}^{2+}$ -Entzug zu keinem Adhäsionsverlust kommt (Berika und Garrod 2014; Kitajima 2014). Es wird vermutet, dass dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Adhäsionszustand durch Phosphorylierung einiger Plaqueproteine reguliert wird (Berika und Garrod 2014). Es wurde beispielsweise gezeigt, dass die Bildung hyperadhäsiver Desmosomen von PKP1 abhängig ist (South et al. 2003). Auch DP spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Hyperadhäsion (Hobbs und Green 2012). Um eine epitheliale Regenerierung zu ermöglichen, können Keratinozyten Proteinkinase C-abhängig zwischen den beiden adhäsiven Zuständen wechseln (Berika und Garrod 2014).

### 2.1.2.4.3 Verteilung desmosomaler Proteine

Die desmosomalen Proteine sind nicht in allen Geweben gleichmäßig exprimiert. Dsg2 und Dsc2 kommen in allen Geweben vor, die Desmosomen tragen, während die anderen desmosomalen Cadherine hauptsächlich in mehrschichtigen Epithelien exprimiert werden (Delva, Tucker, und Kowalczyk 2009). In der Epidermis verändert sich die Zusammensetzung der Desmosomen nach Differenzierungsgrad der Keratinozyten (Abb. 1). Dsg3 findet sich in den unteren Schichten, während Dsg1 hauptsächlich suprabasal exprimiert wird. Dsg2 ist

vermutlich nur in Haarfollikeln und der basalen Schicht der Epidermis zu finden (Hartlieb et al. 2013; Egu, Schmitt, und Waschke 2022). Dsc1 kommt hauptsächlich in den oberen Schichten vor; dagegen treten Dsc2 und Dsc3 vorrangig basal auf (Green und Gaudry 2000). Pkp1 ist ebenfalls vor allem in den oberen Hautschichten vorhanden, wohingegen Pkp2 basal zu finden ist. Pkp3, PG und DP werden gleichmäßig in der gesamten Epidermis exprimiert. Auch die Zusammensetzung des Keratinnetzwerkes ist je nach Epidermisschicht unterschiedlich. Je weiter Keratinozyten differenzieren, desto mehr enthalten sie das Keratin-Paar 1/10 (KRT1/KRT10), während basal noch KRT5/KRT14 dominiert (Hatzfeld, Keil, und Magin 2017). Es wird angenommen, dass das Verteilungsmuster der desmosomalen Bestandteile die unterschiedlichen Funktionen der Hautschichten ermöglicht, denn wie bereits erläutert erfüllen die desmosomalen Proteine neben der Adhäsion auch Signalfunktionen. So ist basal Proliferation möglich, während apikal die Barrierefunktion eine wichtigere Rolle spielt (Johnson, Najor, und Green 2014). Dazu passend werden Tight Junctions nur in der mittleren Schicht des Stratum granulosum exprimiert (Yoshida et al. 2013).

## 2.2 Pemphigus vulgaris

Pemphigus vulgaris gehört zu der Gruppe der blasenbildenden Autoimmundermatosen (Goebeler und Hamm 2017). Diese haben gemein, dass es durch die Bildung von Autoantikörpern gegen Adhäsionsmoleküle der Haut zu einer Spaltbildung kommt. Bei Pemphigus kommt es durch Bildung von Antikörpern gegen die desmosomalen Adhäsionsmoleküle Dsg 1 und 3 zu einer intraepidermalen Spaltbildung (Beek, Zillikens, und Schmidt 2018; Spindler und Waschke 2018).

### 2.2.1 Klinik und Diagnostik

Die Pemphigus-Erkrankungen lassen sich in Pemphigus vulgaris (PV) und Pemphigus foeliaceus (PF) unterteilen (Spindler und Waschke 2018; Kasperkiewicz et al. 2017; Schmidt, Kasperkiewicz, und Joly 2019). PV ist mit einer Inzidenz von 0,1-0,5 Fällen pro 100.000 Menschen eine seltene Krankheit. Sie tritt am häufigsten zwischen dem 40. – 60. Lebensjahr auf und ist unabhängig vom Geschlecht (Porro et al. 2019; Pollmann et al. 2018). PF tritt mit weniger als 1 Fall pro 1.000.000 Einwohner noch seltener auf als PV (Pollmann et al. 2018; James, Culton, und Diaz 2011; Kridin und Schmidt 2021). Neben dem sporadisch auftretenden PF existieren endemische Varianten in Brasilien (Fogo selvagem) und Tunesien (Hofmann, Juratli, und Eming 2018). Bei PV sind die Schleimhäute und eventuell zusätzlich die Haut betroffen. Im Gegensatz dazu beschränkt sich die Blasenbildung bei PF ausschließlich auf die Haut. Diese Verteilung lässt sich anhand der Antikörperverteilung erklären. Tritt PV nur in den Schleimhäuten auf, liegen Autoantikörper gegen Dsg3 vor, während beim mukokutanen Typ zusätzlich Dsg1-Antikörper gebildet werden. Häufig manifestiert sich PV zunächst in der Mukosa und tritt später auch an der Haut auf (Spindler und Waschke 2018). Bei PF treten dagegen ausschließlich Antikörper gegen Dsg1 auf (Kasperkiewicz et al. 2017). Außerdem unterscheiden sie sich hinsichtlich der Lokalisation der Spaltbildung. Während die Läsionen bei PV suprabasal in der Epidermis liegen, zeichnet sich PF durch superfizielle Blasenbildung aus (Spindler und Waschke 2018). Als Erklärung für diesen Phänotyp wurde lange die sog. Desmoglein-Kompensationstheorie diskutiert. Dabei geht man davon aus, dass das Dsg1 in der Epidermis, solange nur Dsg3 Antikörper vorhanden sind, den Verlust von Dsg3 kompensieren kann und es hier deshalb zu keiner Blasenbildung kommt. Da in der Mukosa kaum Dsg1 exprimiert wird, gelingt dies dort nicht und es bilden sich Schleimhautläsionen. Bei PF dagegen kann Dsg3 in den tiefen Schichten der Epidermis den Funktionsverlust von Dsg1 kompensieren. In den oberen Schichten findet sich kaum Dsg3, weshalb es zur superfiziellen Blasenbildung kommt. Ungeklärt ist, weshalb es nach dieser Theorie beim mukokutanen PV zu einer tiefen Blasenbildung und nicht zu einem Adhäsionsverlust in allen Ebenen kommt (Sielski et al. 2022). Außerdem spricht gegen die Kompensationstheorie, dass es Fälle von PV



gibt, die einen Phänotyp zeigen, der nicht zu ihrem Antikörperprofil passt (Waschke 2008; Jamora, Jiao, und Bystryn 2003).

Klinisch manifestieren sich bei PV in der Schleimhaut schlaffe Blasen, die kurz nach ihrer Bildung durch die schmale, sie bedeckende Schleimhaut zerreißen, weshalb es frühzeitig zur Erosionbildung kommt. Häufig sind in der Mundhöhle die Innenseiten der Wange, die Zunge und der Gaumen betroffen (Bystryn und Rudolph 2005; Subadra, S, und Warriar 2021). Neben der Mundschleimhaut können selten auch die Schleimhäute der Speiseröhre, der Nase oder der Genitalien betroffen sein (Kasperkiewicz et al. 2017). Diese Läsionen sind sehr schmerzhaft, weshalb Patienten häufig zu wenig trinken und ihre Nahrungsaufnahme reduzieren (Amagai 2008). An der Haut sind hauptsächlich leicht blutende und schnell verkrustende Erosionen auf meist erythematöser Haut zu finden, die wenig Heilungstendenz zeigen. Auch hier finden sich selten Blasen, da sie frühzeitig rupturieren. Die Läsionen können überall am Körper auftreten; typische Prädilektionsstellen sind aber der Kopf, der Oberkörper und die Leiste (Ahmed 1983; Amagai 2008).

PF zeichnet sich durch schuppig verkrustete Erosionen aus, die ausschließlich in der Haut auftreten (Bystryn und Rudolph 2005).

Die Ätiologie der Krankheit ist bis heute nicht bekannt. Es wurde allerdings gezeigt, dass es eine Verbindung zwischen PV und bestimmten Allelen humaner Leukozytenantigens (HLA) der Klasse II gibt (Pollmann et al. 2018; Vodo, Sarig, und Sprecher 2018; Baker, Seiffert-Sinha, und Sinha 2022). Außerdem wurde eine Assoziation zwischen dem ST18-Gen und Pemphigus gefunden (Assaf et al. 2021). Neben einer genetischen Disposition werden verschiedene Triggerfaktoren diskutiert. Diese sind Medikamente, wie z. B. Penicillin, aber auch Stress, ultraviolettes Licht und andere Krankheiten, wie z. B. Hepatitis. Auch eine Schwangerschaft kann eine Verschlechterung von Pemphigus hervorrufen. Es wird vermutet, dass Pemphigus eine Krankheit von multifaktoriellen Auslösern darstellt (Tavakolpour 2018; Schmidt, Kasperkiewicz, und Joly 2019).

Zur Diagnostik von Pemphigus dienen das klinische Erscheinungsbild und klinische Zeichen wie z.B. das positive Nikolski-Phänomen. Ein positives Nikolski-Zeichen I liegt vor, wenn durch Einwirkung von Druck auf intakter Haut eine neue Blase entsteht (Didona et al. 2023). Beim Nikolski-Zeichen II lässt sich eine Blase durch Fingerdruck verschieben oder vergrößern (Hofmann, Juratli, und Eming 2018). Ein positives Nikolski-Zeichen allein reicht allerdings nicht zur Diagnosestellung aus. Zusätzlich ist die Methode sehr belastend für die Patienten. Als Goldstandard dient daher die Methode der direkten Immunfluoreszenz, bei der in periläsionaler Haut Autoantikörper nachgewiesen werden. Bei Pemphigus lassen sich die IgG und/oder der Komplementfaktor C3 interzellulär in der Epidermis nachweisen (van Beek, Zillikens, und Schmidt 2018). Inzwischen gibt es aber weitere Diagnostikmethoden, die eine serologische Untersuchung und damit den direkten Nachweis von anti-Dsg1- und anti-Dsg3-Antikörper ELISA (*engl. enzym linked immunosorbent assay*) ermöglichen. Hier ist die indirekte Immunfluoreszenz, bei der Gewebssubstrate, z. B. vom Affen, mit Serum von Patienten behandelt werden und anschließend ebenfalls die Verteilung von Autoantikörpern im Epithel mittels Fluoreszenz sichtbar gemacht werden kann, der Goldstandard (Hofmann, Juratli, und Eming 2018; van Beek, Zillikens, und Schmidt 2018). Durch Histopathologie mit einer läsionalen Biopsie lässt sich bei einer Pemphiguserkrankung eine intraepidermale Spaltbildung nachweisen (van Beek, Zillikens, und Schmidt 2018).

Mit dem PDAI (Pemphigus Disease Area Index) existiert ein Bewertungssystem, mit dem sich der Schweregrad von Pemphigus definieren lässt. Zunächst wird anhand des PDAI die Haut an verschiedenen Körperteilen sowie die Kopf- und Schleimhaut betrachtet und dann Läsionen an diesen Stellen nach Aktivität bzw. nach postläsionalen Schäden beurteilt. Zusätzlich wird nicht die Anzahl, sondern die Größe der Läsionen als Parameter verwendet. Der PDAI erleichtert so die Kommunikation und ermöglicht eine gute Verlaufsbeurteilung (Daniel et al. 2012).

## 2.2.2 Pathogenese

Autoantikörper gegen Dsg1 und/oder Dsg3 sind bei Pemphigus allein ausreichend, um die Erkrankung auszulösen, wobei teilweise auch Antikörper gegen Dsc3 zu finden sind, die ebenfalls pathogen sein können (Spindler und Waschke 2018; Amagai et al. 1998). Daneben sind in Patientenproben auch Antikörper gegen nicht-desmosomale Proteine nachzuweisen, deren Rolle in der Pathogenese von Pemphigus noch nicht vollständig geklärt ist (Spindler und Waschke 2018; Nguyen et al. 2000; Sinha und Sajda 2018). Zu finden sind unter anderem Antikörper gegen muskarinische und nikotinische Acetylcholinrezeptoren, gegen Moleküle des humanen Leukozytenantigens und gegen mitochondriale Proteine (Amber, Valdebran, und Grando 2018). Außerdem konnten in Pemphigus-Seren Antikörper gegen die Cadherine E-Cad und Dsc nachgewiesen werden (Amagai et al. 2006). Man weiß, dass Dsc-Antikörper im Hautmodell intraepidermale Blasenbildung hervorrufen und die Adsorption dieser Antikörper vor dem Adhäsionsverlust von primären humanen Keratinozyten *in vitro* schützen kann (Mao et al. 2010; Amber, Valdebran, und Grando 2018). Dies zeigt das notwendige Auftreten von Dsc-Antikörpern in der Pathogenese von zumindest seltenen Pemphigus-Formen (Spindler et al. 2018).

Die Bindung von Autoantikörpern an Desmosomen löst verschiedene morphologische bzw. strukturelle Veränderungen aus. Zum einen kann eine Depletion von desmosomalen Cadherinen beobachtet werden (Kitajima 2014). Dadurch kommt es zur Reduzierung von Desmogleinen an der Membran (Spindler und Waschke 2018). Das erste elektronenmikroskopisch sichtbare Zeichen in der Akantholyse ist der erweiterte interzelluläre Raum bei noch intakten Desmosomen. Auf ultrastruktureller Ebene werden kleinere, morphologisch veränderte Desmosomen beschrieben. (Diercks, Pas, und Jonkman 2009; Egu et al. 2017; Egu, Schmitt, und Waschke 2022). Außerdem ist die Menge an Desmosomen reduziert (Saito et al. 2012; Spindler und Waschke 2018; Egu, Schmitt, und Waschke 2022). Schon früh in der Pemphigusforschung wurden auch Veränderungen an den Keratinfilamenten festgestellt (Wilgram, Caulfield, und Lever 1961). Dieses Phänomen wird als „Keratinfilamentretraktion“ bezeichnet. Die Keratinfilamente kondensieren perinukleär,

erscheinen dicker, und die Verbindung zur Zellmembran geht verloren (Schlögl et al. 2018). Dies ist ein wichtiges morphologisches Kennzeichen in der Pemphigus-Pathogenese.

Die genaue Pathogenese dieser Autoimmunerkrankung ist noch nicht vollständig geklärt. Das erste Modell, welches diskutiert wurde, war die Theorie der sog. „direkten Inhibition“. Sie besagt, dass die Autoantikörper direkt die Interaktion von Dsg1 und 3 behindern und dadurch der Adhäsionsverlust entsteht (Amagai und Stanley 2012). Diese Theorie beruht auf der Beobachtung, dass Mäuse, denen Dsg3 fehlt, einen ähnlichen Phänotyp wie unter PV-IgG-Gabe zeigen, jedoch ohne die Präsenz von Antikörpern (Amagai und Stanley 2012). Nachfolgend konnte gezeigt werden, dass isolierte Antikörper, die einen PV-Phänotyp induzieren, gegen Epitope auf Dsg3 gerichtet sind, die als adhäsive Bereiche des Moleküls agieren (Tsunoda et al. 2003). Für die Theorie der direkten Inhibition spricht somit, dass Pemphigus-Autoantikörper hauptsächlich die an der desmosomalen Bindung beteiligten EC-Domänen 1 und 2 angreifen (Kasperkiewicz et al. 2017). Außerdem konnte in Rasterkraftmikroskop-Experimenten (AFM) gezeigt werden, dass PV-IgG tatsächlich die Interaktion zwischen Dsg3-Molekülen blockieren können (Heupel et al. 2008; Vielmuth, Waschke, und Spindler 2015). Inzwischen deutet aber viel darauf hin, dass ein indirekter Adhäsionsverlust durch Aktivierung von Signalwegen, die zum einen den Desmosomenumsatz und zum anderen die Keratinverankerung beeinflussen, eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von Pemphigus spielt (Waschke und Spindler 2014). Zunächst konnte in AFM-Experimenten gezeigt werden, dass PF-IgG keine direkte Inhibition von homophilen Dsg1 Interaktionen induzieren, obwohl diese pathogen sind (Vielmuth, Spindler, und Waschke 2018; Waschke et al. 2005). Die Spaltbildung kann somit nicht allein auf den Bindungsverlust zwischen Desmogleinen zurückgeführt werden. Außerdem konnte durch Modulation verschiedener Signalmoleküle ein Adhäsionsverlust durch PV-IgG verhindert werden, obwohl direkte Inhibition auftrat, was dafür spricht, dass diese Teil der Pathogenese sein müssen (Saito et al. 2012; Vielmuth, Waschke, und Spindler 2015). Dabei wird p38MAPK und die ihr nachgeschaltete MAP-Kinase-aktivierte Proteinkinase 2 (MAPKAP 2) eine zentrale Rolle beigemessen (Spindler und Waschke 2018). P38MAPK wird unter

Normalbedingungen durch Dsg3 und PG in ihrer Aktivität gehemmt. Durch die Anwesenheit von Dsg-Antikörpern wird sie phosphoryliert und aktiviert. Die p38MAPK-Phosphorylierung konnte auch in Hautproben von Pemphigus-Patienten nachgewiesen werden (Berkowitz et al. 2008). Eine Hemmung der PV-IgG-induzierten Aktivierung der p38MAPK kann den Adhäsionsverlust sowohl in der Zellkultur, im Mausmodell, als auch in humaner Epidermis verhindern (Berkowitz et al. 2005; Egu et al. 2017; Berkowitz et al. 2006; Jolly et al. 2010). Allerdings konnte eine Blasenbildung auch in p38alpha-MAPK-defizienten Mäusen hervorgerufen werden, was dafür spricht, dass die Alpha-Isoform von p38MAPK nicht alleinig für die Blasenbildung verantwortlich ist (Mao et al. 2011). Es ist bekannt, dass die aktive p38MAPK Keratine phosphoryliert und dass diese Phosphorylierung die Keratinorganisation verändert (Woll, Windoffer, und Leube 2007). Die Hemmung von p38MAPK verhindert die PV-IgG-induzierte Keratinfilamentretraktion und kann in keratindexizienten Zellen die Zelladhäsion verbessern (Berkowitz et al. 2005; Vielmuth et al. 2018). Dies zeigt den Zusammenhang zwischen dem p38MAPK-Signalweg und der Keratinfilament-Regulation. Auch weitere Signalkaskaden wurden untersucht. Beispielsweise konnte eine Hemmung der kleinen GTPase RhoA/Rac durch p38MAPK nachgewiesen werden. Außerdem konnte durch RhoA-Aktivierung die Keratinfilamentretraktion verhindert werden (Sajda und Sinha 2018; Waschke et al. 2006). Der EGF-Rezeptor (*engl. epidermal growth factor receptor*) wird vermutlich durch anti-Dsg3-Antikörper aktiviert und es wurde bereits gezeigt, dass durch Hemmung dieses Signalwegs die Blasenbildung im Mausmodell verhindert werden kann (Bektas et al. 2013; Walter et al. 2019). Dagegen wird ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und die damit verbundene Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) nur in Anwesenheit von anti-Dsg1-Antikörpern beobachtet (Walter et al. 2017; Schmitt und Waschke 2021). Die PKC wiederum führt zur Auflösung der Keratinverankerung, die als Hauptmerkmal der Akantholyse in Pemphigus gilt (Sajda und Sinha 2018). Die P38MAPK-Aktivierung ist unabhängig vom Antikörperprofil, während cAMP und EGFR-Aktivierung mit anti-Dsg3-Antikörper assoziiert sind und ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom wohl durch anti-Dsg1 induziert wird. Die Pathogenese ist somit abhängig vom jeweiligen Antikörperprofil (Schmitt und Waschke 2021). So könnten sich eventuell auch die

verschiedenen Phänotypen von PF und PV erklären lassen, da dies durch die vorherig beschriebene Kompensationstheorie nicht möglich ist. Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Pathogenese von Pemphigus noch nicht abschließend verstanden wurde.

### 2.2.3 Therapie

PV ist eine potenziell tödliche Krankheit, wobei die Mortalitätsrate durch Einführung der Glukokortikoidtherapie deutlich reduziert werden konnte (Bystryn und Steinman 1996). Durch die Anwendung von adjuvanten Immunsuppressiva konnte eine Mortalitätsrate von 5-10 % erreicht werden (Porro et al. 2019; Kridin 2018b). Wichtig ist eine systemische Therapie, da es sich um eine Krankheit mit multiplen Läsionen handelt, die in Schleimhaut und Epidermis vorkommen (Porro et al. 2019). Das vorrangige Ziel des aktuellen Therapieansatzes ist eine schnelle Abheilung der Läsionen, eine möglichst lange Remissionsicherung und Rezidive zu vermeiden (van Beek, Zillikens, und Schmidt 2019). Die Basistherapie besteht aus hochdosierter, systemischer Glukokortikoidgabe (Schmidt, Kasperkiewicz, und Joly 2019). Dies führt meist innerhalb weniger Tage zur Verbesserung des Hautbilds, und es treten nach wenigen Wochen keine neuen Läsionen auf. Ab diesem Zeitpunkt kann die Dosierung herabgesetzt werden. Außerdem werden adjuvant Immunsuppressiva wie z.B. Azathioprin verabreicht (van Beek, Zillikens, und Schmidt 2019; Schmidt et al. 2020). Ein relativ neuer Therapieansatz ist die adjuvante Anwendung von Rituximab, einem monoklonalen CD20-Antikörper, der B-Lymphozyten über ihr CD20-Antigen eliminiert und so verhindert, dass Autoantikörper gegen Desmogleine entstehen (Pollmann et al. 2018). Dadurch konnte bei ca. 82-86% der Pemphigus-Patienten eine vollständige Remission erreicht werden (Joly et al. 2007; Werth et al. 2021; Ahmed et al. 2006). Eine weitere Therapieoption stellen die Plasmapherese und die selektive Immunoabsorption dar. Hierbei werden die pathogenen Antikörper aus dem Blutkreislauf entfernt. Die genannten Therapieverfahren werden hauptsächlich bei refraktären oder schweren Fällen eingesetzt (Porro et al. 2019). Adjuvant wird auch die intravenöse Immunglobulingabe angewandt. Dabei werden IgG aus Humanplasma verwendet, die zum einen den Titer der pathogenen PV-IgG senken und zum

anderen das Komplementsystem aktivieren. Diese Art der Therapie wird eingesetzt, sollte eine Immunsuppression kontraindiziert sein (Kridin 2018a). Zusätzlich zu den beschriebenen Therapieansätzen ist eine symptomatische Therapie durch Schmerzmedikation und die Anwendung antiseptischer Bäder zur Verhinderung von bakteriellen Infektionen wichtig (van Beek, Zillikens, und Schmidt 2019).

