

Aus dem  
Lehrstuhl für Vegetative Anatomie, Anatomische Anstalt  
Institut der Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. Jens Waschke

**Untersuchung der Zytoskelettveränderungen  
bei Pemphigus vulgaris**

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

vorgelegt von  
Elisabeth Schlögl

aus  
Oberpullendorf

Jahr  
2025



Aus dem  
Lehrstuhl für Vegetative Anatomie, Anatomische Anstalt  
Institut der Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. Jens Waschke

**Untersuchung der Zytoskelettveränderungen  
bei Pemphigus vulgaris**

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

vorgelegt von  
Elisabeth Schlögl

aus  
Oberpullendorf

Jahr  
2025

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Volker Spindler  
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Franziska Ruëff  
Prof. Dr. Rudolf A. Rupec  
Prof. Dr. Jürgen Schauber

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 20.03.2025

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	xi
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Die Haut	1
1.2 Interzelluläre Haftkontakte	2
1.3 Das Desmosom	3
1.3.1 Struktur	4
1.3.2 Desmosomale Cadherine	6
1.3.3 Auf- und Abbau von Desmosomen	6
1.4 Das Zytoskelett	8
1.4.1 Keratinintermediärfilamente	9
1.4.2 Auf- und Abbau	9
1.5 Die Verankerung der Desmosomen am Keratinzytoskelett	11
1.6 Pemphigus	12
1.6.1 Klinik und Diagnostik	12
1.6.2 Therapie	14
1.6.3 Pathogenese	15
1.7 Casein-Kinase-1	18
1.8 Fragestellung	19
<b>2 Methoden</b>	<b>21</b>
2.1 Zellkultur	21
2.2 Mediatoren und Antikörper	22
2.2.1 Mediatoren	22
2.2.2 Antikörper	23

2.3 Pathogener Anti-Dsg3-Antikörper, Patientenseren und Aufrei-	
nigung	24
2.4 DNA Konstrukte	25
2.4.1 Transformation in Escherichia coli	25
2.4.2 DNA Aufreinigung	26
2.4.3 Transiente Transfektion	26
2.5 Immunfluoreszenzdarstellung	27
2.6 Lebendzellmikroskopie	28
2.7 Proteinquantifizierung	29
2.8 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese und Western-Blot-	
Analyse	30
2.9 Triton-X-100 Proteinfractionierung	32
2.10 Biotinylierungsversuch	33
2.11 Phos-Tag Versuch	34
2.12 Dispase-basierter Keratinozytendissoziationsversuch	35
2.13 Bilddatenanalyse	36
2.13.1 Immunfluoreszenzfärbungen	36
2.13.2 Lebendzellmikroskopie	36
2.14 Statistik und Auswertung	38
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>41</b>
3.1 PV-IgG induziert Veränderungen der Keratin- und Dsg3-	
Verteilung	41
3.1.1 PV-IgG führt zur Keratinretraktion und Dsg3-Depletion	41
3.1.2 PV-IgG führt zum Haftungsverlust in der Keratinozy-	
tenkultur	45
3.1.3 Frühe Veränderungen des Keratinzytoskeletts	46
3.1.4 Keratin-Bundling	48
3.1.5 Dsg3-Internalisierung und -Aggregation	50
3.2 Keratinumverteilung durch CK-1-Inhibition	56
3.3 CK-1-Inhibition führt zu Dsg3-Aggregationen	61
3.4 Keratinretraktion durch PV-IgG trotz gehemmter Dsg3-	
Internalisierung	65

---

<b>4 Diskussion</b>	<b>71</b>
4.1 Keratinveränderungen finden vor der Internalisierung von desmosomalen Adhäsionsmolekülen statt . . . . .	71
4.1.1 Pemphigus vulgaris-Autoantikörper modifizieren frühzeitig das Keratinzytoskelett . . . . .	71
4.1.2 Rolle der Keratinveränderungen am initialen Haftungsverlust . . . . .	72
4.1.3 Beeinflussung der Überexpression von CK5 sowie Dsg3 für die Reaktion auf Pemphigus-Antikörper . . . . .	73
4.2 Unabhängige Regulationsmechanismen der strukturellen Veränderungen von Keratinen und Dsg3 . . . . .	75
4.2.1 Keratinretraktion führt nicht zur Dsg3-Internalisierung	75
4.2.2 Dsg3-Aggregationen als Resultat entkoppelter Zytokeratine . . . . .	76
4.2.3 Keratinretraktion durch PV-Autoantikörper ist kein Resultat der Dsg3-Internalisierung . . . . .	77
4.3 Zeitliche Einordnung der strukturellen Veränderungen in Bezug zum Haftungsverlust bei Pemphigus vulgaris . . . . .	77
4.4 Ausblick . . . . .	79
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>81</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>99</b>
<b>Danksagung</b>	<b>102</b>
<b>Affidavit</b>	<b>104</b>
<b>Übereinstimmungserklärung</b>	<b>105</b>