Die bisherige Therapieempfehlung zielt vor allem auf die Immunsuppression hin. Diese ist allerdings mit vielen Nebenwirkungen, wie erhöhtem Blutdruck, Gefahr von Ulkusbildungen im Magen-Darm-Trakt und einer erhöhten Infektanfälligkeit verbunden (Kridin 2018a). Außerdem sind die aktuellen Ansätze hauptsächlich zur palliativen Therapie geeignet. Eine kausale Therapie ist noch nicht existent und aufgrund der Komplikationen, die durch Immunsuppressiva hervorgerufen werden können, ein wichtiges Forschungsgebiet (Ellebrecht und Payne 2017a). Einen Ansatz stellt beispielsweise die Chimäre Autoantigen-Rezeptor-Therapie (CAART) dar, bei der T-Zellen einen chimären Immunrezeptor, in welchem Dsg3 als Domäne eingebaut wurde, exprimieren. Diese Zellen wirken spezifisch zytotoxisch auf B-Zellen, die für die Autoimmunität verantwortlich sind (Ellebrecht und Payne 2017b). Dadurch wird eine bessere Verträglichkeit für den Patienten erwartet. In der Tumorthherapie werden CAART-Zellen bereits eingesetzt. Für Autoimmunerkrankungen wurde der Therapieansatz jedoch bisher nur experimentell erforscht (Ellebrecht und Payne 2017a; Ellebrecht et al. 2016; van Beek, Zillikens, und Schmidt 2019). Einen weiteren interessanten Therapieansatz stellen z.B. Bruton-Tyrosinkinase (BTK)-Inhibitoren dar, die einen anderen Ansatzpunkt in der Hemmung der B-Zellen nutzen, als Rituximab (Didona et al. 2019). In ersten Studien konnte durch den Einsatz eines BTK-Inhibitors die Steroidgabe reduziert werden, allerdings wurden auch Nebenwirkungen wie Übelkeit dokumentiert (Kridin 2018a; van Beek, Zillikens, und Schmidt 2019).

## 2.3 Signalmolekül zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP)

### 2.3.1 Allgemein

cAMP ist ein wichtiges Signalmolekül in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen (Kuszak und Sunahara 2010). Entdeckt wurde es von Dr. Earl W. Sutherland in den 1950er Jahren, wofür er später den Nobelpreis verliehen bekam (Pittenger, Nestler, und Duman 2012; Serezani et al. 2008).

Gebildet wird cAMP durch membranständige Adenylatzyklen (AC) aus Adenosintriphosphat, sobald diese durch die aktive Untereinheit  $G_s\alpha$  eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors aktiviert werden (Abb. 2). Dieser wiederum kann durch biogene Amine, Hormone oder Proteine stimuliert werden (Müller-Esterl 2018; Kuszak und Sunahara 2010). Außerdem können die meisten Adenylatzyklen auch direkt durch den Mediator Forskolin aktiviert werden (Laurenza, Sutkowski, und Seamon 1989). In Säugetieren sind 10 verschiedene Typen von Adenylatzyklen bekannt, die eine gewebsspezifische Verteilung aufweisen. Außerdem werden sie teilweise unterschiedlich aktiviert und gehemmt. Beispielsweise kann die AC1 durch  $Ca^{2+}$  aktiviert werden, während AC5 dadurch inhibiert wird (Pittenger, Nestler, und Duman 2012). Es ist noch nicht endgültig geklärt, welche Familie der Adenylatzyklen in der Haut dominiert, allerdings konnte in Keratinozyten von Ratten hauptsächlich die AC2 nachgewiesen werden (Takahashi et al. 1998). Neuere Studien deuten darauf hin, dass in der Epidermis von Menschen vor allem die Isoformen AC3,7 und 9 exprimiert werden (Simard et al. 2020).

cAMP beeinflusst viele Proteine in ihrer Aktivität. Der bekannteste cAMP-Effektor ist die Proteinkinase A (PKA). Sie ändert durch die Bindung von 2 Molekülen cAMP an die regulatorischen Untereinheiten ihre Konformation und gibt die katalytischen Untereinheiten frei. Diese katalysieren die Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten ihrer Effektorproteine. Dadurch werden beispielsweise im Herzen L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle geöffnet, die einen  $Ca^{2+}$ -Einstrom bewirken, der wiederum die Kontraktionskraft verstärkt. Die katalytische



Untereinheit der PKA kann ebenso im Zellkern Transkriptionsfaktoren, wie z.B. CREB (*engl. cAMP response element binding protein*) phosphorylieren, wodurch cAMP die Expression von Proteinen beeinflusst (Müller-Esterl 2018; Kopperud et al. 2003). So kann cAMP unter anderem die Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. dem Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) inhibieren (Schett et al. 2010). Weitere bekannte cAMP-Effektoren sind Epac (*engl. exchange proteins directly activated by cAMP*) und zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle (Serezani et al. 2008). Epac, ein GTP-Austauschfaktor, kann unabhängig von PKA die kleine GTPase Rap aktivieren, die die Zelladhäsion positiv durch Regulation von Integrinen beeinflusst (Bos 2003; Vielmuth et al. 2023). Im Endothel wurde bereits gezeigt, dass eine Erhöhung von cAMP durch Forskolin-Zugabe die Zellbarriere verstärkt, in dem vermehrt vaskuläres-endotheliales (VE-) Cadherin gebildet wird (Fukuhara et al. 2005; Spindler, Schlegel, und Waschke 2010). Man geht davon aus, dass die verschiedenen Rezeptoren ihre Wirkung teilweise gegenseitig verstärken, aber auch entgegengesetzt wirken können (Cheng et al. 2008).

cAMP hat wie alle sekundären Botenstoffe eine kurze Halbwertszeit. Es wird von Phosphodiesterasen (PDE) durch Hydrolyse zu Adenosinmonophosphat abgebaut (Abb. 2) (Müller-Esterl 2018). Auch hier finden sich je nach Gewebe verschiedene Isoformen, die alle eine unterschiedliche Affinität zu cAMP haben und unterschiedlich reguliert werden (Pittenger, Nestler, und Duman 2012). Insgesamt sind 11 Isoformen bekannt, von denen in Keratinozyten hauptsächlich die PDE4 exprimiert wird (Chujor, Hammerschmid, und Lam 1998). Diese Isoform wurde in anderen Geweben bereits als guter Angriffspunkt in der Therapie von verschiedenen entzündlichen Krankheiten, wie z.B. chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) oder Asthma, identifiziert (Sanz, Cortijo, und Morcillo 2005).

Das Endothel steuert Entzündungsreaktionen, in dem es die Zellpermeabilität erhöht und so eine Migration von Leukozyten zulässt. Durch einen cAMP-Anstieg nimmt die Permeabilität ab. Die PDE4 wurde als ein Schlüsselenzym in diesem Signalweg identifiziert (Fertig und Baillie 2018). Selektive PDE4-Hemmer zeigen in klinischen Studien gute Ergebnisse in der Behandlung von chronisch entzündlichen Erkrankungen, und mit Roflumilast steht in der

Behandlung von COPD ein geeignetes Medikament zur Verfügung (Zhang et al. 2018; Sanz, Cortijo, und Morcillo 2005). Auch für entzündliche Hauterkrankungen wie Psoriasis oder atopische Dermatitis werden aufgrund ihrer antiinflammatorischen Wirkung PDE4-Hemmer als Therapieansatz diskutiert bzw. bereits eingesetzt. Hier ist der Wirkstoff Apremilast zu nennen, der in der Behandlung von Psoriasis und dem Behcet-Syndrom schon Therapieerfolge gezeigt hat (Schafer et al. 2019; Hatemi et al. 2019).

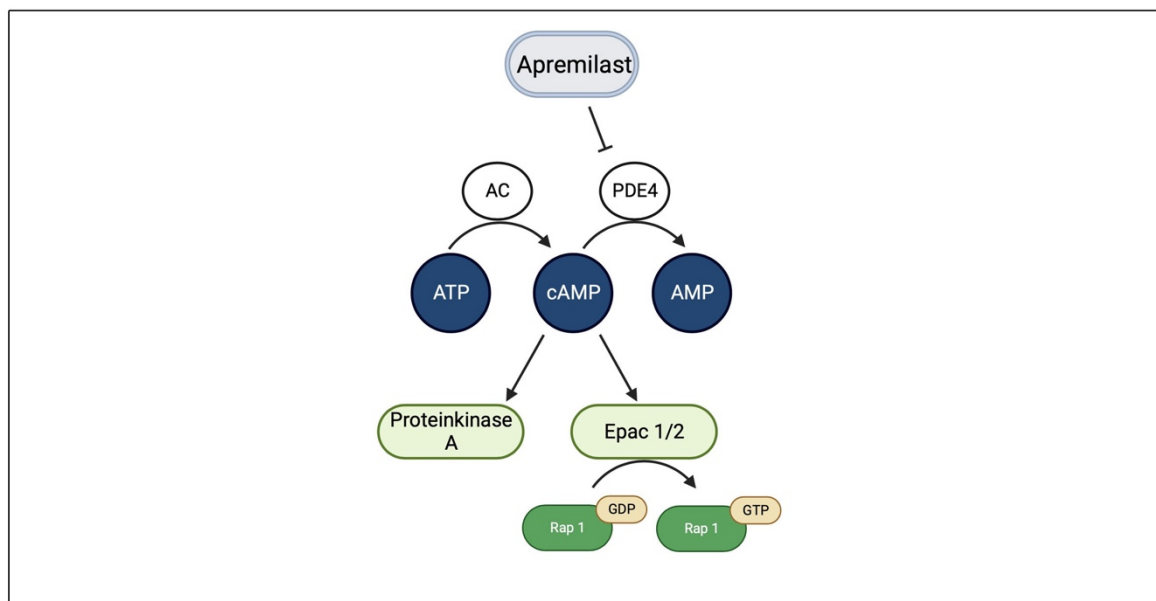


Abb. 2 Überblick über das Signalmolekül cAMP

Apremilast verhindert den Abbau von cAMP, indem es die Phosphodiesterase-4 hemmt und sorgt so für einen intrazellulären cAMP Anstieg. Die beiden wichtigsten cAMP-Effektormoleküle sind die Proteinkinase A und Epac Typ 1 und 2. Diese können entgegengesetzt und getrennt voneinander, aber auch gegenseitig verstärkend wirken. Epac kann beispielsweise als GTP-Austauschfaktor unabhängig von PKA die kleine GTPase Rap aktivieren.

Created with BioRender.com

### 2.3.2 cAMP-vermittelte Regulation der Cadherin-vermittelten Haftung

Inzwischen ist etabliert, dass cAMP in verschiedenen Zelltypen wie Endothelzellen, Keratinozyten und Kardiomyozyten die Cadherin-vermittelte-Adhäsion verstärkt (Vielmuth et al. 2023).

### 2.3.2.1 cAMP-vermittelte Regulation der Cadherin-vermittelten Haftung im Endothel

Die endotheliale Barriere wird vorrangig durch Tight Junctions und Adhärensjunktionen, die durch das Transmembranprotein VE-Cadherin interagieren, gebildet (Spindler, Schlegel, und Waschke 2010). Durch entzündliche Mediatoren wie z.B. Histamin wird diese Barriere beeinflusst und die Zellpermeabilität erhöht (Fukuhara et al. 2005). Dieses Phänomen zeigt sich hauptsächlich in postkapillären Venulen (Spindler et al. 2011). Es wurde gezeigt, dass durch eine intrazelluläre cAMP-Erhöhung die endotheliale Permeabilität sinkt und dass dies durch eine Verstärkung der VE-Cadherin-abhängigen Adhäsion geschieht (Fukuhara et al. 2005). Die cAMP-abhängige Barriereverstärkung erfolgt über den cAMP-Rezeptor Epac und die Rap1-vermittelte Aktivierung der Rho GTPase Rac1 (Vielmuth et al. 2023; Radeva und Waschke 2018).

### 2.3.2.2 cAMP-vermittelte Regulation der Cadherin-vermittelten Haftung in Kardiomyozyten

Kardiomyozyten sind über Glanzstreifen, die als Interzellulärkontakte Desmosomen, Adhärensjunktionen und Kommunikationskontakte enthalten, miteinander verbunden. Die mechanische Stabilisierung des Myokards wird durch die Cadherine Dsg2 und Dsc2 der Desmosomen und N-Cad, das das Transmembranprotein der Adhärensjunktionen bildet, hergestellt (Yeruva und Waschke 2023). Nach adrenerger Stimulation der beta-Rezeptoren wird das Herz durch den cAMP-Signalweg positiv inotrop und chronotrop beeinflusst, was dem Körper eine physiologische Anpassung auf Anstrengung ermöglicht (Iaizzo 2005). Inzwischen ist bekannt, dass durch einen cAMP-Anstieg auch der Zusammenhalt der Kardiomyozyten gestärkt wird (Schinner et al. 2017). Dies geschieht unter anderem durch eine Umverteilung von Dsg2 zusammen mit DP und PG an die Zellgrenzen (Schinner et al. 2017). Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch einen cAMP-Anstieg auch eine ultrastrukturelle Veränderung der Glanzstreifen erfolgt (Yeruva et al. 2020). Diese sogenannte „positive Adhäsotropie“ durch adrenerge Stimulation ist abhängig von einer PG-Phosphorylierung

durch die PKA. Dabei wurde die Phosphorylierungsstelle S665 an PG als entscheidend für die Wirkung von cAMP identifiziert (Schinner et al. 2017; Vielmuth et al. 2023).

### 2.3.2.3 cAMP-vermittelte Regulation der Cadherin-vermittelten Haftung in Keratinozyten

Es wurde bereits gezeigt, dass cAMP auch eine positive Wirkung auf die Adhäsion von Keratinozyten hat, was vor allem bei Pemphigus eine wichtige Rolle spielt. Eine cAMP-Erhöpfung kann die Blasenbildung nach PV-IgG-Gabe im Mausmodell verhindern und kann auch in vitro den Adhäsionsverlust verringern. Durch Forskolin-Inkubation kann die Dsg3-Depletion in Keratinozyten unter PV-IgG-Behandlung verhindert werden. Außerdem ist bekannt, dass eine cAMP-Erhöpfung zu einer verminderten p38MAPK-Aktivierung führt (Spindler et al. 2010). Der protektive Mechanismus ist dabei zumindest zum Teil abhängig von der cAMP-aktivierten PKA. Zusätzlich stellt der cAMP-Signalweg eine Art insuffizienten „Rettungsmechanismus“ dar, den die Zellen nach PV-IgG-Inkubation induzieren (Vielmuth et al. 2023). Allerdings ist bisher unbekannt, wie Antikörper, die extrazellulär an Dsg binden, in der Zelle eine Erhöhung von cAMP generieren können (Spindler et al. 2010).

## 2.4 Apremilast

Apremilast ist ein oral verabreichter Phosphodiesterase-4-Hemmer (PDE4), der bisher hauptsächlich in der Behandlung von mittelschwerer bis schwerer Psoriasis und Psoriasis-Arthritis eingesetzt wird (Schett et al. 2010; Keating 2017). Psoriasis ist eine chronisch-entzündliche Dermatose, die durch eine vom zellulären Immunsystem ausgelöste Hyperproliferation von Keratinozyten gekennzeichnet ist. Die Psoriasis-Arthritis wird durch einen Einstrom von Immunzellen und einer übermäßigen Fibroblastenproliferation in den Gelenken ausgelöst. (Schett et al. 2010). Bei der Behandlung beider Krankheitsformen zeigt

Apremilast gute Ergebnisse. Das Hautbild der Psoriasis-Patienten verbessert sich und der Juckreiz wird gemindert. In verschiedenen klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass ca. ein Drittel der Patienten, die zweimal täglich 30 mg Apremilast erhielten, innerhalb von 16 Wochen ein um 75 % verbesserten PASI-Wert (*engl. Psoriasis Area and Severitiy Index*) erzielten (Haber et al. 2016). Außerdem konnte auch in den schwer zu behandelnden Psoriasis-Formen der Nagel-, Kopfhaut- und Palmoplantar-Psoriasis eine Verbesserung des Juckreizes erreicht werden (Torres und Puig 2018). Insgesamt ist Apremilast gut verträglich und zeigt nur selten leichte Nebenwirkungen wie Diarrhoe, Übelkeit oder Infektionen der oberen Atemwege. Außerdem weist Apremilast keine immunsupprimierende Wirkung auf (Om, Hill, und Feldman 2016). Deshalb ist der Einsatz vor allem für Patienten, die an Lebererkrankungen leiden oder die aufgrund anderer Erkrankungen bereits ein erhöhtes Infektionsrisiko besitzen, geeignet (Torres und Puig 2018; Haber et al. 2016). Der Vorteil gegenüber Rolipram, einem anderen PDE4-Inhibitor, liegt darin, dass Apremilast nicht auf das zentrale Nervensystem wirkt und somit keine starke Müdigkeit oder Lethargie auslöst (Schett et al. 2010). Apremilast besitzt eine Plasmahalbwertszeit von 6-9 h und hat die maximale Plasmakonzentration 2,5 h nach Einnahme erreicht. Die absolute Bioverfügbarkeit beträgt ca. 73%. Die empfohlene Dosis zur Psoriasis-Therapie beträgt zweimal 30 mg oral täglich für Erwachsene (Keating 2017).

Die entzündungshemmende Wirkung von Apremilast beruht auf dem erhöhten cAMP-Spiegel aufgrund des verminderten Abbaus durch die PDE4. Über die PKA wird der Transkriptionsfaktor CREB phosphoryliert, was dafür sorgt, dass der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (*engl. nuclear factor  $\kappa$ B*) gehemmt wird. Dadurch wird in Makrophagen und Monozyten die Produktion des Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin 12 gesenkt. Auch in Keratinozyten wird so der TNF- $\alpha$ -Spiegel gesenkt. In T-Zellen werden durch Apremilast verschiedene Interleukine geringfügiger exprimiert. Darüber hinaus fördert die Phosphorylierung von CREB die Produktion des antiinflammatorischen Zytokins Interleukin 10. Diese o.g. Prozesse führen gemeinsam zu einer verminderten Entzündungsreaktion (Keating 2017).

---

## 2.5 Fragestellung

Die Pathogenese von PV ist bis heute nicht vollständig verstanden. Zwar weiß man inzwischen, dass verschiedene Signalmoleküle wie p38MAPK und desmosomale Proteine, wie z.B. PG selbst an der Entstehung der Krankheit beteiligt sind, allerdings ist noch nicht vollständig aufgeklärt, wie all diese Faktoren zusammenspielen, was die Entwicklung einer kurativen Therapieoption erschwert (Spindler et al. 2014; Spindler und Waschke 2018). Neben einer Eliminierung Desmoglein-spezifischer B-Zellen wird auch die Signaltransduktion als Ansatzpunkt für zukünftige Therapien diskutiert (van Beek, Zillikens, und Schmidt 2019). Hier könnte die protektive Wirkung von cAMP eine Rolle spielen. Der Mechanismus, wie cAMP vor dem Adhäsionsverlust in der PV-Pathogenese schützt, ist allerdings noch nicht vollständig geklärt und auch warum der intrazelluläre „Rettungsmechanismus“ nicht vor dem Adhäsionsverlust schützt, stellt eine weiter zu untersuchende Frage dar (Spindler et al. 2010). Der bisher zur cAMP-Erhöhung eingesetzte Mediator Forskolin kann trotz seiner positiv ionotropen Eigenschaften aufgrund seiner starken vasodilatorischen Wirkung nicht zur Behandlung von Herzinsuffizienz genutzt werden (Riecker und Arnim 1991). Dieses Problem würde theoretisch auch bei einer Behandlung von Pemphigus-Patienten mit Forskolin entstehen. Daher ist es wichtig, Arzneimittel, die ebenfalls eine cAMP-Erhöhung generieren und wenig Nebeneffekte zeigen, als mögliche Therapieoptionen in der Pemphigus-Behandlung zu untersuchen. Apremilast, das bereits zur Behandlung einer Dermatose zugelassen ist und dessen Wirkmechanismus ebenfalls über eine cAMP-Erhöhung funktioniert, stellt daher einen interessanten Ansatz dar (Torres und Puig 2018).

Im Rahmen dieser Arbeit soll der cAMP-abhängige Mechanismus von Apremilast, der zur Verbesserung der desmosomalen Haftung führt, genauer untersucht werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Testreagenzien und Antikörper

Für die verschiedenen Versuche wurden die Zellen mit unterschiedlichen Mediatoren behandelt, um eine cAMP-Erhöhung zu generieren. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die verwendeten Mediatoren und die eingesetzten Konzentrationen.

Tabelle 1: Verwendete Mediatoren

Mediator	Hersteller	Funktion	Konzentration
Apremilast	Cayman Chemical – Michigan, USA	Hemmer der Phosphodiesterase 4	100µM
Forskolin	Sigma – Aldrich, München	Aktivator der Adenylatcyclase	5 µM
Rolipram	Sigma – Aldrich, München	Hemmer der Phosphodiesterase 4	10µM
H89	Sigma – Aldrich, München	Hemmer der Proteinkinase A	10µM

Da diese Mediatoren alle in DMSO gelöst wurden, wurde DMSO als Kontrolle in der jeweils gleichen Konzentration eingesetzt.

Zur Detektion des jeweiligen Proteins wurden folgende Erstantikörper verwendet (Tabelle 2). An diese binden wiederum Zweitantikörper (Tabelle 3), die für die Immunfluoreszenz mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert sind. Für die Western Blot-Entwicklung sind sie mit einer Peroxidase, die die Reaktion in der Entwicklerlösung katalysiert, konjugiert. Sie wurden passend zur Spezies des Erstantikörper gewählt.

Tabelle 2: Verwendete Erstantikörper

Primärantikörper	Spezies	Hersteller	Verwendete Konzentrationen
Anti-Dsc2	Maus	proteintech	WB: 1:1000
Anti-Dsg3	Kaninchen	Biozol	IF: 1:100
Anti-Dsg3 clone 5G11	Maus	Invitrogen	IF: 1:100
Anti-Dsg1	Kaninchen	Abclonal	IF: 1:100
Anti-Desmoplakin	Kaninchen	Abclonal	WB: 1:1000
Anti-E-Cad	Maus	BD Transduction	WB: 1:1000
Anti-Epac1	Kaninchen	Abcam	WB: 1:1000
Anti-Plakoglobin	Maus	Progen	WB: 1:1000 IF: 1:100
Anti-GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase)	Maus	Santa Cruz	WB: 1:1000
Anti-GAPDH	Maus	Avivasysbio	WB: 1:1000
Anti-P38MAPK	Kaninchen	Cellsignaling	WB: 1:1000
Anti-p-P38MAPK (T180/Y182)	Kaninchen	Cellsignaling	WB: 1:1000
Anti-MAPKAP2	Kaninchen	Cellsignaling	WB: 1:1000
Anti-p-MAPKAP2 (Thr222)	Kaninchen	Cellsignaling	WB: 1:1000
Anti- $\alpha$ -Tubulin	Maus	Abcam	WB: 1:20000

WB: Western Blot, IF: Immunfluoreszenz

Tabelle 3: Verwendete Zweitantikörper

Zweitantikörper	Hersteller	Konjugation
Ziege-anti-Kaninchen	Dianova	Cy3, Cy2
Ziege-anti-Maus	Dianova	Cy3, Cy2
Ziege-anti-Kaninchen	Dianova	pox
Ziege-anti-Maus	Dianova	pox



### 3.2 Serumaufreinigung

Zur Induktion eines PV-Phänotyps, wurden zwei verschiedene IgG-Fractionen aus Serum von Pemphigus-Patienten, die von Prof. Dr. Dr. Enno Schmidt aus Lübeck zur Verfügung gestellt wurden, aufgereinigt (Tabelle 4). Die Serumspende wurde von der Ethikkommission der Universität Lübeck genehmigt (AZ12-178) und das Einverständnis der Patienten liegt vor. Als Kontrolle wurde IgG aus Serum von gesunden, freiwilligen Spendern isoliert.

Tabelle 4: Verwendete Seren

Serum	Dsg1 Titer	Dsg3 Titer
PV1-IgG	1207	3906
PV2-IgG	760	4711
Kontrollserum (c-IgG)	unbekannt	unbekannt

Die Aufreinigung der IgG-Fractionen erfolgte mittels Affinitätschromatografie. Dafür wurde eine Protein A Agarose-Säule in einem Aufreinigungsröhrchen mit 1 ml des jeweiligen Serums für 3 h am Rotator (See-Saw-Rocker SSL4, Cole Parmer, Illinois, USA) bei Raumtemperatur inkubiert mit dem Ziel, dass die enthaltenden Antikörper an die Säulenmatrix binden. Anschließend wurden die gebundenen Proteine durch Zugabe von Natriumcitrat und damit durch Absenken des pH-Wertes eluiert. Um wieder einen neutralen pH einzustellen wurde Natriumcarbonat hinzugegeben. Zuletzt wurde die IgG-Fraktion in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) wieder aufgenommen. Mittels Bicinchoninsäure-Assay wurde anschließend der Proteingehalt nachgewiesen. Das Verfahren wird unter 3.7 beschrieben. Die IgG-Fractionen wurden aliquotiert und bei -20 Grad aufbewahrt.

### 3.3 Zellkultur

Für die Versuche wurden die immortalisierten humanen Keratinozyten HaCaT (*engl.: human low calcium elevated temperature cells*), die primären humanen Keratinozyten NHEK (*engl.: normal human epidermal keratinocytes*) und Mauskeratinozyten (MEK) verwendet. HaCaT wurden in DMEM (*engl. Dulbecco's modified Eagle Medium, Life Technologies, ThermoFisher*) mit 10% FCS (*engl. fetal calf serum*) und 0,5% Penicillin/Streptomycin gehalten. NHEK wurden in epidermalen Keratinozytenmedium (CnT-0.7, Cellntec, Bern, Schweiz) unter geringen Calcium Gehalt (0,06 mM) gehalten, bis sie zu 80% konfluent gewachsen waren. Zum Ausdifferenzieren wurden sie dann für 24 h in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem Medium (1,8 mM) gehalten und anschließend die Versuche durchgeführt. Beide Zelllinien wurden in Inkubatoren bei gesättigter Luftfeuchtigkeit mit 5%  $\text{CO}_2$  – Gehalt bei 37 Grad gehalten. Die Mauskeratinozyten wuchsen in FAD Medium (Pan Biotech, Aidenbach) mit 0,05 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf einer Beschichtung aus Kollagen (Collagen I, rat tail, Life Technologies, ThermoFisher), bis sie zu 80% konfluent waren (Seltmann et al. 2013). 48 h vor dem Versuch wurde ein Mediumswechsel durchgeführt und dem frischen Medium  $\text{Ca}^{2+}$  in einer Konzentration von 1,2 mM zugesetzt, um eine Ausbildung Cadherin-vermittelter Zell-Zell-Kontakte zu induzieren. Mauskeratinozyten wurden im Inkubator mit einem  $\text{CO}_2$  – Gehalt von 5% und einer Temperatur von 35 Grad gehalten. Zur Zellteilung wurde das Medium der HaCaTs entfernt und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (0,05% EDTA in PBS) zugegeben. EDTA bildet mit  $\text{Ca}^{2+}$  Komplexe und schwächt so die  $\text{Ca}^{2+}$  -abhängigen Zellverbindungen. Anschließend wurde Trypsin (0,05% Trypsin, 0,02% EDTA in PBS) zugegeben, damit sich die Zellen vom Flaschenboden ablösen. Die Zellen wurden in Medium resuspendiert und dann in T75-Zellkulturflaschen oder in für den Versuch passende Mikrotiterplatten ausgesät. Für die Fortführung der NHEK- und MEK-Zelllinie wurden diese ausschließlich mit Trypsin inkubiert und nach Zentrifugation in Medium resuspendiert, denn da diese Zellen in Medium mit niedriger Calciumkonzentration gehalten werden, ist keine Chelatierung mit EDTA nötig. Die

Flasche bzw. Mikrotiterplatte wurde für MEKs mindestens 1 h davor mit Kollagen I (in 0,02M Essigsäure) beschichtet.

### 3.4 Keratinozytendissoziationsversuch

Zur Detektion der Stärke der interzellulären Haftung wurden Keratinozytendissoziationsversuche durchgeführt. Dabei wird dem Zellrasen durch Scheren mechanischer Stress zugefügt und die daraus resultierende Anzahl der Fragmente gezählt. Die Fragmentzahl korreliert negativ mit der interzellulären Haftung.

Die Zellen wurden wie unter 3.3 beschrieben in 24-Mikrotiterplatten gehalten und mit dem jeweiligen Mediator inkubiert. Für den Versuch wurde das Medium abgenommen, mit HBSS (*engl. Hanks' Balanced Salt solution*) gewaschen und anschließend mit Dispase II bei 37 Grad inkubiert, bis sich die Zellen als Einzelzellschicht lösten. Dispase II, eine Protease, bewirkt, dass Fibronectin und Kollagen Typ IV gespalten werden und sich so die Zellen vom Boden des Wells lösen. Die Haftung zwischen den Zellen wird dabei nicht beeinflusst (Stenn et al. 1989). Durch 5-10-maliges Scheren mit einer elektrischen Pipette wurde der Zellrasen mechanischem Stress ausgesetzt. Mittels Durchlichtmikroskop wurden die entstandenen Fragmente gezählt.

### 3.5 Immunfluoreszenzfärbung

Um die Lokalisation und Verteilung von Molekülen in der Zelle zu untersuchen, wurde die Methode der indirekten Immunfluoreszenz verwendet. Dabei werden für das jeweilige Antigen spezifische Erstantikörper verwendet, an welche in einem zweiten Schritt der zu dem ersten

Antikörper passende fluoreszierende Zweitantikörper bindet. Hierdurch wird die Fluoreszenzwirkung verstärkt (Wheatley und Wang 1998).

Die Zellen wurden in Mikrotiterplatten auf Glasplättchen mit einem Durchmesser von 12 mm bis zur Konfluenz gehalten und dann je nach Versuchsbedingung für den angegebenen Zeitraum inkubiert. Im Anschluss wurde zunächst das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und durch Behandlung mit 2% Paraformaldehyd für 10 min fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen durch fünfminütige Inkubation mit 0,1% Triton-X-100 permeabilisiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Deckgläschen auf Objektträger umgesetzt. Um unspezifische Antigenbindungsstellen zu blockieren wurde der Zellrasen mit bovinen Serumalbumin und normalen Ziegen Serum (3% BSA/1% NGS in PBS) für 30 min bei Raumtemperatur vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen für mindestens 12 h in einer dunklen, feuchten Kammer bei 4 Grad mit dem Primärantikörper inkubiert. Dieser wurde in einer Verdünnung 1:100 in PBS verwendet.

Nachfolgend wurden die ungebundenen Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt, und es erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:600 für ca. 2 h bei Raumtemperatur. Zur Färbung der Kerne wurde anschließend Diamidinophenylindol (1 mg/ml) für 10 min zugegeben. Nachdem die Deckgläschen mit PBS gewaschen wurden, wurden diese mit NPG (1% n-Propylgallat und 60% Glycerin in PBS) eingedeckt, um die Fluoreszenz länger zu erhalten (Giloh und Sedat 1982). Mittels Konfokaler Mikroskopie (Leica, Mannheim) wurden repräsentative Zellareale unter Verwendung eines 64x Objektivs aufgenommen.

### 3.6 cAMP-Immunoassay

Zur Bestimmung der cAMP-Konzentration wurde ein cAMP Enzyme Immunoassay Kit (CA200, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri) laut Herstellerprotokoll verwendet. Hierbei wurden die

konfluenten und entsprechend inkubierten Zellen in einer 12-Lochplatte durch Zugabe von 0,1M HCl-Säure lysiert, in ein Eppendorfgefäß übertragen und anschließend bei 600 rcf für 5 min zentrifugiert. Danach wurde ausschließlich mit dem Überstand weitergearbeitet. Dieser wurde in eine spezielle Multipipettierplatte überführt, die mit „Goat-anti-rabbit-IgG“ beschichtet ist. Danach wurde cAMP, das mit dem Enzym Alkalische Phosphatase (AP) konjugiert wurde, hinzugefügt. Nun konkurrierten die cAMP-Moleküle aus dem Überstand und die AP-konjugierten um die Bindungsstelle am Antikörper. Je mehr cAMP in der Probe vorhanden ist, desto weniger kann das enzymgekoppelte cAMP binden. Nach diesem Schritt wurde durch dreimaliges Waschen ungebundenes cAMP entfernt. Durch Zugabe des Substrats p-Nitrophenylphosphat, das durch die alkalische Phosphatase zu gelblichen p-Nitrophenol umgesetzt wird, startete die Farbreaktion. Anschließend wurde die Reaktion durch eine Lösung aus Natriumphosphat beendet und anschließend direkt in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 405 nm und 580 nm ausgelesen. Anhand einer parallel generierten Standardkurve konnte dann der cAMP-Spiegel in pmol/ml bestimmt werden.

### 3.7 Proteinbestimmung

Um die Proteinmenge in Lysaten für die Western Blot - Analyse zu bestimmen, wurde ein Bicinchoninsäure-Assay (ThermoFisher) verwendet. Dabei reduzieren die in der Probe enthaltenen Proteine  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$ , und anschließend bilden die Kupferionen mit BCA (Bicinchoninsäure) einen Komplex, der sich violett verfärbt. Dieser absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 562 nm. Die Menge an den Chelatkomplexen ist proportional zur Proteinmenge, wodurch sich diese durch die Stärke der Verfärbung bestimmen lässt (Smith et al. 1985).

Dafür wurden in einer Mikrotiterplatte, neben einer Standardlösung aus Serumalbumin mit bekannter Proteinkonzentration von 20-2000  $\mu\text{g}$ , die Proben in einer Verdünnung von 1:5

aufgetragen. Nachdem die BCA-Lösung zugegeben wurde, wurde die Platte für 30 min bei 37 Grad inkubiert und anschließend die Absorption bei 562 nm in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen. Durch Vergleich mit der Standardkurve konnte die Proteinkonzentration der Proben bestimmt werden.

### 3.8 Gelelektrophorese und Western Blot – Analyse

Um die Menge bestimmter Proteine aus einem Proteingemisch nachzuweisen, eignet sich besonders die Methode der Gelelektrophorese mit anschließender Western Blot - Analyse. Dabei werden die Proteine zunächst in einem Polyacrylamidgel in einem elektrischen Feld aufgetrennt und können anschließend durch Übertragung auf eine Membran über Antikörperbindung nachgewiesen werden. Durch das Gitternetz gelangen größere Proteine langsamer als kleinere. So trennen sich die Proteine, sobald das Gel an ein elektrisches Feld gekoppelt wird, ihrer Größe und Ladung nach auf.

Am verbreitetsten ist das Verfahren der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Gelelektrophorese). Dabei werden die Proteine ausschließlich nach ihrer Größe aufgetrennt, denn SDS sorgt für eine einheitliche negative Ladung (Reinard 2018).

Die Zellen wurden bis zur Konfluenz in 12er Mikrotiterplatten gehalten und jeweils je nach Versuchsbedingung inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen, einmal mit kalten PBS gewaschen und danach SDS Lysepuffer (25 mmol/l HEPES, 2 mmol/l EDTA, 25 mmol/l NaF and 1% SDS), 1:1 gemischt mit einem Proteaseinhibitormix (1 Tbl. in 50 ml Lysepuffer, Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Mannheim), zugegeben. Nach Aufnahme des Zellgemisches in ein Reaktionsgefäß wurde dieses 10 mal sonifiziert (Sonofier 250, Branson Ultrasonics, USA), um die Zellmembran aufzuspalten und die Zellinhalte freizulegen. Nach erfolgter Proteinkonzentrationbestimmung, wie in 3.7 beschrieben, wurden 15-25 µg Protein 1:3 mit 3-facher Lämmilösung (2,27 g Tris, 6 g SDS,

37,8 g Glycerol, 0,02 g Bromphenolblau in 100 ml Wasser) und 0,5 mol/l Dithiothreitol (DTT) versetzt und anschließend für 5 min bei 95 Grad erhitzt. DTT sorgt für eine Spaltung der Disulfidbrücken, wobei durch die Erhitzung die Proteine denaturieren (Reinard 2018). Durch die Zugabe der Lämmliösung kann die Laufstrecke der Proteine durch die Farbfront kontrolliert werden. Außerdem sorgt das Glycerin dafür, dass die Probe auf den Grund der Tasche sinkt (Laemmli 1970).

Das Polyacrylamidgel wurde zwischen 2 Glasplatten mit einem Abstand von 1mm gegossen, die vorher mit Ethanol gereinigt wurden. Zunächst wurde ein Trenngel (2,02 ml dest. Wasser, 1,67 ml Polyacrylamid (30%), 1,25 ml Tris Puffer, 50 µl SDS (10%), 22,5 µl APS (10%, Ammoniumpersulfat), 11,25 µl TEMED (10%, Tetramethylethylendiamin)) hergestellt und nach dessen Polymerisation mit einem Sammelgel (1,55 ml dest. Wasser, 0,3 ml Polyacrylamid, 0,65 ml Tris-Puffer, 25 µl SDS, 11,25 µl APS, 5,62, µl TEMED) überschichtet, welches durch Einlegen eines Plastikkamms Taschen für die spätere Probenauftragung bildet. Die Aufteilung in Trenn- und Sammelgel ermöglicht ein gleichzeitiges Loslaufen aller Proben im elektrischen Feld und damit eine einheitliche Auftrennung der Proben.

Die Gele wurden in ein vertikales Elektrophorese-Gelsystem (Biorad, München) gesetzt. Dieses Kammersystem wurde mit Elektrophoresepuffer (1 M Glycin, 124 mM Tris/HCl 17,3 mM SDS) gefüllt und anschließend die Proben in die Geltaschen gegeben. Um ein elektrisches Feld zu generieren, wurde für das Sammelgel eine Spannung von 80 V angelegt, die zur Auftrennung im Trenngel auf 120 V erhöht wurde.

Nach erfolgter Auftrennung wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Hierfür wurden das Gel und die Membran zwischen zwei Filterpapiere und zwei Polster gelegt und in eine Mini-Transblot- Kammer (BioRad, München) eingebracht. Diese wurde mit Transfer-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol 3,5 mM SDS) gefüllt. An die Elektroden der Kammer wurde für 90 Minuten eine konstante Stromstärke von 350 mA gelegt. Dadurch wandern die Proteine entlang des elektrischen Felds vom Gel auf die Membran. Anschließend wurde die Membran für 2 h in TBST (*engl. Tris-buffered saline with Tween20*)

mit 5% Milchpulver gegeben, wodurch unspezifische, freie Bindungsstellen blockiert wurden. Zuletzt wurde über Nacht die Membran mit dem entsprechenden Erstantikörper bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Membran nach dreimaligem Waschen mit TBST zunächst für 1 h bei Raumtemperatur in die Zweitantikörperlösung gegeben. Nach dreimaligem Waschen in TBST wurde sie für eine Minute in eine Entwicklerlösung aus ECL 1 (500µl Lumminol, 220µl PCA, 5ml 1M Tris-ECL-Lösung, auf 50ml mit H<sub>2</sub>O gefüllt) und ECL 2 (32µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 5ml 1M Tris-ECL-Lösung, auf 50ml mit H<sub>2</sub>O gefüllt) gelegt. Dabei macht man sich das Prinzip der ECL (*engl. Enhanced chemiluminescence*)-Methode zu Nutze (Dodeigne, Thunus, und Lejeune 2000). Luminol wurde in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid durch die an den Zweitantikörper konjugierte Peroxidase in einen angeregten Zustand versetzt und gab beim Zerfallen in den Grundzustand blaues Licht ab. Dieses wurde dann in einem FluorchemE-Entwickler (Protein Simple, San Jose, USA) sichtbar gemacht.

Um in der Western Blot - Analyse zwischen einer löslichen und unlöslichen, zytoskelettal gebundenen Fraktion unterscheiden zu können, wurde in manchen Versuchen statt SDS-Lysaten Triton-Lysate angefertigt. Dafür wurde auf die konfluenten Zellen nach Behandlung mit den jeweiligen Versuchsbedingungen Triton-X-100 Lysepuffer (0,5% Triton-X-100, 50 mM MES, 25mM EGTA, 5mM MgCl<sub>2</sub>) mit Proteaseinhibitoren (0,001 mg/ml Aprotinin und Pepstatin, 0,002 mg/ml Leupeptin und 0,1 mM PMSF) und Phosphataseinhibitoren (1 Tbl. in 10 ml Lysepuffer, Phosstop Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Mannheim) gegeben und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Überführen der Zellsuspension in ein Eppendorfgesäß wurden die Triton-X-lösliche und -unlösliche Fraktion durch Zentrifugieren für 5 min bei 4 Grad und 8000 rpm voneinander getrennt. Der lösliche Überstand, der den nicht-zytoskelettal-gebundenen Anteil enthält, wurde in ein neues Reaktionsgefäß abgenommen, und das Sediment wurde in SDS Lysepuffer mit Proteaseinhibitor resuspendiert und



sonifiziert. Gelelektrophorese und Western Blot - Analyse wurden dann wie bereits beschrieben durchgeführt.

### 3.9 Detektion von phosphorylierten Proteinen mittels Phos-Tags

Ebenso wie bei den vorherigen Verfahren wurden die Zellen in 12er Mikrotiterplatten bis zur Konfluenz gehalten und anschließend mit Lämmli-Puffer, dem Proteaseinhibitoren (1 µg/ml Aprotinin, Pepstatin, 2 µg/ml Leupopeptin, und 0,1 mM PMSF), Phosphataseinhibitor (1 Tabl. in 10 ml Puffer) und 50 mmol/l DTT zugegeben wurden, lysiert, sonifiziert und abschließend bei 95 Grad erhitzt.

Da es bei dieser Proteinauftrennung vor allem um die Bestimmung der phosphorylierten Proteine geht, wird ein spezielles Trenngel verwendet. Das Prinzip beruht darauf, dass durch Zugabe von 30 µl Phos-Tag-Acrylamid (Wako Chemicals Europe GmbH, Neuss) und Mangan-Metallionen (30 µl Manganchlorid) Phosphobindungsstellen entstehen, an die die phosphorylierten Proteine binden. Dadurch laufen sie langsamer im Gel als die unphosphorylierte Form und erscheinen deshalb weiter oben auf der Membran. Als Kontrolle wurde ein Gel verwendet, in dem statt Phos-Tag Acrylamid und Manganchlorid 60 µl Wasser zugegeben wurde.

Da durch die Blaufärbung des Lämmli-Puffers keine Proteinmengen-Bestimmung durch BCA möglich ist, konnte nicht gewährleistet werden, dass gleich viel Protein pro Versuchsbedingung geladen wurde. Da allerdings hauptsächlich die Tatsache, ob eine Phosphorylierung vorliegt oder nicht von Bedeutung ist, war dieses Vorgehen für diesen Versuch akzeptabel.

Die Gelelektrophorese wurde wie bei der SDS-Page durchgeführt. Vor der Übertragung wurden die Gele zweimal mit Transfer-Puffer, in dem 10 mmol/l EDTA gelöst wurde, für je 10

Minuten gewaschen, um die  $Mn^{2+}$  Ionen zu entfernen und anschließend noch einmal in reinem Blotpuffer erneut 10 Minuten gewaschen. Danach erfolgte die Übertragung auf eine PVDF-Membran, die durch Eintauchen in Methanol aktiviert wurde.

Das weitere Vorgehen entsprach dem der bereits beschriebenen der Western Blot - Analyse.

### 3.10 Programme und Statistik

Zur Auswertung des unter 3.6 beschriebenen cAMP-Versuchsansatzes wurde Origin (OriginLab, Northhampton, Massachusetts), ein Daten- und Analyseprogramm, verwendet. Die Datenauswertung und statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien). Für mehr als zwei Gruppen wurde ein einfaktorieller ANOVA-Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Sobald eine zusätzliche Unterscheidung der Gruppen in zwei Faktoren gegeben war, wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse durchgeführt, z.B. für die Untersuchung der Wildtyp- und Knockout-Zellen. Für nur zwei Versuchsgruppen wurde ein zweiseitiger ungepaarter t-Test verwendet. Als Signifikanzwert wurde  $p < 0,05$  definiert. Die Fehlerbalken in den Balkendiagrammen repräsentieren den Standardfehler (SEM; *engl. Standard error of the mean*).

---

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Apremilast ist protektiv gegen PV-IgG-induzierten Zellhaftungsverlust in primären Keratinozyten

Es ist bekannt, dass eine cAMP-Erhöpfung die Zell-Zell-Haftung in verschiedenen Zelltypen verbessert (Vielmuth et al. 2023). Darüber hinaus konnte bereits gezeigt werden, dass eine cAMP-Erhöpfung durch Forskolin und Rolipram (F/R) protektiv bei Pemphigus wirkt (Spindler et al. 2010). So wurde unter Anwendung dieser Mediatoren der Adhäsionsverlust nach PV-IgG-Gabe verringert und die Dsg3-Depletion verhindert. F/R kann jedoch aufgrund der kardiovaskulären Nebenwirkungen, die es beim Patienten auslösen würde, nicht als Medikament eingesetzt werden (Spindler et al. 2010). Apremilast ist wie Rolipram ein Phosphodiesterase-4-Hemmer, der bereits erfolgreich zur Behandlung von Psoriasis, einer Autoimmunerkrankung der Haut, eingesetzt wird (Wei, Friedman, und Prussick 2020; Schett et al. 2010). Daher wurde untersucht, ob Apremilast als Medikament in der Pemphigus-Therapie ebenfalls eine Rolle spielen könnte.