# Abbildungsverzeichnis

1.1 Aufbau des Desmosoms . . . . .	5
1.2 Auf- und Abbau der Keratinintermediärfilamente . . . . .	10
1.3 Pemphigus vulgaris . . . . .	14
3.1 Zytoskelettveränderungen unter statischen Bedingungen . . . . .	42
3.2 CK5 und Dsg3 Fluoreszenzintensität unter statischen Bedin- gungen . . . . .	43
3.3 Proteinmengen nach PV1-IgG-Inkubation in der Triton X-100 unlöslichen Fraktion . . . . .	44
3.4 Haftungsverlust nach PV1-IgG-Inkubation . . . . .	45
3.5 Keratinbrücken unter 2 h PV-IgG-Inkubation . . . . .	47
3.6 Abnahme der CK5 Fluoreszenzintensität in der Zellperipherie unter 2 h PV1-IgG-Inkubation . . . . .	48
3.7 Keratinbündel als Folge der PV1-IgG-Inkubation . . . . .	49
3.8 Auswertung der Keratinbündel . . . . .	50
3.9 Keratin- und Dsg3-Veränderungen unter 2 h PV1-IgG . . . . .	51
3.10 Analyse der CK5 und Dsg3 Fluoreszenzintensität unter 2 h PV1-IgG . . . . .	52
3.11 Dsg3-Verteilung unter 2 h PV1-IgG in HaCaT-Wildtypzellen . . . . .	53
3.12 Dsg3-Internalisierung in HaCaT-CK5-Zellen unter PV2-IgG- Inkubation . . . . .	54
3.13 Zunehmende Dsg3-Aggregationen unter PV1-IgG-Inkubation . . . . .	55
3.14 Engmaschige Verlaufskontrolle der Zellhaftung unter 2 h PV2- IgG-Inkubation . . . . .	56

---

3.15 Keratinumverteilung nach CK-1-Inhibition . . . . .	57
3.16 Veränderte CK14-Phosphorylierung nach CK-1-Inhibition . . .	58
3.17 p38MAPK-Phosphorylierung nach 1 h CK-1-Inhibition . . . . .	59
3.18 Die Rolle der p38MAPK-Aktivierung für die Zellhaftung nach stattgehabter Keratinretraktion durch D4476 . . . . .	60
3.19 Der Effekt von AK23 nach stattgehabter Keratinretraktion durch D4476 . . . . .	61
3.20 Lebendzellaufnahmen unter D4476 und PV2-IgG . . . . .	62
3.21 D4476 und PV1-IgG in der Immunfluoreszenzdarstellung . . .	63
3.22 Keine Dsg3-Internalisierung nach alleiniger CK-1-Inhibition . .	64
3.23 Vermehrte Dsg3-Aggregationen nach CK-1-Inhibition . . . . .	65
3.24 Analyse der CK5- und Dsg3-Veränderungen unter $\beta$ -MCD und PV2-IgG . . . . .	66
3.25 Reduzierte Dsg3-Internalisierung nach Cholesteroldepletion . .	67
3.26 p38-Aktivierung unter $\beta$ -MCD und PV2-IgG . . . . .	68
3.27 Cholesteroldepletion verbessert die Zellhaftung unter PV2- IgG-Inkubation . . . . .	69
4.1 Zusammenfassung . . . . .	78

# Tabellenverzeichnis

2.1 Mediatoren	22
2.2 Primärantikörper	23
2.3 Sekundärantikörper	24
2.4 PV-IgG ELISA-Titer	25



# Zusammenfassung

Pemphigus vulgaris ist eine potentiell tödliche Autoimmundermatose, die mit Blasenbildung an Körperstamm und Schleimhäuten einhergeht. Ursächlich für diese Blasenbildung sind Antikörper (PV-IgG) gegen die desmosomalen Komponenten Desmoglein (Dsg)1 und Dsg3. Die Extrazellulärdomänen dieser Moleküle vermitteln den interzellulären Kontakt, die zytopasmatische Kopplung an Keratinfilamente verleiht Stabilität. Die Antikörperbindung bei Pemphigus vulgaris führt zur Depletion von Dsg3 sowie zur Zytokeratinretraktion. Obwohl diese Veränderungen kennzeichnend für die Pathogenese der Erkrankung sind, sind ihr genauer zeitlicher Ablauf sowie Abhängigkeit voneinander unklar. In Lebendzellaufnahmen von immortalisierten humanen Keratinozyten konnte 60 Minuten nach PV-IgG-Inkubation eine Keratinretraktion in der Zellperipherie erfasst werden, ehe sich verdickte Keratinbündel Stunden später ausbildeten. Die frühe Keratinretraktion korrelierte zeitlich mit dem Haftungsverlust. Die Dsg3-Internalisierung hingegen wurde erst nach 90 Minuten detektiert. Ein pharmakologischer Ansatz sollte mögliche Abhängigkeiten klären. Die Hemmung der Casein-Kinase-1 führte zu einer Keratinretraktion, die phänotypisch der in Pemphigus beobachteten ähnelt. Diese induzierte Keratinretraktion hatte keine Dsg3-Internalisierung zur Folge, durch zusätzliche Gabe von PV-IgG war sie jedoch möglich. Umgekehrt verhinderte die Hemmung der Dsg3-Internalisierung durch Cholesteroldepletion die Keratinretraktion unter PV-IgG ebenso nicht. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass Keratinveränderungen früh nach Antikörperbindung auftreten und mit dem Haftungsverlust korrelieren. Die Veränderungen scheinen unabhängig von der Dsg3-Depletion zu sein und entscheidend am initialen Haftungsverlust beizutragen.