Wenn im Folgenden von PV-IgG zu lesen ist, ist in der Regel PV1-IgG (IgG aus dem PV-Serum 1) gemeint, sofern nicht anders gekennzeichnet.

#### 4.1.1 Apremilast bewirkt eine cAMP-Erhöpfung in Keratinozyten

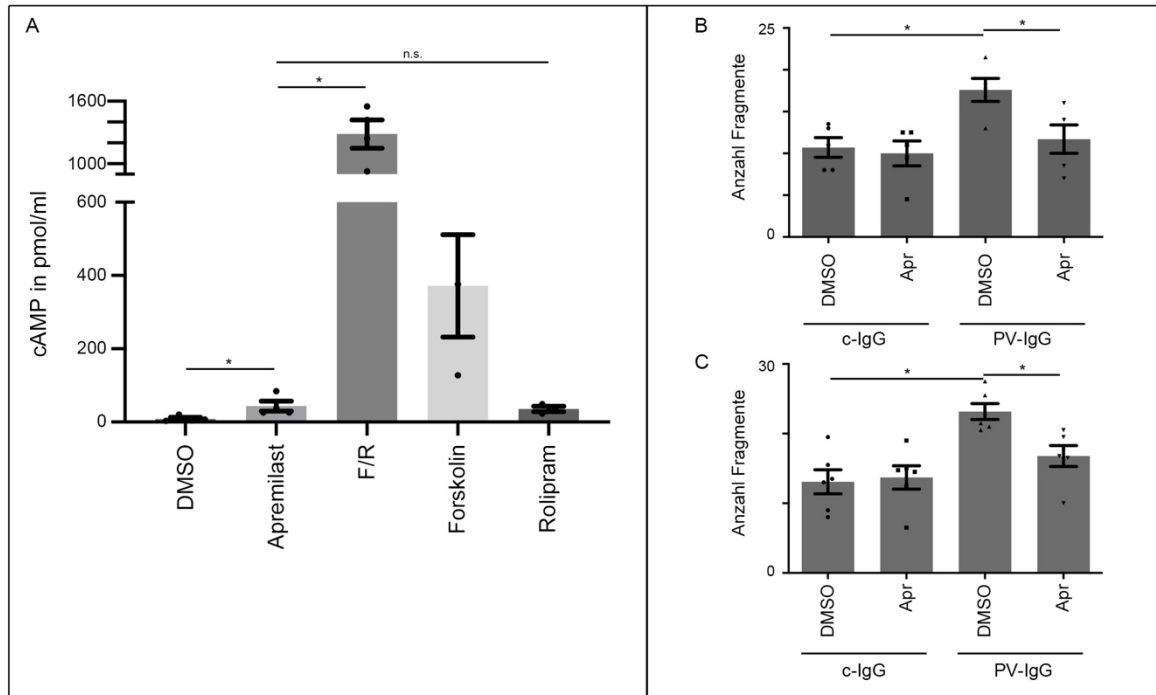
Zunächst wurde untersucht, ob Apremilast in Keratinozyten ebenso wie F/R eine cAMP-Erhöpfung generieren kann. Es wurden dabei auch Forskolin und Rolipram zum Vergleich getrennt voneinander untersucht. Dafür wurden Keratinozyten mit den jeweiligen Mediatoren für 1 bzw. 2 h inkubiert und anschließend ein cAMP – Elisa durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass nach Apremilast-Behandlung  $49,2 \pm 17,9$  pmol/ml cAMP gebildet wurde und Apremilast damit eine signifikante cAMP-Erhöpfung gegenüber der Kontrollbedingung generierte. Die Kombination F/R hingegen verursachte einen drastisch erhöhten cAMP-

Spiegel. Betrachtete man die Mediatoren getrennt voneinander, wurde erkennbar, dass durch den Adenylatzyklaseaktivator Forskolin ein vielfach höherer cAMP-Anstieg als durch Rolipram generiert wurde, welches wie Apremilast ein PDE-4-Hemmer darstellt (Abb. 3 A).

Dieses Ergebnis zeigt, dass Apremilast zwar durch Hemmung des Abbaus von cAMP dessen Spiegel in den Zellen erhöht, allerdings im Gegensatz zu F/R um ein Vielfaches geringer (Spindler et al. 2010). Deshalb wurde im nächsten Schritt überprüft, ob die erreichte cAMP-Erhöpfung in Keratinozyten durch Apremilast ausreicht, um die negativen Effekte von Pemphigus-Antikörpern auf die Zellhaftung zu verhindern.

### **4.1.2 Apremilast vermindert den durch PV-IgG-Inkubation hervorgerufenen Adhäsionsverlust**

Da gezeigt werden konnte, dass Apremilast zu einer cAMP-Erhöpfung in Keratinozyten führt, wurde als nächstes untersucht, ob Apremilast einen funktionellen Effekt auf die Zell-Zell-Haftung im Keratinozytendissoziationsversuch hat. Dafür wurden NHEK- und HaCaT-Zellen für 24 h mit PV-IgG und c-IgG inkubiert. Um die Wirksamkeit von Apremilast zu testen, wurde Apremilast bzw. dessen Trägersubstanz DMSO mit einer Stunde Vorinkubation hinzugegeben.



**Abb. 3** *Apremilast ist protektiv gegen den PV-IgG-vermittelten Haftungsverlust*

(A) Die cAMP-Spiegel von DMSO und Apremilast wurden jeweils nach zweistündiger Inkubation gemessen. Ein deutlicher Anstieg (254fach $\pm$ 110) war nach einstündiger Inkubation durch F/R nachweisbar. Rolipram als PDE-4 Hemmer generierte einen ähnlich hohen cAMP-Messwert wie Apremilast.

( $P < 0,05$ ;  $n = 3-4$ ; Einfaktorielle Varianzanalyse; Säulen zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM); modifiziert nach Sigmund et al. 2023)

(B) Die Zugabe von Apremilast konnte den durch PV-IgG-induzierten Haftungsverlust (Fragmentzahl 17,6 $\pm$ 1,4) von HaCaT-Zellen reduzieren (11,3 $\pm$ 1,5). (C) Parallel dazu zeigte eine Apremilast-Inkubation in NHEK-Zellen den selben Effekt. Die Fragmentzahl erhöhte sich im Vergleich zu der Kontrolle (13,9 $\pm$ 2,0 bzw. 14,5 $\pm$ 2,5) durch PV-IgG-Inkubation auf 24 $\pm$ 1,4. Durch Apremilast-Zugabe konnte sie auf 16,4 $\pm$ 1,5 reduziert werden.

( $P < 0,05$ ;  $n = 5-6$ ; Einfaktorielle Varianzanalyse; Säulen zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM); modifiziert nach Sigmund et al. 2023)

Im Vergleich zu c-IgG konnte in HaCaT-Zellen nach PV-IgG-Inkubation ein signifikanter Haftungsverlust festgestellt werden. Apremilast verbesserte die durch PV-IgG kompromittierte Zellhaftung signifikant (Abb. 3 B). Da HaCaT-Zellen wenig Dsg1 exprimieren, dies jedoch ein zentrales Autoantigen bei PV darstellt, wurde das Experiment mit NHEK-Zellen wiederholt. Das Ergebnis war in NHEK-Zellen vergleichbar zu dem in HaCaT-Zellen (Abb. 3 C). Eine kombinierte Inkubation von PV-IgG zusammen mit Apremilast bewirkte zusammenfassend in beiden Zelllinien eine signifikant geringere Fragmentzahl. Deshalb lässt sich folgern, dass

auch der geringere Anstieg des cAMP-Spiegels durch Apremilast im Vergleich zu F/R ausreicht, um den Haftungsverlust nach PV-IgG-Zugabe zu reduzieren (Sigmund et al. 2023).

## **4.2 Untersuchung des protektiven Mechanismus von Apremilast**

### **4.2.1 Apremilast verhindert die PV-IgG-induzierte Depletion von Dsg1 und Dsg3 nicht**

Um die morphologischen Veränderungen nach PV-IgG-Inkubation zu untersuchen, wurde mit HaCaT- und NHEK-Zellen eine Immunfluoreszenzfärbung gegen Dsg3 bzw. Dsg1 durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen wieder unter den gleichen Bedingungen inkubiert wie zuvor für den Keratinozytendissoziationsversuch.

Zunächst wurde untersucht, ob Apremilast die Dsg3-Depletion in HaCaT-Zellen verhindern kann. Nach Inkubation mit PV-IgG zeigte sich eine deutliche Fragmentierung der Dsg3 Färbung, während unter Kontrollbedingungen Dsg3 linear an der Zellgrenze verteilt war (Abb. 4 A). Die Zugabe von Apremilast zeigte keine Verbesserung der Fragmentierung der Dsg3-Färbung.

Um die Wirkung von Apremilast auf die Dsg1-Verteilung zu überprüfen, wurde in einem zweiten Schritt die Immunfluoreszenzfärbung mit NHEK-Zellen wiederholt, welche im Gegensatz zu HaCaT-Zellen viel Dsg1 exprimieren. Die Inkubation erfolgte wie zuvor. Zusätzlich wurde in den NHEK-Zellen erneut Dsg3 untersucht.

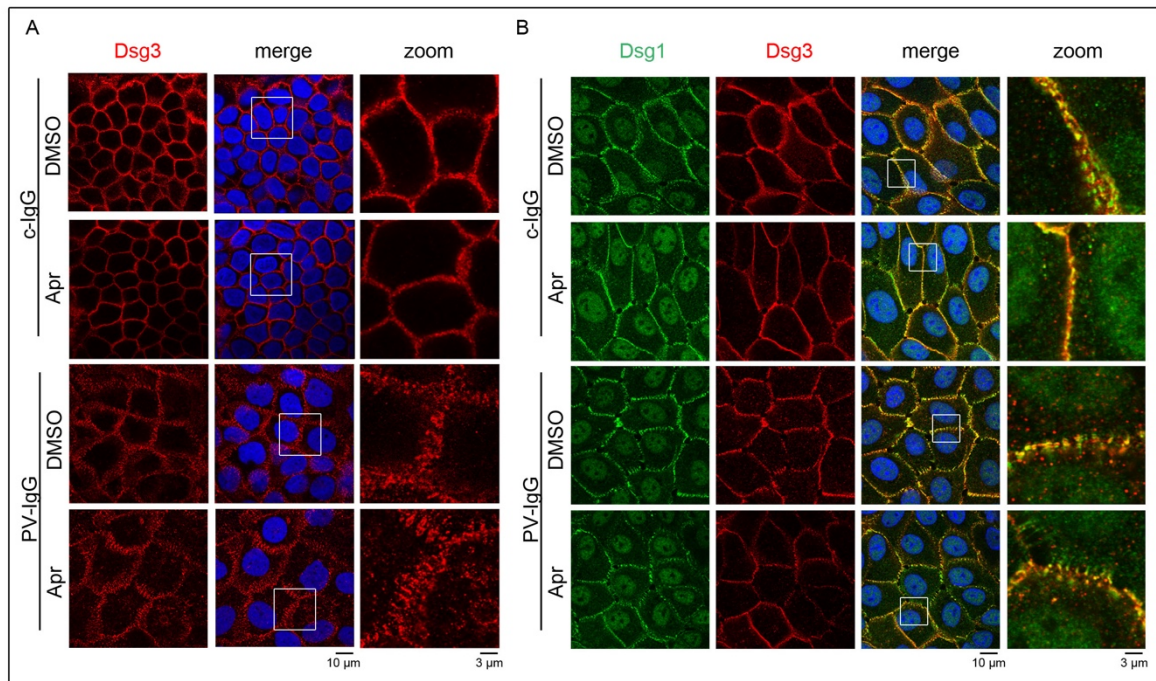


Abb. 4 *Apremilast verbessert die PV-IgG-induzierte Depletion von Dsg1 und Dsg3 nicht*

(A) Die Immunfluoreszenzfärbungen zeigten nach PV-IgG-Inkubation eine deutliche Fragmentierung der Dsg3 Färbung in HaCaT-Zellen. (n = 4)

(B) Auch in NHEK-Zellen war die Dsg1- und Dsg3-Depletion erkennbar.

In beiden Zelllinien wurde der Effekt durch Apremilastzugabe nicht verbessert.

(n = 5; modifiziert nach Sigmund et al. 2023)

Unter Kontrollbedingungen konnte eine lineare Verteilung von Dsg1 und Dsg3 entlang der Zellmembran beobachtet werden. Die Desmoglein-Färbung nach Inkubation mit PV-IgG zeigte eine Fragmentierung der Dsg1- und Dsg-3 Färbung sowie eine Depletion der Moleküle von der Zellgrenze. Diese morphologischen Veränderungen konnten weder für Dsg3 noch für Dsg1 durch eine zusätzliche Inkubation mit Apremilast verbessert werden (Abb. 4 B).

Daraus lässt sich schließen, dass die durch PV-IgG hervorgerufene Depletion von Desmogleinen durch Apremilast nicht verhindert werden kann (Sigmund et al. 2023).

#### 4.2.2 Apremilast verhindert die PV-IgG-induzierte Phosphorylierung von p38MAPK nicht

Da Apremilast keinen Effekt auf die durch Autoantikörper induzierte Dsg-Depletion hatte, stellte sich die Frage, über welche zellulären Abläufe Apremilast protektiv wirkt. Die p38MAPK hat eine zentrale Bedeutung in der Pemphigus-Pathogenese (Spindler und Waschke 2018). Sie ist Teil des Mechanismus, der nach PV-IgG-Zugabe zur Depletion von Dsg3, aber auch zur Veränderung der Keratinfilamente führt (Jolly et al. 2010; Schlögl et al. 2018). Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass die Hemmung von p38MAPK die Blasenbildung im *ex-vivo*-Hautmodell verhindert (Egu et al. 2017). Darüber hinaus wurde beobachtet, dass cAMP in der Lage ist, die durch PV-IgG-induzierte Phosphorylierung von p38MAPK zu blockieren (Spindler et al. 2010).

Um die Rolle der p38MAPK in Hinblick auf die Stimulation mit Apremilast zu untersuchen, wurden Triton-Assays mit NHEK-Zellen durchgeführt. Zunächst wurde analysiert, zu welchem Zeitpunkt in der Pemphigus-Pathogenese die stärkste Phosphorylierung von p38MAPK erreicht ist. Außerdem wurde die MAPKAP2, eine nachgeschaltete und durch p38MAPK aktivierte Kinase, untersucht. Es zeigte sich die konstanteste Wirkung nach 15-minütiger Inkubation, und deshalb wurde dieser Zeitraum für die nachfolgenden Versuche gewählt (Abb. 5 A).

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob Apremilast die Phosphorylierung von p38MAPK vermindert. Dafür wurden Western-Blot-Analysen gegen die phosphorylierte Form der p38MAPK durchgeführt und dabei NHEK-Lysate verwendet, wobei die Zellen zuvor jeweils mit PV-IgG und Apremilast inkubiert wurden. Hier wurde ausschließlich die Triton-lösliche Fraktion dargestellt, da aus vorausgegangenen Studien bekannt ist, dass die PV-IgG-vermittelte Phosphorylierung von p38MAPK v.a. hier auftritt (Walter et al. 2017). Die Kontrolle mit DP, als Komponente der unlöslichen Fraktion, zeigte, dass die Auftrennung in lösliche und unlösliche Fraktion erfolgreich war.



Durch PV-IgG zeigte sich erneut ein Anstieg der Phosphorylierung der p38MAPK und auch der MAPKAP2. Die Menge an p-MAPKAP2 und p-p38MAPK wurde allerdings durch Apremilastzugabe nicht reduziert (Abb. 5 B). Dieses Ergebnis veranschaulicht, dass der durch Apremilast generierte cAMP-Anstieg keinen Einfluss auf die p38MAPK-vermittelte Signaltransduktion hat.

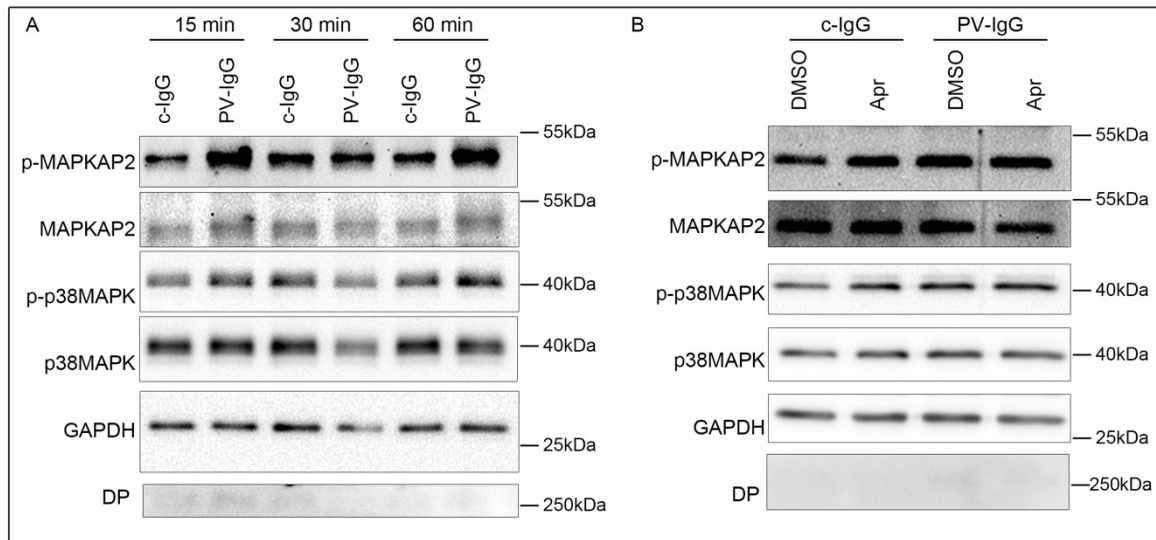


Abb. 5 Phosphorylierung der MAPKAP2 und p38MAPK nach Apremilastzugabe

(A) Da eine eindeutige Phosphorylierung der MAPKAP2 und auch der p38MAPK durch PV-IgG nach 15 min sichtbar war, wurde dieser Zeitraum für den nachfolgenden Versuch genutzt. (n = 2-3)

(B) Die durch PV-IgG induzierte Erhöhung von p-MAPKAP und p-p38MAPK wurde durch Apremilastzugabe nicht vermindert. (n = 4)

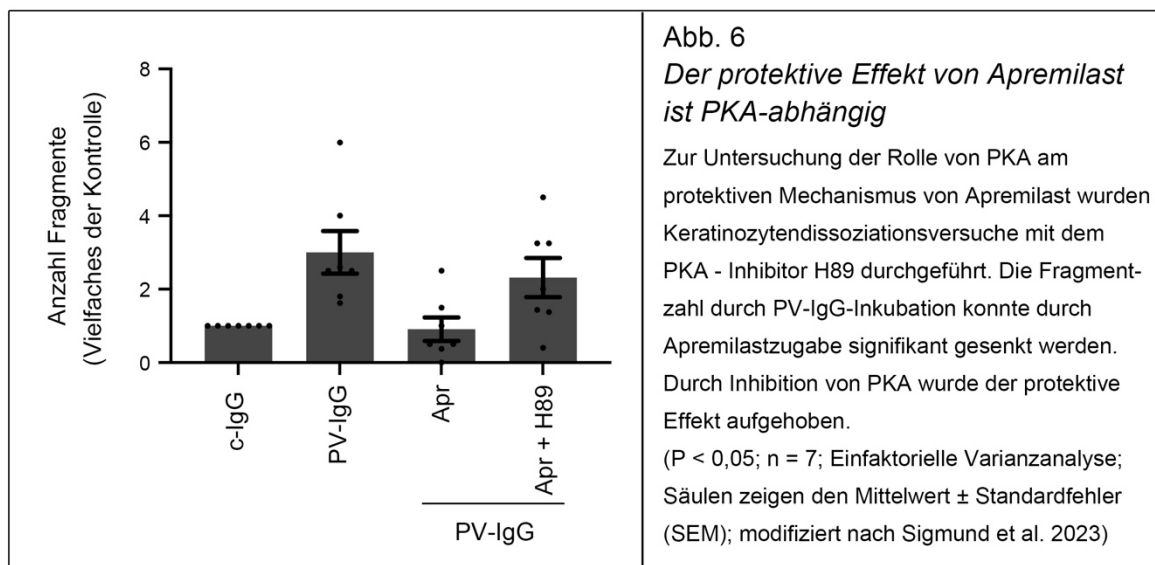
### 4.3 Untersuchung der cAMP-Effektoren PKA und Epac1

Da Apremilast weder durch Einwirken auf die Dsg-Depletion noch durch die Verminderung der p38MAPK-Phosphorylierung protektiv wirkt, wurden als nächstes die cAMP-Effektoren PKA und Epac1 untersucht. Die PKA ist das bekannteste intrazelluläre cAMP-Effektor-Molekül. Beispielsweise spielt sie eine wichtige Rolle in der Tumorphagenese (Caretta und Mucignat-Caretta 2011), aber auch bei der Regulierung von Zelladhäsion (Gauthier et al. 2005). Ein weiterer cAMP-Effektor ist Epac1. Epac1 ist ebenfalls für die Zelladhäsion und Zelldifferenzierung von Bedeutung (Cheng et al. 2008; Rangarajan et al. 2003).

### 4.3.1 Inhibition von PKA verhindert den protektiven Effekt von Apremilast

Es wurde bereits nachgewiesen, dass PKA an der durch cAMP-vermittelten Wiederherstellung des durch PV-IgG hervorgerufenen Haftungsverlust beteiligt ist (Spindler et al. 2010). Außerdem wurde vor kurzem gezeigt, dass die durch cAMP-vermittelte Adhäsionsverstärkung in Kardiomyozyten ebenfalls von einer PKA-vermittelten PG-Phosphorylierung an S665A abhängig ist (Schinner et al. 2017). Daher wurde als nächstes die Rolle der PKA im protektiven Mechanismus von Apremilast untersucht.

Dafür wurden HaCaT-Keratinocyten bis zur Konfluenz kultiviert. Es erfolgte eine einstündige Vorinkubation mit Apremilast, DMSO und dem PKA-Inhibitor H89. Anschließend wurden die Zellen für 3 h mit c-IgG und PV-IgG inkubiert. Darauf folgte der Keratinozytendissoziationsversuch.



Die Fragmentzahl nach alleiniger Inkubation mit PV-IgG stieg gegenüber c-IgG an. Bei gleichzeitiger Inkubation von PV-IgG und Apremilast sank die Fragmentzahl dagegen signifikant. Dieser protektive Effekt wurde durch Inkubation mit H89 blockiert (Abb. 6) (Sigmund et al. 2023).

Dieses Ergebnis zeigt, dass PKA auch am protektiven Mechanismus von Apremilast mitbeteiligt ist.

### 4.3.2 Rolle von Epac bei der protektiven Wirkung von cAMP

Die vorherigen Ergebnisse zeigten, dass PKA vermutlich nicht alleinig am protektiven Mechanismus von Apremilast beteiligt sein kann, da die Fragmentzahl nach PKA-Hemmung trotzdem geringer war als die nach alleiniger PV-IgG-Inkubation. Es ist bekannt, dass auch durch Epac1 die Zelladhäsion moduliert werden kann (Cheng et al. 2008). Im Endothel wurde gezeigt, dass die Barriere-Stabilisierung auch unabhängig von PKA über den Epac/Rap1 Signalweg möglich ist (Fukuhara et al. 2005). Deshalb wurde als nächstes untersucht, ob Epac1 zur cAMP-vermittelten Adhäsionsverbesserung in Keratinozyten beiträgt.

#### 4.3.2.1 Veränderte Expression desmosomaler Proteine durch Epac1-KO

Zunächst wurden Epac1-Wildtyp (WT)- und Epac1-Knockout (KO)-Mauskeratinozyten mittels Western-Blot-Analyse in Bezug auf die Expression desmosomaler Proteine untersucht. Dabei wurde der KO von Epac1 mittels fehlender Proteinexpression von Epac1 nachgewiesen. Interessanterweise zeigte sich eine Überexpression verschiedener desmosomaler Proteine wie Dsg1, Dsg3 und DP in den KO-Zellen. Andere Proteine, wie beispielsweise PG, wurden unabhängig von der Zelllinie in gleichen Mengen gebildet (Abb. 7 A).

#### 4.3.2.2 Die protektive Wirkung von Apremilast ist Epac1-abhängig

Anschließend wurde ein Keratinozytendissoziationsversuch durchgeführt. Dafür wurden WT- und Epac1-KO-Mauskeratinozyten für 1 h mit Apremilast vorinkubiert. Daraufhin wurde AK23, ein monoklonaler, gegen Dsg3 gerichteter Pemphigus-Antikörper, dazugegeben. Als Kontrolle wurde DMSO verwendet. Es ist bekannt, dass AK23 ebenso wie PV-IgG Signalwege in der Pemphigus-Pathogenese aktiviert (Walter et al. 2017). Nach 24 h Inkubation wurde der Versuch durchgeführt.

Die Kontrollzellverbände wurden durch das Scheren in beiden Zelllinien kaum beeinflusst. In den Epac1-bildenden Zellen stieg die Fragmentzahl durch AK23 im Gegensatz zu der Kontrollbedingung signifikant an und konnte durch gleichzeitige Inkubation mit Apremilast

deutlich reduziert werden. Ein Haftungsverlust durch Inkubation mit AK23 wurde auch in den Epac1-KO Zellen beobachtet, allerdings konnte dieser durch Apremilast nicht mehr signifikant reduziert werden (Abb. 7 B).

Es zeigte sich, dass Apremilast, wie auch in HaCaT und NHEK, in den WT-Mauskeratinozyten protektiv wirkt. Allerdings konnte dieser Effekt durch Apremilast in den Epac1-KO-Zellen nicht beobachtet werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die protektive Wirkung von Apremilast von dem cAMP-Effektor Epac1 abhängig ist.

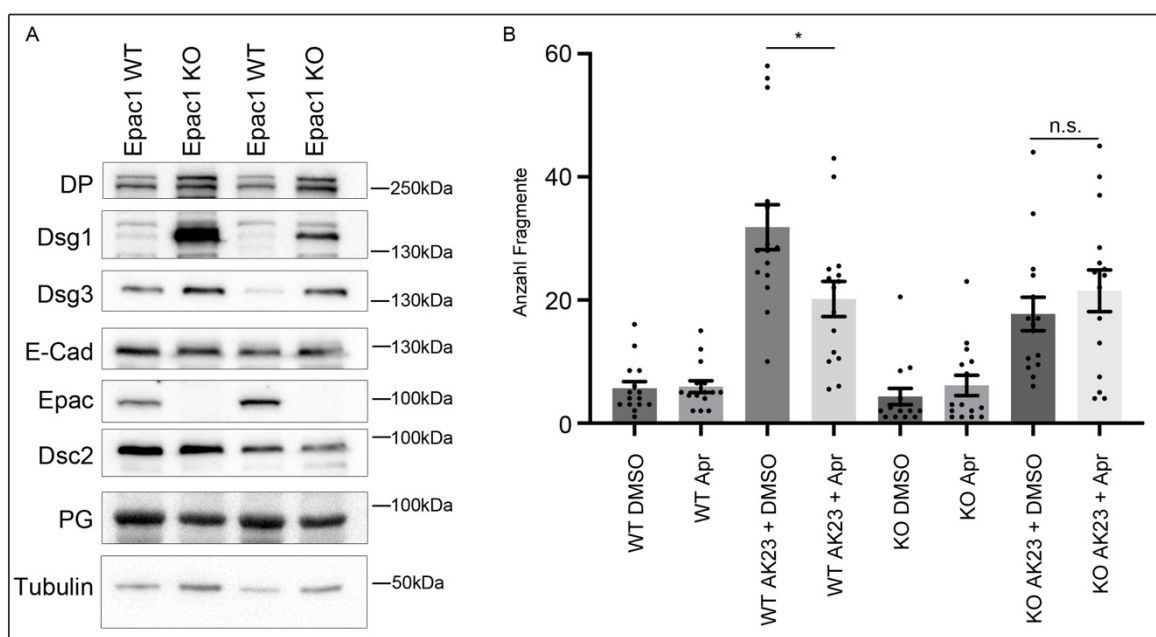


Abb. 7 *Protektiver Mechanismus von Apremilast ist Epac1 - abhängig*

(A) Es wurden zwei verschiedene Epac1 Wildtyp und Epac1 - KO Mauskeratinozytenmutanten charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass Dsg1, Dsg3 und DP in den Zellen, denen Epac1 fehlt, überexpressiert sind. Dahingegen sind PG, E-Cad und Dsc2 in beiden Zelllinien in gleichen Mengen vorhanden. (n = 5)

(B) Im Dissoziationsversuch konnte in den Wildtypzellen eine erhöhte Anzahl an Zellfragmenten nach AK23-Inkubation beobachtet werden. Der Adhäsionsverlust wurde durch Apremilastzugabe blockiert. Dieser Effekt konnte allerdings in den Epac1 - KO Zellen nicht untersucht werden, was für einen Epac1 - abhängigen protektiven Mechanismus spricht.

(P < 0,05 ; n = 15; Zweifaktorielle Varianzanalyse; Säulen zeigen den Mittelwert ± Standardfehler (SEM))

## 4.4 Rolle von Dsg3 im protektiven Mechanismus von cAMP

PV ist eine Dermatose, bei der Autoantikörper gegen Dsg1 und Dsg3 krankheitsauslösend sind. Es wird schon länger diskutiert, dass Desmogleine selbst als Signalvermittler eine Rolle in der Pemphigus-Pathogenese spielen (Waschke 2019). Durch Einsatz eines Peptids, welches Dsg3 Interaktionen stabilisiert (tandem peptide), konnte der Verlust der Dsg3-Bindung durch Autoantikörper verhindert werden. Damit einhergehend konnte die Aktivierung von p38MAPK und die Keratinfilamentretraktion inhibiert werden (Spindler et al. 2013). Deshalb wurde die Rolle von Dsg3 im protektiven Mechanismus von cAMP untersucht.

### 4.4.1 Verminderte Dsg3-Phosphorylierung durch cAMP-Erhöhung

Es konnte bereits gezeigt werden, dass PV-IgG-Gabe in Keratinozyten eine Dsg3-Phosphorylierung induziert (Aoyama, Owada, und Kitajima 1999). Zusätzlich konnte diese Phosphorylierung auch durch den monoklonalen Antikörper AK23 nachgewiesen werden und darüber hinaus auch die damit verbundene Aktivierung von p38MAPK (Kawasaki et al. 2006). Deshalb wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die Dsg3-Phosphorylierung auch in der cAMP-Signalkaskade eine Rolle spielt. Dafür wurden phosphodefiziente PG-S665A-Mauskeratinozyten verwendet, denn es wurde kürzlich gezeigt, dass Apremilast durch PG-Phosphorylierung protektiv in der Pemphigus-Pathogenese wirkt (Sigmund et al. 2023).

Die Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend für 2 h mit Apremilast bzw. für 1 h mit F/R inkubiert. Anschließend wurden sie lysiert und mittels Phos-Tag analysiert. Hierbei zeigte sich nach F/R-Inkubation in PG-WT- und PG-S555A-Zellen gleichermaßen eine verminderte Phosphorylierung von Dsg3 im Vergleich zu Kontrollbedingungen. Die Inkubation mit Apremilast bewirkte dagegen keine Veränderung der Phosphorylierung (Abb. 8 A und B). Dieses Ergebnis gibt zwar keinen Aufschluss über den protektiven Mechanismus von Apremilast in der Pemphigus-Pathogenese, allerdings lässt es vermuten, dass die Dsg3-Phosphorylierung für den F/R-vermittelten cAMP-Anstieg relevant sein könnte. Dies könnte

die Diskrepanz zwischen dem Effekt von F/R und Apremilast auf die PV-IgG-induzierte Dsg3-Depletion erklären.

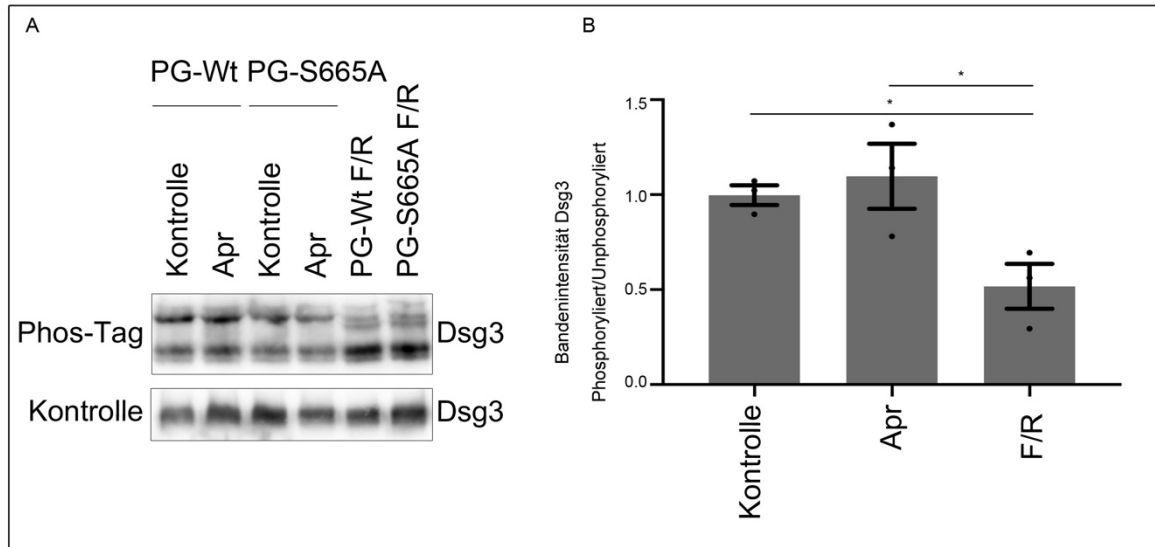


Abb. 8 Die Phosphorylierung von Dsg3 wird durch F/R-Inkubation reduziert

Eine Doppelbande zeigt im Phos-Tag eine Phosphorylierung. Phos-Tag und Kontrollgel zeigen die Dsg3-Bande. Als Ladekontrolle fungiert das Kontrollgel.

Für diesen Versuch wurden PG-S665A-phosphodefiziente-Mauskeratinozyten und WT-Mauskeratinozyten verwendet. Die Menge an phosphorylierten Dsg3 war unter Kontrollbedingungen und Apremilast gleich, während eine signifikante Reduzierung durch F/R Inkubation erkennbar war.

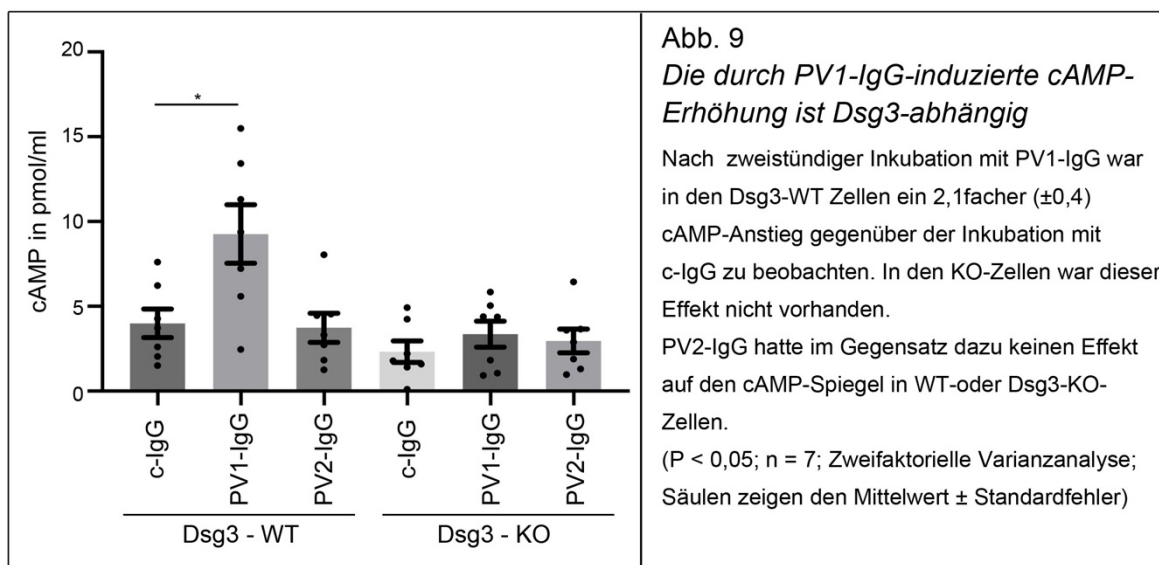
(A) Repräsentativer Westernblot und (B) Quantifizierung aller Experimente.

(P < 0,05 ; n = 3-4; Einfaktorielle Varianzanalyse; Säulen zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM))

#### 4.4.2 Die PV-IgG-induzierte cAMP-Erhöhung ist abhängig von Dsg3

In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass entgegen der Erwartungen nach PV-IgG-Zugabe die cAMP-Konzentration in der Zelle steigt (Spindler et al. 2010). Dies wurde als intrazellulärer „Rettungsmechanismus“ gegen die Autoantikörper-vermittelten Effekte diskutiert. Die pathogenen Effekte können durch die cAMP-Erhöhung nicht aufgehoben, aber vermutlich abgemildert werden. Als Erklärung dafür könnte der vergleichsweise geringe cAMP-Anstieg um das 1,5fache nach Inkubation mit PV-IgG dienen (Spindler et al. 2010). Bisher ist unklar, über welchen Mechanismus es zum cAMP-Anstieg kommt. Desmogleine werden als Signalmoleküle in der Pemphigus-Pathogenese diskutiert (Waschke 2019).

Deshalb wurde untersucht, ob die durch PV-IgG-Zugabe ausgelöste cAMP-Erhöhung abhängig von Dsg3 ist. Dafür wurde der cAMP-Spiegel in WT-Zellen und Dsg3-defizienten-Zellen nach 2 h Inkubation mit zwei verschiedenen PV-IgG-Fractionen (PV1-IgG und PV2-IgG) gemessen. Während der cAMP-Spiegel in den Dsg3-exprimierenden Zellen wie zu erwarten um das 2,1-fache ( $\pm 0,4$ ) anstieg, induzierte die PV1-IgG-Inkubation in den KO-Zellen keine cAMP-Erhöhung. Dies deutet auf eine entscheidende Rolle von Dsg3 im PV-IgG-induzierten „Rettungsmechanismus“ hin (Abb. 9). Interessanterweise konnte außerdem beobachtet werden, dass eine cAMP-Erhöhung nicht durch alle Pemphigus-Seren induziert wurde. Der cAMP-Spiegel nach Behandlung mit PV2-IgG war vergleichbar mit der der Kontrolle. Eine Veränderung konnte auch in den Dsg3-KO-Zellen nicht beobachtet werden. Inwieweit dies vom Antikörperprofil abhängt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.



---

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, inwiefern der PDE-4-Hemmer Apremilast in Pemphigus durch eine cAMP-Erhöhung protektiv wirken könnte und welche Mechanismen dabei beteiligt sind. Außerdem wurde die Bedeutung von Dsg3 für den PV-IgG-vermittelten cAMP-Anstieg, der als insuffizienter zellulärer „Rettungsmechanismus“ angesehen werden kann, untersucht.

### 5.1 Therapeutische Einsetzbarkeit von Apremilast

Bisher wird PV hauptsächlich mittels Immunsuppression therapiert. Dabei treten allerdings häufig Nebenwirkungen auf, da das gesamte Immunsystem beeinträchtigt wird (Kridin 2018a). Ein Therapieansatz, der direkt am Zellhaftungsverlust angreift, existiert derzeit noch nicht. Die p38MAPK galt lange als vielversprechender Ansatzpunkt in der Hemmung der Signaltransduktion. Eine klinische Studie mit dem p38MAPK-Inhibitor KC706 zeigte jedoch keine ausreichend zufriedenstellenden Ergebnisse (Schultz et al. 2011). Anders als in der Epidermis kann die Hemmung von p38MAPK die Autoantikörper-induzierte Blasenbildung in der Mukosa nicht verhindern (Egu et al. 2020; Egu et al. 2017). Daher müssen beim Einsatz von Wirkstoffen auch gewebespezifische Unterschiede in der Signalkaskade berücksichtigt werden (Ludwig 2020). Ob Apremilast in der Schleimhaut protektiv wirken kann, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, jedoch zeigte ein erster Fallbericht, in dem Apremilast bei einem therapieresistenten Pemphigus-Patienten eingesetzt wurde, eine gute Abheilung der oralen Erosionen (Meier et al. 2020). Auch andere Signalmoleküle sind Gegenstand aktueller Untersuchungen. Die Forschungsgruppe um Ralf Ludwig konnte unter anderem MEK1 und den TrkA als neue Ansatzpunkte zur Signalkaskadenblockierung und somit einer topischen



Pemphigus-Therapie identifizieren (Burmester et al. 2020). Der TrkA-Hemmer CT327 wird wie Apremilast bereits zur Therapie der Psoriasis eingesetzt (Roblin et al. 2015).

Im Gegensatz zur Kombination Forskolin/Rolipram, die Patienten auf Grund der kardiovaskulären Nebenwirkungen, die sie auslösen würde, nicht appliziert werden kann, zeigt Apremilast bei Kurzzeitanwendung von weniger als vier Wochen bei herzgesunden Patienten keine adrenergen Nebenwirkungen (Wei, Friedman, und Prussick 2020; Torres und Puig 2018). Daher stellt Apremilast auch in der Pemphigusforschung eine aussichtsreiche Therapieoption dar, zumal es vielversprechende Studien zur topischen Anwendung von Apremilast gibt, die gegenüber der systemischen bevorzugt wird (Madan et al. 2020).

Die PDE4 ist seit einiger Zeit Gegenstand der Forschung zur Therapie von chronisch entzündlichen Krankheiten (Houslay, Schafer, und Zhang 2005). So zeigt Apremilast beispielsweise eine gute Wirksamkeit in der Therapie der atopischen Dermatitis (Maloney et al. 2020). Bisher stand hierbei die antiinflammatorische Wirkung der cAMP-Erhöhung im Vordergrund. Da die cAMP-abhängige Adhäsionsverstärkung durch Apremilast nachgewiesen wurde, sollte in Betracht gezogen werden, dass Apremilast z.B. in der Psoriasis-therapie auch über eine direkte Wirkung auf Keratinozyten wirkt (Sigmund et al. 2023). Für diese These sprechen Daten, die zeigen, dass in Psoriasisläsionen der cAMP-Spiegel erhöht ist, was vermutlich durch eine erhöhte Expression der AC9 zu erklären ist (Simard et al. 2020). Dies ist vergleichbar mit dem cAMP-Anstieg nach Inkubation mit PV-IgG, der einen insuffizienten Rettungsmechanismus darstellen könnte. In diesem Zusammenhang sind unsere Daten interessant, da sie vermuten lassen, dass dieser Rettungsmechanismus Dsg3-abhängig ist. Hier könnte zum Beispiel eine Interaktion von Dsg3 mit der AC 9 eine Rolle spielen.

Interessanterweise gibt es Berichte über gehäufte Fälle einer Koexistenz von Pemphigus und Psoriasis (Phan, Ramachandran, und Smith 2020; Bieber et al. 2021). Bislang ist jedoch unklar, ob tatsächlich eine Assoziation besteht. Ebenso ist unklar, welche Erkrankung die andere begünstigt. Diskutiert werden eine befördernde Umgebung proinflammatorischer Läsionen, aber auch eine genetische Prädisposition, da beide Erkrankungen mit einer HLA-

Allelveränderung assoziiert sind (Kridin et al. 2019; Phan, Ramachandran, und Smith 2020). Die mögliche Rolle von cAMP in diesem Zusammenhang ist noch unklar, Gemeinsamkeiten im Pathomechanismus wären jedoch möglich.

Pemphigus ist eine Autoimmunerkrankung, bei der verschiedene Anteile des Immunsystems eine Rolle spielen, wie beispielsweise Interleukin-produzierende T-Zellen und natürliche Killerzellen (Hennerici et al. 2016; Stern et al. 2008). Apremilast reduziert in der Psoriasis-therapie die Zytokinproduktion in Keratinozyten und natürlichen Killerzellen (Schafer et al. 2010; Milakovic und Gooderham 2021). Der positive Einfluss von Apremilast auf das spezifische Immunsystem könnte auch in Pemphigus einen positiven Effekt haben. Dafür spricht ein erster positiver Fallbericht eines therapieresistenten Pemphigus-Patienten, bei dem nach Apremilastgabe erhöhte Werte an regulatorischen T-Helferzellen nachzuweisen waren (Meier et al. 2020). Inwieweit die antiinflammatorische und adhäsionsverstärkende Wirkung von Apremilast möglicherweise zusammenwirken, könnte Gegenstand weiterer Forschung sein.

## **5.2 Beteiligung verschiedener Signalwege am protektiven Mechanismus von cAMP**

### **5.2.1 cAMP wirkt über ein Zusammenspiel verschiedener Signalwege**

Bei PV kommt es durch Dysregulation verschiedener Signalwege zu einem Zellhaftungsverlust von Keratinozyten. Dabei bieten Signalwege vielfältige Ansatzpunkte zur Gegenregulation und gegebenenfalls für neue therapeutische Ansätze (Spindler et al. 2018).

In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass eine cAMP-Erhöhung durch F/R über eine PKA-abhängige Inhibition von p38MAPK in vivo und in vitro protektiv wirkt (Spindler et al. 2010). Die entscheidende Rolle des p38MAPK-Signalwegs wurde schon vielfach belegt. Durch

Inaktivierung dieses Signalmoleküls ist es möglich, die Dsg3-Internalisierung und die Keratinfilamentretraktion, die beide zentrale Mechanismen in der Pemphigus-Pathogenese darstellen, zu verhindern (Jolly et al. 2010; Berkowitz et al. 2005). Interessanterweise konnte jedoch für Apremilast im Gegensatz zu F/R keine Reduktion der Phosphorylierung von p38MAPK oder der nachgeschalteten MAPKAP2 beobachtet werden, obwohl Apremilast ebenfalls protektiv auf die Adhäsion wirkt. Dies ist stimmig zu der Beobachtung, dass kein Effekt durch Apremilast auf die Dsg3-Depletion vorliegt, da dieses Phänomen im Zusammenhang mit einer p38MAPK-Aktivierung beobachtet wurde (Spindler et al. 2010).

Da für Dsg3 bereits gezeigt wurde, dass es neben seiner adhäsiven Funktion auch in einem Signalkomplex mit p38MAPK und Src wirken kann und zudem bekannt ist, dass PV-IgG-Inkubation zu einer Dsg3-Phosphorylierung führt, war es eine bemerkenswerte Beobachtung, dass F/R zu einer Hemmung dieser Phosphorylierung führt (Tsang et al. 2010; Hartlieb et al. 2014; Aoyama, Owada, und Kitajima 1999). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Dephosphorylierung von Dsg3 zu einer Adhäsionsverstärkung beitragen könnte, und da p38MAPK und Dsg3 in einem Komplex wirken, könnte dies mit der p38MAPK-Aktivierung im Zusammenhang stehen (Spindler et al. 2013). Unsere Forschungsgruppe konnte zeigen, dass Apremilast über eine PKA-vermittelte PG-Phosphorylierung protektiv wirkt und so die Keratinfilamentretraktion hemmt (Abb. 10) (Sigmund et al. 2023). Dies legt nahe, dass die cAMP-Erhöhung über mehrere Signalwege protektiv wirken kann.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Wirkung von F/R und Apremilast könnte die lokale Regulation und das Ausmaß der cAMP-Erhöhung sein. Forskolin ist als Adenylatzyklase-Aktivator direkt für die cAMP-Bildung zuständig, während Apremilast den cAMP-Spiegel durch Hemmung der PDE4 erhöht. Da cAMP als vielseitiges Signalmolekül fungiert, muss es durch räumliche und zeitliche Kompartimentierung reguliert werden (Johnstone et al. 2018). Im Endothel konnte beispielsweise gezeigt werden, dass cAMP unterschiedliche Aufgaben erfüllt, je nachdem ob es an der Zellmembran oder im Zytoplasma gebildet wird (Fischmeister 2006). Hier könnten beispielsweise auch PDE4-PKA-Komplexe eine Rolle spielen, die lokale cAMP-Gradienten ermöglichen (Baillie, Scott, und Houslay 2005).

Insgesamt lässt sich sagen, dass die cAMP-abhängige PKA-Aktivierung wahrscheinlich einerseits über p38MAPK und Dsg3-Dephosphorylierung die Dsg3-Depletion vermindert und andererseits durch PKA-vermittelte PG-Phosphorylierung die Keratinfilamentretraktion hemmt.

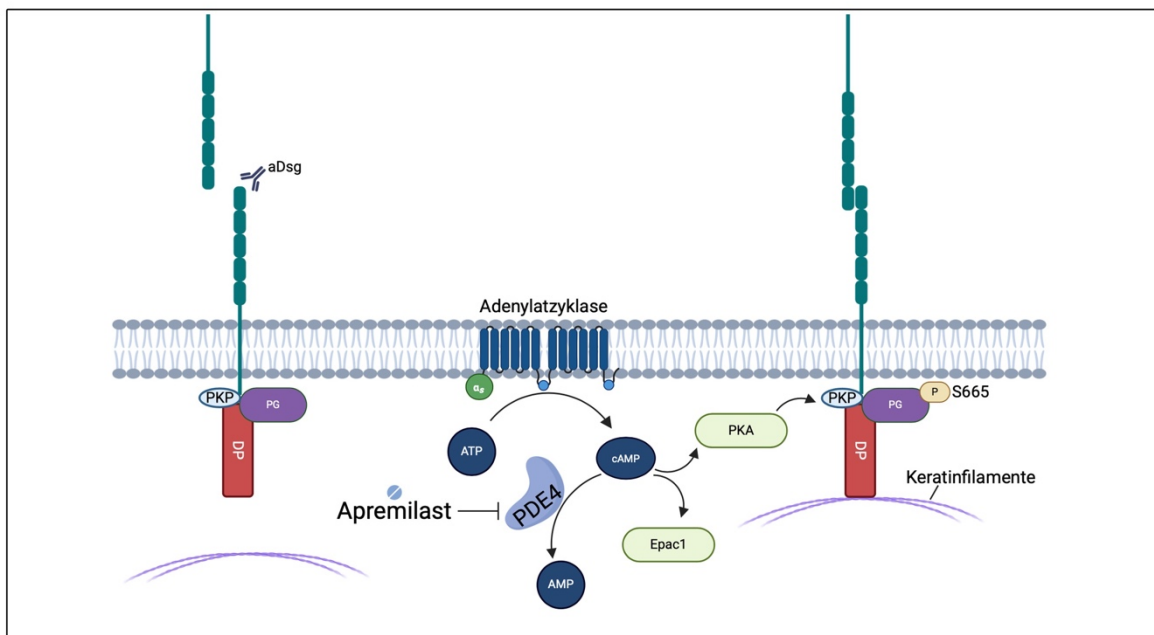


Abb. 10 Überblick über den protektiven Mechanismus von Apremilast

Die cAMP-Erhöhung durch Apremilast führt zu einer PKA-abhängigen Phosphorylierung von PG an der Stelle S665. Dadurch kann die Autoantikörper-vermittelte Keratinretraktion gehemmt werden. Der Signalweg, über den Epac1 protektiv wirkt, ist noch unbekannt.

aDsg: Autoantikörper gegen Desmoglein; DP: Desmoplakin; PG: Plakoglobin; PKA: Proteinkinase A; PKP: Plakophilin; PDE4: Phosphodiesterase 4

Created with BioRender.com; modifiziert nach Vielmuth et al., Acta Physiol, 2023

## 5.2.2 Rezeptorfunktion von Dsg3 zur Protektion gegen PV-IgG-induzierten Haftungsverlust

Frühere Studien haben gezeigt, dass PV-IgG-Inkubation zu einer gering ausgeprägten Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels führt. Dieses Phänomen könnte eine Art insuffizienten „Rettungsmechanismus“ darstellen, da er nicht ausreicht, um den durch die Autoantikörper-induzierten Adhäsionsverlust zu verhindern. Bisher war unklar, ob Antikörper

gegen Dsg3 oder Antikörper gegen andere Antigene wie Desmocolline, Acetylcholinrezeptoren oder mitochondriale Proteine, wie sie bei Pemphigus ebenfalls beschrieben wurden, den cAMP-Anstieg auslösen (Amber, Valdebran, und Grando 2018). Die Daten, dass in Dsg3-KO-Zellen nach PV-IgG-Inkubation keine cAMP-Erhöhung mehr auftrat, deuten darauf hin, dass Dsg3 eine wichtige Rolle für den zellulären Rettungsmechanismus spielt. Dies deckt sich mit Untersuchungen, in denen gezeigt werden konnte, dass die Vernetzung von Dsg3 durch ein sogenanntes Tandempeptid die Aktivität der p38MAPK unterdrückt, was darauf hindeutet, dass Dsg3 intrazelluläre Signalwege moduliert (Spindler et al. 2013). Dabei wurde ein Komplex aus Dsg3, PG, p38MAPK und Dsc3 nachgewiesen. Inwiefern dieser Komplex möglicherweise auch für die Regulation des cAMP-Spiegels von Bedeutung sein könnte, bedarf noch weiterer Forschung.

Desmogleine wurden schon länger als mögliche Mechanosensoren diskutiert. Es konnte gezeigt werden, dass Adhäsionsrezeptoren wie Integrin, oder DP in Desmosomen, als Signalgeber für Differenzierungs- und Wachstumsprozesse dienen (Müller et al. 2008; Price et al. 2018). Betrachtet man desmosomale Proteine als mechanosensitive Signalkomplexe, könnte dies zumindest für Dsg3 auch die Kombination der Mechanismen der direkten Inhibition der Dsg3-Haftung und der Aktivierung von Signalkaskaden in der Pemphigus-Pathogenese erklären. Die Bindung der Dsg3-Antikörper würde dann zur Aktivierung von p38MAPK führen (Sajda und Sinha 2018). Unklar ist jedoch, wie das Signal der Haftungsinhibition von Dsg3 in die Zelle weitergeleitet wird (Waschke 2019). Hier könnte die Phosphorylierung von Dsg3 eine Rolle spielen, die durch cAMP-Erhöhung inhibiert werden kann (Kawasaki et al. 2006).

Dass Antikörper gegen Desmogleine eine spezifische Rolle in der Pathogenese von Pemphigus spielen, zeigen Studien, in denen nachgewiesen wurde, dass Antikörper gegen Dsg3 und Dsg1 teilweise unterschiedliche Signalwege auslösen. Src wird durch anti-Dsg3-Antikörper aktiviert, während die Erk-Aktivierung von Dsg1 abhängig ist (Walter et al. 2017). Für die cAMP-Erhöhung wurde bereits angenommen, dass anti-Dsg3-Antikörper dafür relevant sind (Walter et al. 2017).

Eine Möglichkeit, die zur cAMP-Erhöpfung beitragen könnte, wäre eine Interaktion zwischen Dsg3 und Adenylatzyklasen. Bislang ist unklar, welche Adenylatzyklase-Typen in menschlichen Keratinozyten exprimiert werden. In Rattenkeratinozyten konnte hauptsächlich die AC2 nachgewiesen werden (Takahashi et al. 1998). Die bereits beschriebene Studie von Psoriasispatienten lässt allerdings darauf schließen, dass die AC9 in der menschlichen Epidermis am cAMP-Signalweg entscheidend beteiligt ist (Simard et al. 2020). Zukünftige Untersuchungen zu verschiedenen Adenylatzyklase-Typen in Keratinozyten und zu einer möglichen Interaktion von AC und Dsg3 sind daher notwendig.

### **5.3 Die Rolle des cAMP-Effektor Epac1 in der protektiven Wirkung von Apremilast**

Epac ist neben PKA der wichtigste cAMP-Effektor und ist ebenso an der Zelladhäsion beteiligt (Rangarajan et al. 2003; Fukuhara et al. 2005). Es existieren die zwei Isoformen Epac1 und Epac2, die jeweils eine regulatorische und eine katalytische Region besitzen. Epac1 ist in allen Geweben zu finden, während Epac2 überwiegend im Gehirn exprimiert wird (Cheng et al. 2008). Die Bedeutung von PKA für die protektive Wirkung von cAMP konnte bereits nachgewiesen werden (Spindler et al. 2010). Als Zielmolekül wurde p38MAPK identifiziert, sowie die Phosphorylierung von PG an S665 (Sigmund et al. 2023). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die protektive Wirkung von Apremilast nach PV-IgG-Inkubation in Keratinozyten durch PKA-Inhibition herabgesetzt wurde. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch keine positive Wirkung von Apremilast auf die p38MAPK-Phosphorylierung gezeigt werden, weshalb der zweite cAMP-Effektor Epac1 untersucht wurde. Die Daten aus dem Keratinozytendissoziationsversuch mit Epac1-KO-Zellen deuten auf eine entscheidende Rolle von Epac1 im protektiven Mechanismus von Apremilast hin, da die Wirkung der cAMP-Erhöpfung in Keratinozyten, die kein Epac1 mehr bilden, aufgehoben war.

Durch die verschiedenen Effektormoleküle ist es möglich, dass cAMP im Sinne der Kompartimentierung verschiedene Funktionen erfüllt (Johnstone et al. 2018). Es ist bekannt, dass cAMP über die Aktivierung von Epac1 die GTPasen Rap1 und Rac1 unabhängig von PKA stimuliert. Diese Signalkaskade führt Integrin- oder Cadherinabhängig (VE-Cadherin, E-Cadherin) zur Adhäsionsverstärkung in verschiedenen Zelltypen (Boettner und Van Aelst 2009; Rangarajan et al. 2003; García-Ponce et al. 2020). Die Barrierestabilisierung durch Epac1-Rap1/Rac1 geschieht im Endothel durch Förderung der Aktinbündelung an Zell-Zell-Kontakten und führt somit zur Stabilisierung von VE-Cadherin in der Zellmembran (Fukuhara et al. 2005; Noda et al. 2010; Kooistra et al. 2005; García-Ponce et al. 2020). Es ist allerdings auch bekannt, dass Epac1 und PKA unabhängig voneinander über unterschiedliche Signalwege zu einem erhöhten Einbau von VE-Cadherin und somit zur Verringerung der Endothelpermeabilität führen (Lorenowicz et al. 2008). Somit wirken beide Effektormoleküle synergetisch adhäsionsverstärkend, jedoch über unterschiedliche Signalmoleküle. Dies unterstützt unsere Vermutung, dass PKA und Epac1 beide, jedoch vermutlich durch unterschiedliche Signalkaskaden, zur protektiven Rolle der cAMP-Erhöhung bei Pemphigus beitragen (Abb. 10).

Darüber hinaus fördert Rap1 die Bildung von Adhärensjunktionen im Epithel (Price et al. 2004). Die Gruppe um Kathleen J. Green hat zudem entdeckt, dass Pkp3 mit E-Cadherin und Rap1 einen Komplex bildet, der neben der Adhäsionsverstärkung über E-Cadherin auch an der Desmosomenassemblierung beteiligt ist (Todorovic et al. 2014). Der Einfluss der cAMP-abhängigen Epac1-Aktivierung auf die Desmosomenadhäsion und deren Einwirkung bei pathologischen Prozessen, wie beispielsweise Pemphigus, ist bisher unklar. Unsere Daten lassen vermuten, dass der Epac1-abhängige Signalweg hier eine Rolle spielen könnte. In diesem Zusammenhang ist auch die Rolle von RhoA, das ebenfalls zur Familie der kleinen GTPasen gehört, zu betrachten. RhoA hat neben der Einwirkung auf E-Cadherin-vermittelte Zelladhäsion auch eine wichtige Funktion in der Pemphigus-Pathogenese. Die Aktivierung von RhoA kann die durch PV-IgG-Zugabe ausgelöste Blasenbildung hemmen, während p38MAPK eine inhibierende Wirkung auf RhoA ausübt (Waschke et al. 2006; Fukata et al. 1999).

Außerdem ist aus der Endothelforschung bekannt, dass Epac1 und Rap1 eine hemmende Wirkung auf RhoA ausüben (Cullere et al. 2005). Inwiefern diese Vorgänge auf Keratinozyten zu übertragen sind, ist vorerst jedoch unklar.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass die cAMP-abhängige Aktivierung von PKA und Epac1 möglicherweise durch eine unterschiedliche räumliche Regulation der cAMP-Bildung (wie durch Forskolin) und des cAMP-Abbaus (Apremilast) beeinflusst wird. Dies würde auch die bereits beschriebenen Beobachtungen, dass Apremilast nicht dieselbe Wirkung wie F/R auf p38MAPK oder Dsg3 hat, erklären. Diese Vermutung deckt sich mit Befunden im Endothel, dass die Lokalisation der cAMP-Bildung einen wichtigen Einfluss auf die Effekte von cAMP hat (Fischmeister 2006).

Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass die Menge einiger desmosomaler Proteine in Epac-1-KO Zellen gegenüber den WT-Zellen dysreguliert sind. Dies deutet auf einen Einfluss von Epac1 auf die Expression desmosomaler Proteine hin. Es konnte beispielsweise auch gezeigt werden, dass nach Inkubation mit Pemphigus-Autoantikörpern eine Hochregulierung von Dsg2 zu beobachten ist, die ebenfalls als Art Rettungsmechanismus fungiert (Sigmund et al. 2020).



## 6 Zusammenfassung

Die interzelluläre Adhäsion der Epidermis wird durch verschiedene Zell-Zell-Kontakte generiert, zu denen Desmosomen gehören. Die Haftung der Desmosomen wird durch desmosomale Cadherine vermittelt, zu denen auch Desmoglein 1 (Dsg1) und Desmoglein 3 (Dsg3) zählen. Pemphigus vulgaris (PV) ist eine schwere Autoimmunerkrankung, bei der es durch Autoantikörper gegen diese desmosomalen Proteine zur Blasenbildung der Haut und Schleimhaut kommt. Durch die Antikörperbindung werden intrazelluläre Signalwege aktiviert, die in der Folge zum Haftungsverlust führen. Für diese Autoimmundermatose steht bisher keine kausale Therapieoption zur Verfügung.

Aus der Endothelforschung ist bekannt, dass cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) adhäsionsverstärkend wirkt, und auch für PV konnte nach cAMP-Erhöhung durch Forskolin/Rolipram (F/R) ein positiver Effekt auf die durch PV-IgG induzierten morphologischen Veränderungen festgestellt werden. Außerdem wurde beobachtet, dass es einen intrazellulären Rettungsmechanismus gibt, bei dem es allein durch PV-IgG-Inkubation zum cAMP-Anstieg kommt. Dieses Phänomen kann die Ausbildung des Haftungsverlustes nicht verhindern, mildert diesen aber vermutlich. Apremilast ist ein Phosphodiesterase-4-Hemmer (PDE4-Hemmer), der für die Therapie der chronisch-entzündlichen Dermatose Psoriasis bereits angewendet wird und durch cAMP-Erhöhung antiinflammatorisch wirkt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, inwiefern die durch Apremilast-vermittelte cAMP-Erhöhung auch in der Pemphigus-Therapie Anwendung finden könnte und ob es möglich ist, den interzellulären Adhäsionsverlust durch Apremilastgabe zu verhindern. Zunächst wurde bestätigt, dass Apremilast in der Keratinozytenkultur den cAMP-Spiegel anhebt und außerdem interzellulär haftverstärkend wirkt. Allerdings konnte anders als in früheren Studien mit anderer pharmakologischer Inkubation nach Gabe von Apremilast kein Einfluss auf die durch Autoantikörper-induzierte Dsg3-Depletion nachgewiesen werden.

Daher wurde im Anschluss die Rolle der cAMP-Effektoren Epac1 (*engl. Exchange protein activated by cAMP*) und Proteinkinase A (PKA) untersucht, da vermutet wurde, dass die protektive Wirkung von Apremilast und F/R über andere Signalwege stattfinden könnte. Dabei konnte gezeigt werden, dass in Keratinozyten, die kein Epac1 exprimieren, der positive Einfluss von Apremilast auf die Adhäsion aufgehoben ist. Somit ist die protektive Wirkung des PDE4-Hemmers unter anderem vermutlich auch abhängig von Epac1. Über die Rolle von Epac1 in Keratinozyten ist im Gegensatz zu anderen Zellarten noch wenig bekannt. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Hinweis darauf, dass die cAMP-abhängige Aktivierung von Epac1 ähnlich wie im Endothel adhäsionsverstärkend wirkt und es bei PV auch eine PKA-unabhängige protektive Wirkung durch cAMP-Erhöhung gibt.

Zusätzlich konnte in Keratinozyten, die kein Dsg3 exprimieren, keine cAMP-Erhöhung durch Inkubation mit PV-IgG generiert werden. Der cAMP-vermittelte Rettungsmechanismus bei PV scheint deshalb Dsg3-abhängig zu sein.

Der genaue molekulare Mechanismus, über den Apremilast in humaner Keratinozytenkultur als Pemphigusmodell positiv wirkt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass Apremilast neben der antiinflammatorischen Wirkung auch direkte Effekte auf Keratinozyten hat. Somit stellt Apremilast nicht zuletzt für Pemphigus vulgaris, sondern auch für andere Hauterkrankungen eine interessante Therapieoption dar, die es weiter zu erforschen gilt.

## 7 Literatur

- Ahmed, A Razzaque, Zachary Spigelman, Lisa A Cavacini, and Marshall R Posner. 2006. 'Treatment of pemphigus vulgaris with rituximab and intravenous immune globulin', *New England Journal of Medicine*, 355: 1772-79.
- Ahmed, A. Razzaque. 1983. 'Clinical features of pemphigus', *Clinics in Dermatology*, 1: 13-21.
- Al-Amoudi, A., D. C. Díez, M. J. Betts, and A. S. Frangakis. 2007. 'The molecular architecture of cadherins in native epidermal desmosomes', *Nature*, 450: 832-7.
- Amagai, M., A. R. Ahmed, Y. Kitajima, J. C. Bystry, Y. Milner, R. Gniadecki, M. Hertl, C. Pincelli, H. Kurzen, M. Fridkis-Hareli, Y. Aoyama, M. Frusic-Zlotkin, E. Muller, M. David, D. Mimouni, D. Vind-Kezunovic, B. Michel, M. Mahoney, and S. Grando. 2006. 'Are desmoglein autoantibodies essential for the immunopathogenesis of pemphigus vulgaris, or just "witnesses of disease"?'', *Exp Dermatol*, 15: 815-31.
- Amagai, M., T. Nishikawa, H. C. Nousari, G. J. Anhalt, and T. Hashimoto. 1998. 'Antibodies against desmoglein 3 (pemphigus vulgaris antigen) are present in sera from patients with paraneoplastic pemphigus and cause acantholysis in vivo in neonatal mice', *The Journal of Clinical Investigation*, 102: 775-82.
- Amagai, Masayuki. 2008. 'Pemphigus Family of Diseases.' in.
- Amagai, Masayuki, and John R. Stanley. 2012. 'Desmoglein as a target in skin disease and beyond', *J Invest Dermatol*, 132: 776-84.
- Amber, Kyle T., Manuel Valdebran, and Sergei A. Grando. 2018. 'Non-Desmoglein Antibodies in Patients With Pemphigus Vulgaris', *Frontiers in Immunology*, 9: 1190-90.
- 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: 2233-40.
- Assaf, S., L. Malki, T. Mayer, J. Mohamad, A. Peled, M. Pavlovsky, K. Malovitski, O. Sarig, D. Vodo, and E. Sprecher. 2021. 'ST18 affects cell-cell adhesion in pemphigus vulgaris in a tumour necrosis factor- $\alpha$ -dependent fashion', *Br J Dermatol*, 184: 1153-60.
- Baillie, George S., John D. Scott, and Miles D. Houslay. 2005. 'Compartmentalisation of phosphodiesterases and protein kinase A: opposites attract', *FEBS Letters*, 579: 3264-70.
- Baker, J., K. Seiffert-Sinha, and A. A. Sinha. 2022. 'Patient genetics shape the autoimmune response in the blistering skin disease pemphigus vulgaris', *Front Immunol*, 13: 1064073.
- Bär, Janina, Vinod Kumar, Wera Roth, Nicole Schwarz, Miriam Richter, Rudolf E. Leube, and Thomas M. Magin. 2014. 'Skin Fragility and Impaired Desmosomal Adhesion in Mice Lacking All Keratins', *Journal of Investigative Dermatology*, 134: 1012-22.
- Beek, Nina, Detlef Zillikens, and Enno Schmidt. 2018. *Diagnostik blasenbildender Autoimmundermatosen*.
- Bektas, Meryem, Puneet S. Jolly, Paula Berkowitz, Masayuki Amagai, and David S. Rubenstein. 2013. 'A pathophysiologic role for epidermal growth factor receptor in pemphigus acantholysis', *The Journal of biological chemistry*, 288: 9447-56.
- Berika, Mohamed, and David Garrod. 2014. 'Desmosomal Adhesion In Vivo', *Cell Communication & Adhesion*, 21: 65-75.
- 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: 23778-84.
- 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: 12855-60.
- Berkowitz, Paula, Luis A. Diaz, Russel P. Hall, and David S. Rubenstein. 2008. 'Induction of p38MAPK and HSP27 Phosphorylation in Pemphigus Patient Skin', *Journal of Investigative Dermatology*, 128: 738-40.

- Berrier, A. L., and K. M. Yamada. 2007. 'Cell-matrix adhesion', *J Cell Physiol*, 213: 565-73.
- Bieber, Katja, Khalaf Kridin, Shirin Emtenani, Katharina Boch, Enno Schmidt, and Ralf J. Ludwig. 2021. 'Milestones in Personalized Medicine in Pemphigus and Pemphigoid', *Frontiers in Immunology*, 11.
- Boettner, Benjamin, and Linda Van Aelst. 2009. 'Control of cell adhesion dynamics by Rap1 signaling', *Current opinion in cell biology*, 21: 684-93.
- Bos, Johannes L. 2003. 'Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4: 733-38.
- Brandner, Johanna, Marek Haftek, and Carien Niessen. 2010. 'Adherens Junctions, Desmosomes and Tight Junctions in Epidermal Barrier Function', *The Open Dermatology Journal*, 4: 14-20.
- Broussard, Joshua A., Spiro Getsios, and Kathleen J. Green. 2015. 'Desmosome regulation and signaling in disease', *Cell and Tissue Research*, 360: 501-12.
- Broussard, Joshua A., Avinash Jaiganesh, Hoda Zarkoob, Daniel E. Conway, Alexander R. Dunn, Horacio D. Espinosa, Paul A. Janmey, and Kathleen J. Green. 2020. 'Scaling up single-cell mechanics to multicellular tissues – the role of the intermediate filament–desmosome network', *Journal of Cell Science*, 133: jcs228031.
- Burmester, Imke A. K., Sarah Flaswinkel, Clara-Sophie Thies, Anika Kasprick, Mayumi Kamaguchi, Valéria Bumiller-Bini, Shirin Emtenani, Nick Feldmann, Khalaf Kridin, Enno Schmidt, Nina van Beek, Detlef Zillikens, Christoph M. Hammers, Jennifer E. Hundt, and Ralf J. Ludwig. 2020. 'Identification of novel therapeutic targets for blocking acantholysis in pemphigus', *British Journal of Pharmacology*, 177: 5114-30.
- Bystryń, J. C., and J. L. Rudolph. 2005. 'Pemphigus', *Lancet*, 366: 61-73.
- Bystryń, J. C., and N. M. Steinman. 1996. 'The adjuvant therapy of pemphigus. An update', *Arch Dermatol*, 132: 203-12.
- Caretta, Antonio, and Carla Mucignat-Caretta. 2011. 'Protein Kinase A in Cancer', *Cancers*, 3: 913-26.
- Cheng, X., Z. Ji, T. Tsalkova, and F. Mei. 2008. 'Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors', *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 40: 651-62.
- Chujor, Chujor S. N., Franz Hammerschmid, and Charles Lam. 1998. 'Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase 4 Subtypes Are Differentially Expressed by Primary Keratinocytes and Human Epidermoid Cell Lines', *Journal of Investigative Dermatology*, 110: 287-91.
- Cullere, Xavier, Sunil K. Shaw, Lorna Andersson, Junichi Hirahashi, Francis W. Lusinskas, and Tanya N. Mayadas. 2005. 'Regulation of vascular endothelial barrier function by Epac, a cAMP-activated exchange factor for Rap GTPase', *Blood*, 105: 1950-55.
- Daniel, Benjamin S., Michael Hertl, Victoria P. Werth, Rüdiger Eming, and Dédée F. Murrell. 2012. 'Severity score indexes for blistering diseases', *Clinics in Dermatology*, 30: 108-13.
- Delva, Emmanuella, Dana K. Tucker, and Andrew P. Kowalczyk. 2009. 'The desmosome', *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1: a002543-a43.
- Didona, D., R. Maglie, R. Eming, and M. Hertl. 2019. 'Pemphigus: Current and Future Therapeutic Strategies', *Front Immunol*, 10: 1418.
- Didona, Dario, Morna F. Schmidt, Roberto Maglie, and Farzan Solimani. 2023. 'Pemphigus- und Pemphigoid-Erkrankungen: Klinik, Diagnostik und Therapie', *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 21: 1188-211.
- Diercks, G.F.H., H.H. Pas, and M.F. Jonkman. 2009. 'The ultrastructure of acantholysis in pemphigus vulgaris', *British Journal of Dermatology*, 160: 460-61.
- Dodeigne, C., L. Thunus, and R. Lejeune. 2000. 'Chemiluminescence as diagnostic tool. A review', *Talanta*, 51: 415-39.
- 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 signalling prevents epidermal blistering and alterations of desmosome structure induced by pemphigus autoantibodies in human epidermis', *Br J Dermatol*, 177: 1612-18.
- Egu, D.T., A.M. Sigmund, E. Schmidt, V. Spindler, E. Walter, and J. Waschke. 2020. 'A new ex vivo human oral mucosa model reveals that p38MAPK inhibition is not effective in preventing

- autoantibody-induced mucosal blistering in pemphigus', *British Journal of Dermatology*, 182: 987-94.
- Ellebrecht, Christoph T., Vijay G. Bhoj, Arben Nace, Eun Jung Choi, Xuming Mao, Michael Jeffrey Cho, Giovanni Di Zenzo, Antonio Lanzavecchia, John T. Seykora, George Cotsarelis, Michael C. Milone, and Aimee S. Payne. 2016. 'Reengineering chimeric antigen receptor T cells for targeted therapy of autoimmune disease', *Science (New York, N.Y.)*, 353: 179-84.
- Ellebrecht, Christoph T., and Aimee S. Payne. 2017a. 'Setting the target for pemphigus vulgaris therapy', *JCI Insight*, 2.
- . 2017b. 'Setting the target for pemphigus vulgaris therapy', *JCI Insight*, 2: e92021-e21.
- Fertig, Bracy A., and George S. Baillie. 2018. 'PDE4-Mediated cAMP Signalling', *Journal of cardiovascular development and disease*, 5: 8.
- Fischmeister, R. 2006. 'Is cAMP good or bad? Depends on where it's made', *Circ Res*, 98: 582-4.
- Fukata, M., M. Nakagawa, S. Kuroda, and K. Kaibuchi. 1999. 'Cell adhesion and Rho small GTPases', *Journal of Cell Science*, 112: 4491-500.
- Fukuhara, Shigetomo, Atsuko Sakurai, Hideto Sano, Akiko Yamagishi, Satoshi Somekawa, Nobuyuki Takakura, Yoshihiko Saito, Kenji Kangawa, and Naoki Mochizuki. 2005. 'Cyclic AMP Potentiates Vascular Endothelial Cadherin-Mediated Cell-Cell Contact To Enhance Endothelial Barrier Function through an Epac-Rap1 Signaling Pathway', *Molecular and Cellular Biology*, 25: 136-46.
- Fukunaga, Y., H. Liu, M. Shimizu, S. Komiya, M. Kawasuji, and A. Nagafuchi. 2005. 'Defining the roles of beta-catenin and plakoglobin in cell-cell adhesion: isolation of beta-catenin/plakoglobin-deficient F9 cells', *Cell Struct Funct*, 30: 25-34.
- García-Ponce, A., K. Schuster, S. O. Døskeland, R. K. Reed, F. E. Curry, J. Waschke, and M. Y. Radeva. 2020. 'Epac1 Is Crucial for Maintenance of Endothelial Barrier Function through A Mechanism Partly Independent of Rac1', *Cells*, 9.
- Gauthier, Emilie, Cécile Rahuel, Marie-Paule Wautier, Wassim El Nemer, Pierre Gane, Jean-luc Wautier, Jean-Pierre Cartron, Yves Colin, and Caroline Kim. 2005. 'Protein Kinase A-dependent Phosphorylation of Lutheran/Basal Cell Adhesion Molecule Glycoprotein Regulates Cell Adhesion to Laminin  $\alpha 5$ ', *The Journal of biological chemistry*, 280: 30055-62.
- Giloh, H, and JW Sedat. 1982. 'Fluorescence microscopy: reduced photobleaching of rhodamine and fluorescein protein conjugates by n-propyl gallate', *Science*, 217: 1252-55.
- Goebeler, Matthias, and Henning Hamm. 2017. *Basiswissen Dermatologie* (Springer: Berlin ; Heidelberg).
- Goodenough, D. A., and D. L. Paul. 2009. 'Gap junctions', *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1: a002576.
- Green, K. J., S. Getsios, S. Troyanovsky, and L. M. Godsel. 2010. 'Intercellular junction assembly, dynamics, and homeostasis', *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2: a000125.
- Green, K. J., A. Jaiganesh, and J. A. Broussard. 2019. 'Desmosomes: Essential contributors to an integrated intercellular junction network', *F1000Res*, 8.
- Green, K. J., C. M. Niessen, M. Rübsam, B. E. Perez White, and J. A. Broussard. 2022. 'The Desmosome-Keratin Scaffold Integrates ErbB Family and Mechanical Signaling to Polarize Epidermal Structure and Function', *Front Cell Dev Biol*, 10: 903696.
- Green, Kathleen J., and Claire A. Gaudry. 2000. 'Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments?', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1: 208-16.
- Haber, Stacy L., Sarah Hamilton, Mark Bank, Shi Yun Leong, and Evelyn Pierce. 2016. 'Apremilast: A Novel Drug for Treatment of Psoriasis and Psoriatic Arthritis', *Annals of Pharmacotherapy*, 50: 282-90.
- 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: 7160-5.
- 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, Eva, Vera Rötzer, Mariya Radeva, Volker Spindler, and Jens Waschke. 2014. 'Desmoglein 2 Compensates for Desmoglein 3 but Does Not Control Cell Adhesion via Regulation of p38 Mitogen-activated Protein Kinase in Keratinocytes', *Journal of Biological Chemistry*, 289: 17043-53.
- Hatemi, Gülen, Alfred Mahr, Yoshiaki Ishigatsubo, Yeong-Wook Song, Mitsuhiro Takeno, Doyoung Kim, Melike Melikoğlu, Sue Cheng, Shannon McCue, Maria Paris, Mindy Chen, and Yusuf Yazici. 2019. 'Trial of Apremilast for Oral Ulcers in Behçet's Syndrome', *New England Journal of Medicine*, 381: 1918-28.
- Hatzfeld, Mechthild, René Keil, and Thomas M. Magin. 2017. 'Desmosomes and Intermediate Filaments: Their Consequences for Tissue Mechanics', *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 9: a029157.
- 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.
- Hennerici, T., R. Pollmann, T. Schmidt, M. Seipelt, B. Tackenberg, C. Möbs, K. Ghoreschi, M. Hertl, and R. Eming. 2016. 'Increased Frequency of T Follicular Helper Cells and Elevated Interleukin-27 Plasma Levels in Patients with Pemphigus', *PLoS one*, 11: e0148919.
- Heupel, W. M., D. Zillikens, D. Drenckhahn, and J. Waschke. 2008. 'Pemphigus vulgaris IgG directly inhibit desmoglein 3-mediated transinteraction', *J Immunol*, 181: 1825-34.
- Hobbs, R. P., and K. J. Green. 2012. 'Desmoplakin regulates desmosome hyperadhesion', *J Invest Dermatol*, 132: 482-5.
- Hofmann, Silke C., Hazem A. Juratli, and Rüdiger Eming. 2018. 'Bullöse Autoimmundermatosen', *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 16: 1339-60.
- Holthöfer, B., R. Windoffer, S. Troyanovsky, and R. E. Leube. 2007. 'Structure and function of desmosomes', *Int Rev Cytol*, 264: 65-163.
- Houslay, M. D., P. Schafer, and K. Y. Zhang. 2005. 'Keynote review: phosphodiesterase-4 as a therapeutic target', *Drug Discov Today*, 10: 1503-19.
- Iaizzo, Paul A. % SpringerLink. 2005. *Handbook of Cardiac Anatomy, Physiology, and Devices* (Humana Press Inc: Totowa, NJ).
- James, Kirk A., Donna A. Culton, and Luis A. Diaz. 2011. 'Diagnosis and clinical features of pemphigus foliaceus', *Dermatologic clinics*, 29: 405-viii.
- Jamora, Maria Jasmin J., Diane Jiao, and Jean-Claude Bystry. 2003. 'Antibodies to desmoglein 1 and 3, and the clinical phenotype of pemphigus vulgaris', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 48: 976-77.
- Johnson, Jodi L., Nicole A. Najor, and Kathleen J. Green. 2014. 'Desmosomes: regulators of cellular signaling and adhesion in epidermal health and disease', *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 4: a015297-a97.
- Johnstone, T. B., S. R. Agarwal, R. D. Harvey, and R. S. Ostrom. 2018. 'cAMP Signaling Compartmentation: Adenylyl Cyclases as Anchors of Dynamic Signaling Complexes', *Mol Pharmacol*, 93: 270-76.
- 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: 8936-41.
- Joly, Pascal, Hugo Mouquet, Jean-Claude Roujeau, Michel D'Incan, Danièle Gilbert, Serge Jacquot, Marie-Lise Gougeon, Christophe Bedane, Ralf Muller, Brigitte Dreno, Marie-Sylvie Doutre, Emmanuel Delaporte, Christine Pauwels, Nathalie Franck, Frédéric Caux, Catherine Picard, Emmanuelle Tancrede-Bohin, Philippe Bernard, François Tron, Michael Hertl, and Philippe Musette. 2007. 'A Single Cycle of Rituximab for the Treatment of Severe Pemphigus', *New England Journal of Medicine*, 357: 545-52.
- Jones, J. C., C. Y. Kam, R. M. Harmon, A. V. Woychek, S. B. Hopkinson, and K. J. Green. 2017. 'Intermediate Filaments and the Plasma Membrane', *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 9.

- Kasperkiewicz, Michael, Christoph T. Ellebrecht, Hayato Takahashi, Jun Yamagami, Detlef Zillikens, Aimee S. Payne, and Masayuki Amagai. 2017. 'Pemphigus', *Nature reviews. Disease primers*, 3: 17026-26.
- Kawasaki, Yuki, Yumi Aoyama, Kazuyuki Tsunoda, Masayuki Amagai, and Yasuo Kitajima. 2006. 'Pathogenic monoclonal antibody against desmoglein 3 augments desmoglein 3 and p38 MAPK phosphorylation in human squamous carcinoma cell line', *Autoimmunity*, 39: 587-90.
- Keating, Gillian M. 2017. 'Apremilast: A Review in Psoriasis and Psoriatic Arthritis', *Drugs*, 77: 459-72.
- Kitajima, Yasuo. 2014. '150th Anniversary Series: Desmosomes and Autoimmune Disease, Perspective of Dynamic Desmosome Remodeling and Its Impairments in Pemphigus', *Cell Communication & Adhesion*, 21: 269-80.
- Kooistra, M. R., M. Corada, E. Dejana, and J. L. Bos. 2005. 'Epac1 regulates integrity of endothelial cell junctions through VE-cadherin', *FEBS Lett*, 579: 4966-72.
- Kopperud, Reidun, Camilla Krakstad, Frode Selheim, and Stein Ove Døskeland. 2003. 'cAMP effector mechanisms. Novel twists for an 'old' signaling system', *FEBS Letters*, 546: 121-26.
- Kowalczyk, Andrew P., and Kathleen J. Green. 2013. 'Structure, function, and regulation of desmosomes', *Progress in molecular biology and translational science*, 116: 95-118.
- Kridin, K., M. Kridin, G. Shalom, and A. D. Cohen. 2019. 'The coexistence of pemphigus and psoriasis: a systematic review and meta-analysis', *Immunol Res*, 67: 134-41.
- Kridin, K., and E. Schmidt. 2021. 'Epidemiology of Pemphigus', *JID Innov*, 1: 100004.
- Kridin, Khalaf. 2018a. 'Emerging treatment options for the management of pemphigus vulgaris', *Therapeutics and clinical risk management*, 14: 757-78.
- . 2018b. 'Pemphigus group: overview, epidemiology, mortality, and comorbidities', *Immunologic Research*, 66: 255-70.
- Kröger, Cornelia, Fanny Loschke, Nicole Schwarz, Reinhard Windoffer, Rudolf E. Leube, and Thomas M. Magin. 2013. 'Keratins control intercellular adhesion involving PKC- $\alpha$ -mediated desmoplakin phosphorylation', *Journal of Cell Biology*, 201: 681-92.
- Kuszak, Adam J., and Roger K. Sunahara. 2010. 'Chapter 171 - Adenylyl Cyclases.' in Ralph A. Bradshaw and Edward A. Dennis (eds.), *Handbook of Cell Signaling (Second Edition)* (Academic Press: San Diego).
- Laemmli, U. K. 1970. 'Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4', *Nature*, 227: 680-85.
- Laurenza, A., E. M. Sutkowski, and K. B. Seamon. 1989. 'Forskolin: a specific stimulator of adenylyl cyclase or a diterpene with multiple sites of action?', *Trends Pharmacol Sci*, 10: 442-7.
- Lorenowicz, Magdalena J., Mar Fernandez-Borja, Matthijs R. H. Kooistra, Johannes L. Bos, and Peter L. Hordijk. 2008. 'PKA and Epac1 regulate endothelial integrity and migration through parallel and independent pathways', *European Journal of Cell Biology*, 87: 779-92.
- Ludwig, R.J. 2020. 'Tissue-specific personalized medicine: the next level of individualized treatment', *British Journal of Dermatology*, 182: 833-34.
- Lüllmann-Rauch, Renate, and Esther Asan. 2019. *Taschenlehrbuch Histologie* (Thieme: Stuttgart).
- Madan, Jyotsana R., Shweta Khobaragade, Kamal Dua, and Rajendra Awasthi. 2020. 'Formulation, optimization, and in vitro evaluation of nanostructured lipid carriers for topical delivery of Apremilast', *Dermatologic Therapy*, 33: e13370.
- Maloney, Nolan J., Jeffrey Zhao, Kyle Tegtmeyer, Ernest Y. Lee, and Kyle Cheng. 2020. 'Off-label studies on apremilast in dermatology: a review', *The Journal of dermatological treatment*, 31: 131-40.
- Mao, X., Y. Sano, J. M. Park, and A. S. Payne. 2011. 'p38 MAPK activation is downstream of the loss of intercellular adhesion in pemphigus vulgaris', *J Biol Chem*, 286: 1283-91.
- Mao, Xuming, Arielle R. Nagler, Sara A. Farber, Eun Jung Choi, Lauren H. Jackson, Kristin M. Leiferman, Norito Ishii, Takashi Hashimoto, Masayuki Amagai, John J. Zone, and Aimee S. Payne. 2010. 'Autoimmunity to desmocollin 3 in pemphigus vulgaris', *The American Journal of Pathology*, 177: 2724-30.

- Meier, Katharina, Julia Holstein, Farzan Solimani, Jens Waschke, and Kamran Ghoreschi. 2020. 'Case Report: Apremilast for Therapy-Resistant Pemphigus Vulgaris', *Frontiers in Immunology*, 11: 588315-15.
- Milakovic, M., and M. J. Gooderham. 2021. 'Phosphodiesterase-4 Inhibition in Psoriasis', *Psoriasis (Auckl)*, 11: 21-29.
- Müller, Eliane J., Lina Williamson, Carine Kolly, and Maja M. Suter. 2008. 'Outside-in Signaling through Integrins and Cadherins: A Central Mechanism to Control Epidermal Growth and Differentiation?', *Journal of Investigative Dermatology*, 128: 501-16.
- Müller-Esterl, Werner. 2018. *Biochemie* (Springer Spektrum: Berlin).
- Nguyen, Vu Thuong, Assane Ndoeye, Leonard D. Shultz, Mark R. Pittelkow, and Sergei A. Grando. 2000. 'Antibodies against keratinocyte antigens other than desmogleins 1 and 3 can induce pemphigus vulgaris-like lesions', *The Journal of Clinical Investigation*, 106: 1467-79.
- Nie, Z., A. Merritt, M. Rouhi-Parkouhi, L. Taberner, 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: 2143-54.
- Niessen, C. M. 2007. 'Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function', *J Invest Dermatol*, 127: 2525-32.
- Noda, K., J. Zhang, S. Fukuhara, S. Kunitomo, M. Yoshimura, and N. Mochizuki. 2010. 'Vascular endothelial-cadherin stabilizes at cell-cell junctions by anchoring to circumferential actin bundles through alpha- and beta-catenins in cyclic AMP-Epac-Rap1 signal-activated endothelial cells', *Molecular biology of the cell*, 21: 584-96.
- Om, Amit, Dane Hill, and Steven R. Feldman. 2016. 'Chapter 7 - Apremilast.' in Jashin J. Wu, Steven R. Feldman and Mark G. Lebwohl (eds.), *Therapy for Severe Psoriasis* (Elsevier).
- Owen, Gethin Rh., Devrim Acehan, K.D. Derr, William J. Rice, and David L. Stokes. 2008. 'Cryo-electron tomography of isolated desmosomes', *Biochemical Society Transactions*, 36: 173-79.
- Phan, K., V. Ramachandran, and S. D. Smith. 2020. 'Association between pemphigus and psoriasis: a systematic review and meta-analysis', *Dermatol Online J*, 26.
- Pittenger, Christopher, Eric J. Nestler, and Ronald S. Duman. 2012. 'Chapter 22 - Cyclic Nucleotides in the Nervous System.' in Scott T. Brady, George J. Siegel, R. Wayne Albers and Donald L. Price (eds.), *Basic Neurochemistry (Eighth Edition)* (Academic Press: New York).
- 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.
- Porro, A. M., C. A. Seque, M. C. C. Ferreira, and Mmses Enokihara. 2019. 'Pemphigus vulgaris', *An Bras Dermatol*, 94: 264-78.
- Price, Andrew J., Anna-Lena Cost, Hanna Ungewiß, Jens Waschke, Alexander R. Dunn, and Carsten Grashoff. 2018. 'Mechanical loading of desmosomes depends on the magnitude and orientation of external stress', *Nature Communications*, 9: 5284.
- Price, L. S., A. Hajdo-Milasinovic, J. Zhao, F. J. Zwartkruis, J. G. Collard, and J. L. Bos. 2004. 'Rap1 regulates E-cadherin-mediated cell-cell adhesion', *J Biol Chem*, 279: 35127-32.
- Radeva, M. Y., and J. Waschke. 2018. 'Mind the gap: mechanisms regulating the endothelial barrier', *Acta Physiologica*, 222: e12860.
- Rangarajan, Savithri, Jorrit M. Enserink, H. Bea Kuiperij, Johan de Rooij, Leo S. Price, Frank Schwede, and Johannes L. Bos. 2003. 'Cyclic AMP induces integrin-mediated cell adhesion through Epac and Rap1 upon stimulation of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor', *Journal of Cell Biology*, 160: 487-93.
- Reinard, Thomas % Uni-Taschenbücher GmbH. 2018. *Molekularbiologische Methoden 2.0* (Verlag Eugen Ulmer: Stuttgart).
- Riecker, Gerhard, and Thomas von Arnim. 1991. *Klinische Kardiologie* (Springer: Berlin [u.a.]).
- Roblin, D., G. Yosipovitch, B. Boyce, J. Robinson, J. Sandy, V. Mainero, R. Wickramasinghe, U. Anand, and P. Anand. 2015. 'Topical TrkA Kinase Inhibitor CT327 is an Effective, Novel Therapy for the Treatment of Pruritus due to Psoriasis: Results from Experimental Studies, and Efficacy



- and Safety of CT327 in a Phase 2b Clinical Trial in Patients with Psoriasis', *Acta Derm Venereol*, 95: 542-8.
- Rötzer, Vera, Eva Hartlieb, Franziska Vielmuth, Martin Gliem, Volker Spindler, and Jens Waschke. 2015. 'E-cadherin and Src associate with extradesmosomal Dsg3 and modulate desmosome assembly and adhesion', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72: 4885-97.
- Rötzer, Vera, Eva Hartlieb, Julia Winkler, Elias Walter, Angela Schlipp, Miklós Sardy, Volker Spindler, and Jens Waschke. 2016. 'Desmoglein 3-Dependent Signaling Regulates Keratinocyte Migration and Wound Healing', *Journal of Investigative Dermatology*, 136: 301-10.
- Rübsam, M., J. A. Broussard, S. A. Wickström, 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 Harbor perspectives in biology*, 10.
- Saito, Akira C, Tomohito Higashi, and Hideki Chiba. 2023. 'Tight-junction strand networks and tightness of the epithelial barrier', *Microscopy*, 72: 213-25.
- Saito, Masataka, Sara N. Stahley, Christopher Y. Caughman, Xuming Mao, Dana K. Tucker, Aimee S. Payne, Masayuki Amagai, and Andrew P. Kowalczyk. 2012. 'Signaling dependent and independent mechanisms in pemphigus vulgaris blister formation', *PloS one*, 7: e50696-e96.
- Sajda, Thomas, and Animesh A. Sinha. 2018. 'Autoantibody Signaling in Pemphigus Vulgaris: Development of an Integrated Model', *Frontiers in Immunology*, 9.
- Sanz, María Jesús, Julio Cortijo, and Esteban J. Morcillo. 2005. 'PDE4 inhibitors as new anti-inflammatory drugs: Effects on cell trafficking and cell adhesion molecules expression', *Pharmacology & Therapeutics*, 106: 269-97.
- Schafer, Peter H., Mary Adams, Gerald Horan, Francesca Truzzi, Alessandra Marconi, and Carlo Pincelli. 2019. 'Apremilast Normalizes Gene Expression of Inflammatory Mediators in Human Keratinocytes and Reduces Antigen-Induced Atopic Dermatitis in Mice', *Drugs in R&D*, 19: 329-38.
- Schafer, PH, A Parton, AK Gandhi, L Capone, M Adams, L Wu, JB Bartlett, MA Loveland, A Gilhar, Y-F Cheung, GS Baillie, MD Houslay, H-W Man, GW Muller, and DI Stirling. 2010. 'Apremilast, a cAMP phosphodiesterase-4 inhibitor, demonstrates anti-inflammatory activity in vitro and in a model of psoriasis', *British Journal of Pharmacology*, 159: 842-55.
- Schett, G., V. S. Sloan, R. M. Stevens, and P. Schafer. 2010. 'Apremilast: a novel PDE4 inhibitor in the treatment of autoimmune and inflammatory diseases', *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 2: 271-8.
- 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: 1305-17.
- Schlögl, Elisabeth, Mariya Y. Radeva, Franziska Vielmuth, Camilla Schinner, Jens Waschke, and Volker Spindler. 2018. 'Keratin Retraction and Desmoglein3 Internalization Independently Contribute to Autoantibody-Induced Cell Dissociation in Pemphigus Vulgaris', *Frontiers in Immunology*, 9.
- Schmidt, Enno, Michael Kasperkiewicz, and Pascal Joly. 2019. 'Pemphigus', *The Lancet*, 394: 882-94.
- Schmidt, Enno, Michael Sticherling, Miklós Sárdy, Rüdiger Eming, Matthias Goebeler, Michael Hertl, Silke C. Hofmann, Nicolas Hunzelmann, Johannes S. Kern, Harald Kramer, Alexander Nast, Hans-Dieter Orzechowski, Christiane Pfeiffer, Volker Schuster, Cassian Sitaru, Miriam Zidane, Detlef Zillikens, and Margitta Worm. 2020. 'S2k guidelines for the treatment of pemphigus vulgaris/foiaceus and bullous pemphigoid: 2019 update', *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 18: 516-26.
- Schmitt, T., and J. Waschke. 2021. 'Autoantibody-Specific Signalling in Pemphigus', *Front Med (Lausanne)*, 8: 701809.
- Schultz, Heather Yarnall, Luis A. Diaz, David A. Sirois, Victoria P. Werth, and Sergei A. Grando. 2011. 'Generating Consensus Research Goals and Treatment Strategies for Pemphigus and Pemphigoid: The 2010 JC Bystryn Pemphigus and Pemphigoid Meeting', *Journal of Investigative Dermatology*, 131: 1395-99.

- Seltmann, Kristin, Wera Roth, Cornelia Kröger, Fanny Loschke, Marcell Lederer, Stefan Hüttelmaier, and Thomas M. Magin. 2013. 'Keratins Mediate Localization of Hemidesmosomes and Repress Cell Motility', *Journal of Investigative Dermatology*, 133: 181-90.
- Serezani, Carlos H., Megan N. Ballinger, David M. Aronoff, and Marc Peters-Golden. 2008. 'Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function', *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 39: 127-32.
- Sielski, L., J. Baker, M. C. DePasquale, K. Attwood, K. Seiffert-Sinha, and A. A. Sinha. 2022. 'Desmoglein compensation hypothesis fidelity assessment in Pemphigus', *Front Immunol*, 13: 969278.
- Sigmund, Anna M., Desalegn T. Egu, Jens Waschke, and Franziska Vielmuth. 2020. 'Dsg2 Upregulation as a Rescue Mechanism in Pemphigus', *The FASEB Journal*, 34: 1-1.
- Sigmund, Anna M., Markus Winkler, Sophia Engelmayer, Daniela Kugelmann, Desalegn T. Egu, Letyfee S. Steinert, Michael Fuchs, Matthias Hiermair, Mariya Y. Radeva, Franziska C. Bayerbach, Elisabeth Butz, Stefan Kotschi, Christoph Hudemann, Michael Hertl, Sunil Yeruva, Enno Schmidt, Amir S. Yazdi, Kamran Ghoreschi, Franziska Vielmuth, and Jens Waschke. 2023. 'Apremilast prevents blistering in human epidermis and stabilizes keratinocyte adhesion in pemphigus', *Nature Communications*, 14: 116.
- Simard, M., S. Morin, G. Rioux, R. Séguin, 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.
- Sinha, Animesh A., and Thomas Sajda. 2018. 'The Evolving Story of Autoantibodies in Pemphigus Vulgaris: Development of the "Super Compensation Hypothesis"', *Frontiers in Medicine*, 5.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goekke, B. J. Olson, and D. C. Klenk. 1985. 'Measurement of protein using bicinchoninic acid', *Anal Biochem*, 150: 76-85.
- South, A. P., H. Wan, M. G. Stone, P. J. Dopping-Hepenstal, P. E. Purkis, J. F. Marshall, I. M. Leigh, R. A. Eady, I. R. Hart, and J. A. McGrath. 2003. 'Lack of plakophilin 1 increases keratinocyte migration and reduces desmosome stability', *J Cell Sci*, 116: 3303-14.
- 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: 1655-64.
- Spindler, V., D. Peter, G. S. Harms, E. Asan, and J. Waschke. 2011. 'Ultrastructural analysis reveals cAMP-dependent enhancement of microvascular endothelial barrier functions via Rac1-mediated reorganization of intercellular junctions', *Am J Pathol*, 178: 2424-36.
- 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: 6831-8.
- Spindler, V., and J. Waschke. 2018. 'Pemphigus-A Disease of Desmosome Dysfunction Caused by Multiple Mechanisms', *Front Immunol*, 9: 136.
- Spindler, Volker, Rüdiger Eming, Enno Schmidt, Masayuki Amagai, Sergei Grando, Marcel F. Jonkman, Andrew P. Kowalczyk, Eliane J. Müller, Aimee S. Payne, Carlo Pincelli, Animesh A. Sinha, Eli Sprecher, Detlef Zillikens, Michael Hertl, and Jens Waschke. 2018. 'Mechanisms Causing Loss of Keratinocyte Cohesion in Pemphigus', *Journal of Investigative Dermatology*, 138: 32-37.
- Spindler, Volker, Vera Rötzer, Carina Dehner, Bettina Kempf, Martin Gliem, Mariya Radeva, Eva Hartlieb, Gregory S. Harms, Enno Schmidt, and Jens Waschke. 2013. 'Peptide-mediated desmoglein 3 crosslinking prevents pemphigus vulgaris autoantibody-induced skin blistering', *The Journal of Clinical Investigation*, 123: 800-11.
- Spindler, Volker, Nicolas Schlegel, and Jens Waschke. 2010. 'Role of GTPases in control of microvascular permeability', *Cardiovascular Research*, 87: 243-53.
- Stenn, Kurt S., Richard Link, Gisela Moellmann, Joseph Madri, and Elizabeth Kuklinska. 1989. 'Dispase, a Neutral Protease From Bacillus Polymyxa, Is a Powerful Fibronectinase and Type IV Collagenase', *Journal of Investigative Dermatology*, 93: 287-90.

- Stern, J. N., D. B. Keskin, N. Barteneva, J. Zuniga, E. J. Yunis, and A. R. Ahmed. 2008. 'Possible role of natural killer cells in pemphigus vulgaris - preliminary observations', *Clin Exp Immunol*, 152: 472-81.
- Subadra, K., S. S., and S. A. Warriar. 2021. 'Oral Pemphigus Vulgaris', *Cureus*, 13: e18005.
- Takahashi, H., Motoshi Kinouchi, Toshiya Tamura, Akemi Ishida-Yamamoto, and Hajime 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', *Archives of Dermatological Research*, 290: 407-12.
- Tavakolpour, Soheil. 2018. 'Pemphigus trigger factors: special focus on pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus', *Archives of Dermatological Research*, 310: 95-106.
- Todorovic, Viktor, Jennifer L. Koetsier, Lisa M. Godsel, and Kathleen J. Green. 2014. 'Plakophilin 3 mediates Rap1-dependent desmosome assembly and adherens junction maturation', *Molecular biology of the cell*, 25: 3749-64.
- Torres, T., and L. Puig. 2018. 'Apremilast: A Novel Oral Treatment for Psoriasis and Psoriatic Arthritis', *Am J Clin Dermatol*, 19: 23-32.
- Tsang, S. M., L. Liu, M. T. Teh, A. Wheeler, R. Grose, I. R. Hart, D. R. Garrod, F. Fortune, and H. Wan. 2010. 'Desmoglein 3, via an interaction with E-cadherin, is associated with activation of Src', *PLoS one*, 5: e14211.
- Tsunoda, Kazuyuki, Takayuki Ota, Miyo Aoki, Taketo Yamada, Tetsuo Nagai, Taneaki Nakagawa, Shigeo Koyasu, Takeji Nishikawa, and Masayuki Amagai. 2003. 'Induction of Pemphigus Phenotype by a Mouse Monoclonal Antibody Against the Amino-Terminal Adhesive Interface of Desmoglein 3', *The Journal of Immunology*, 170: 2170-78.
- 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: 1033-43.
- van Beek, N, D Zillikens, and E Schmidt. 2019. 'Aktuelle Therapie des Pemphigus', *Der Hautarzt*, 70: 243-53.
- van Beek, Nina, Detlef Zillikens, and Enno Schmidt. 2018. 'Diagnosis of autoimmune bullous diseases', *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 16: 1077-91.
- 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)*, 238: e14006.
- Vielmuth, F., J. Waschke, and V. Spindler. 2015. 'Loss of Desmoglein Binding Is Not Sufficient for Keratinocyte Dissociation in Pemphigus', *J Invest Dermatol*, 135: 3068-77.
- Vielmuth, Franziska, Volker Spindler, and Jens Waschke. 2018. 'Atomic Force Microscopy Provides New Mechanistic Insights into the Pathogenesis of Pemphigus', *Frontiers in Immunology*, 9.
- Vielmuth, Franziska, Marie-Therès Wanuske, Mariya Y. Radeva, Matthias Hiermaier, Daniela Kugelmann, Elias Walter, Fanny Buechau, Thomas M. Magin, Jens Waschke, and Volker Spindler. 2018. 'Keratins Regulate the Adhesive Properties of Desmosomal Cadherins through Signaling', *Journal of Investigative Dermatology*, 138: 121-31.
- Vodo, D., O. Sarig, and E. Sprecher. 2018. 'The Genetics of Pemphigus Vulgaris', *Front Med (Lausanne)*, 5: 226.
- 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.
- Wanuske, Marie-Therès, Dominique Brantschen, Camilla Schinner, Chiara Stüdle, Elias Walter, Matthias Hiermaier, Franziska Vielmuth, Jens Waschke, and Volker Spindler. 2021. 'Clustering of desmosomal cadherins by desmoplakin is essential for cell-cell adhesion', *Acta Physiologica*, 231: e13609.

- Waschke, J. 2008. 'The desmosome and pemphigus', *Histochem Cell Biol*, 130: 21-54.
- 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: 3157-65.
- Waschke, Jens. 2019. 'Desmogleins as signaling hubs regulating cell cohesion and tissue/organ function in skin and heart — EFEM lecture 2018', *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 226: 96-100.
- Waschke, Jens, and Volker Spindler. 2014. 'Desmosomes and Extradесmosomal Adhesive Signaling Contacts in Pemphigus', *Medicinal Research Reviews*, 34: 1127-45.
- Waschke, Jens, Volker Spindler, Paola Bruggeman, Detlef Zillikens, Gudula Schmidt, and Detlev Drenckhahn. 2006. 'Inhibition of Rho A activity causes pemphigus skin blistering', *The Journal of cell biology*, 175: 721-27.
- Wei, Chapman, Adam J. Friedman, and Ronald B. Prussick. 2020. 'Psoriasis improvement and satisfaction in patients utilizing a clobetasol spray and oral apremilast combination regimen—a pilot study', *Journal of the American Academy of Dermatology*.
- Welsch, Ulrich, Wolfgang Kummer, and Thomas Deller. 2018. *Histologie* (Elsevier: München).
- Werth, Victoria P., Pascal Joly, Daniel Mimouni, Emanuel Maverakis, Frédéric Caux, Patricia Lehane, Liudmila Gearhart, Audrey Kapre, Pooneh Pordeli, and Diana M. Chen. 2021. 'Rituximab versus Mycophenolate Mofetil in Patients with Pemphigus Vulgaris', *New England Journal of Medicine*, 384: 2295-305.
- Wheatley, Sally P, and Yu-li Wang. 1998. 'Indirect immunofluorescence microscopy in cultured cells.' in, *Methods in cell biology* (Elsevier).
- Wilgram, George F., James B. Caulfield, and Walter F. Lever. 1961. 'An Electron Microscopic Study of Acantholysis in Pemphigus Vulgaris\*', *Journal of Investigative Dermatology*, 36: 373-82.
- 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.
- Yeruva, S., and J. Waschke. 2023. 'Structure and regulation of desmosomes in intercalated discs: Lessons from epithelia', *J Anat*, 242: 81-90.
- Yeruva, Sunil, Ellen Kempf, Desalegn Tadesse Egu, Daniela Kugelmann, and Jens Waschke. 2020. 'Adrenergic signaling-induced ultrastructural strengthening of intercalated discs via PG is crucial for positive adhesiotropy in murine cardiomyocytes', *The FASEB Journal*, 34: 1-1.
- 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.
- Yulis, M., D. H. M. Kusters, and A. Nusrat. 2018. 'Cadherins: cellular adhesive molecules serving as signalling mediators', *J Physiol*, 596: 3883-98.
- Zhang, Xiaoli, Yuqing Chen, Liyu Fan, Jiaqi Ye, Junsheng Fan, Xinjie Xu, Danming You, Sihan Liu, Xin Chen, and Peng Luo. 2018. 'Pharmacological mechanism of roflumilast in the treatment of asthma-COPD overlap', *Drug design, development and therapy*, 12: 2371-79.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase ( <i>engl. adenylyl cyclase</i> ); nach HGNC: ADCY
AFM	Rasterkraftmikroskopie ( <i>engl. Atomic Force Microscopy</i> )
AK23	Monoklonaler pathogener Dsg3-Antikörper aus einem Mausmodell
ANOVA	Varianzanalyse ( <i>engl. Analysis of variance</i> )
Apr	Apremilast (PDE4-Hemmer)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>engl. Bovine Serum Albumin</i> )
c-IgG	Aufgereinigte IgG-Fraktion aus Seren von gesunden Spendern
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ion
cAMP	Zyklisches Adeonodinmonophosphat ( <i>engl. Cyclic adenosine monophosphate</i> )
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CREB	<i>engl. cAMP response element binding protein</i>
Cu <sup>2</sup>	Kupfer-Ion
DMEM	<i>engl. Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP	Desmoplakin
Dsc	Desmocollin; nach HGNC: DSC
Dsg	Desmoglein; nach HGNC: DSG
DTT	Dithiothreitol
E-Cad	E-Cadherin
ECL	<i>engl. Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor ( <i>engl. Epidermal Growth Factor Receptor</i> )
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
Epac	<i>engl. exchange protein directly activated by cAMP</i>
ERK	<i>engl. extracellular signal-regulated kinase</i>
F/R	Forskolin/Rolipram
FCS	Fetales Kälberserum ( <i>engl. Fetal calf serum</i> )
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
H89	Proteinkinase A - Inhibitor

---

HaCaT	Immortalisierte humane Keratinozyten ( <i>engl. human low calcium elevated temperature cells</i> )
HBSS	<i>engl. Hanks' Balanced Salt solution</i>
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HGNC	HUGO Gen Nomenklatur Komitee
HLA	Humane Leukozytenantigene
IgG	Immunglobulin G
KO	Knockout
KRT	Keratinfilament
MAPK	<i>engl. mitogen-activated protein kinase</i>
MEK	Mauskeratinozyten
MEK1	<i>engl. Mitogen-activated protein kinase kinase 1</i> ; nach HGNC: MAP2K1
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Miligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mM	Milimolar
mmol/l	Milimol pro Liter
NGS	Normales Ziegenserum ( <i>engl. normal goat serum</i> )
NHEK	Primäre normale humane Keratinozyten
nm	Nanometer
NPG	n-Propylgallat
PBS	Phosphat-gepufferte Salzsäure
PDE	Phosphodiesterase
PF	Pemphigus foliaceus
PG	Plakoglobin
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKP	Plakophilin
pmol/ml	Pikomol pro Milliliter
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PV	Pemphigus vulgaris
PV-IgG	Aufgereinigte IgG-Fraktion aus Seren von Pemphigus vulgaris Patienten
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat

Src	Tyrosinkinase (Rous-Sarkom-Virus)
Tbl.	Tablette
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TrkA	Tropomyosin-Rezeptorkinase A; nach HGNC: NTRK1
WT	Wildtyp
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar

## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Personen danken, deren Mithilfe diese Arbeit überhaupt erst möglich gemacht haben.

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Jens Waschke für seine fachliche Betreuung und den konstruktiven Austausch danken. Vielen Dank für die Unterstützung in all den Jahren und das in mich gesetzte Vertrauen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Franziska Vielmuth. Ohne deinen fortwährenden Beistand und dein umfangreiches Wissen wäre diese Promotion nicht zustande gekommen. Besonders danken möchte ich Dir für die fleißigen Korrekturen an dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich allen Mitarbeitern im Labor für die Einarbeitung, Unterstützung und schönen Labortage danken. Ein besonderer Dank gilt dabei Michael Fuchs, Martina Hitzenbichler, Kilian Skowranek und Anna Sigmund. Ihr habt mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden und mich durch die kurzweiligen Mittagspausen die langen Labortage durchstehen lassen. Dank Euch werde ich die Zeit in der anatomischen Anstalt für immer in guter Erinnerung behalten. Ein großer Dank gilt außerdem Tabea Kunz, die mir als Mitdoktorandin moralisch beigestanden hat und eine Freundin für mich geworden ist.

Meinen Freunden und insbesondere meinen Mitbewohnerinnen gebührt ein besonderer Dank! Ihr habt mir durchweg zur Seite gestanden und ganz viel Kraft und Mut gegeben, damit diese Arbeit ein erfolgreiches Ende findet. Danke euch für Eure Freundschaft!

Aber vor allem möchte ich meiner Familie danken. Eure Liebe und Unterstützung haben mich während all der Jahren getragen. Dafür bin ich euch wahnsinnig dankbar.



## 10 Affidativ



### Eidesstattliche Versicherung

Engelmayer, Sophia

\_\_\_\_\_  
Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

#### **cAMP-abhängige Regulation der desmosomalen Haftung und ihr Einfluss auf die Pemphigus-Pathogenese**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

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

Augsburg, den 04.08.2024

Sophia Engelmayer

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

## 11 Publikationsliste

2023      Apremilast prevents blistering in human epidermis and stabilizes  
keratinocyte adhesion in pemphigus

Anna M. Sigmund, Markus Winkler, Sophia Engelmayer,  
Daniela Kugelmann, Desalegn T. Egu, Letyfee S. Steinert, Michael  
Fuchs, Matthias Hiermair, Mariya Y. Radeva, Franziska C. Bayerbach,  
Elisabeth Butz, Stefan Kotschi, Christoph Hudemann, Michael Hertl,  
Sunil Yeruva, Enno Schmidt, Amir S. Yazdi, Kamran Ghoreschi,  
Franziska Vielmuth, Jens Waschke

*Nat Commun* 14, 116 (2023)