# 1 Einleitung

## 1.1 Die Haut

Die Haut besteht aus der Epidermis (epithelialer Anteil) und Dermis (bindegewebiger Anteil) und bildet zusammen mit der darunterliegenden fettzellreichen Subkutis die Hautdecke (Integumentum commune). Mit einer Fläche von etwa zwei Quadratmetern ist sie das größte Organ des menschlichen Körpers und erfüllt neben der Abgrenzung zur Umwelt weitere lebenswichtige Funktionen. Über Sinnesrezeptoren werden Reize aus der Umgebung wahrgenommen und durch die Gefäßarchitektur und Schweißdrüsen nimmt die Haut außerdem eine wichtige Stellung in der Thermoregulation ein [77]. Zudem bildet die Haut unter UV-Einstrahlung Vitamin D3 [22].

Die Epidermis als äußerste Schicht bildet die eigentliche Abgrenzung zur Umgebung und bietet Schutz vor Austrocknung, Eintritt von Mikroorganismen und Umwelteinflüssen [96]. Sie besteht zu über 90 Prozent aus Keratinozyten, die ein mehrschichtiges, verhornendes Epithel formen. Weitere Zellen sind Merkel-Zellen, Langerhans-Zellen, Melanozyten sowie Lymphozyten. Die Keratinozyten durchlaufen in ihren Schichten einen Reifungsprozess, ehe sie verhornen und durch mechanische Reize abgeschilfert werden. Dieser Zyklus der Zellerneuerung dauert in etwa 4 Wochen. Die Schichten der Epidermis lassen sich lichtmikroskopisch unterscheiden und sind Ausdruck der verschiedenen Differenzierungsstadien. Das Stratum basale besteht aus einer einzelnen Schicht kubischer oder hochprismatischer Zellen, die mit der Basallamina verankert sind. Es stellt die Abgrenzung zur Dermis dar. Sowohl Stammzellen als auch teilungsfreudige Progenitorzellen sind hier angesiedelt. Die Progeni-

torzellen stellen den Ausgangspunkt der Differenzierung dar [77]. Es folgen mehrere Zellschichten des Stratum spinosum (Stachelzellschicht) und des Stratum granulosum (Körnerschicht). Im letzteren sind erste Verhornungszeichen im Sinne von Keratohyalin granula erkennbar. Die oberflächlichste Schicht der Haut ist das Stratum corneum, das aus toten, verhornten Zellen besteht.

Gefäße zur Versorgung verlaufen in der Dermis, die Epidermis selbst ist gefäßfrei und wird ausschließlich über Diffusion ernährt. Die Trennung zwischen Dermis und Epidermis erfolgt durch die Basalmembran, welche zum Extrazellulärraum zählt und vor allem aus Kollagen IV, Fibronectin und Laminin besteht. Die Haftung der epidermalen Basalzellschicht an der Basalmembran erfolgt über Hemidesmosomen. Über die Basalmembran erfolgt die Übertragung einwirkender Scherkräfte auf die Kollagenfasern der darunterliegenden Dermis [77].

## 1.2 Interzelluläre Haftkontakte

Die Kommunikation zwischen benachbarten Zellen wird über spezialisierte Kontakte vermittelt. Abhängig von ihrer Struktur und Funktion lassen sich drei Gruppen unterscheiden: Kommunikationskontakte (Nexus, Gap Junction), Verschlusskontakte (Zonulae occludentes, Tight Junction) und Adhäsionskontakte.

Kommunikationskontakte ermöglichen die elektrische und metabolische Kommunikation zwischen benachbarten Zellen, sodass diese als funktionelle Einheit arbeiten können. Zwischen den benachbarten Plasmamembranen liegt ein 2-4 nm schmaler Spalt, der von Transmembranproteinen, den Connexinen, überbrückt wird. Diese Connexine formen Kanäle, die für kleine Moleküle (kleiner als ein Kilodalton) und Elektrolyte passierbar sind. Eine besondere Rolle kommt Kommunikationskontakten im Herzmuskel zu, wo sie elementar für die geordnete elektrische Ausbreitung sind [87].

Verschlusskontakte verlaufen gürtelförmig um die Zelle und versiegeln durch ihre Transmembranproteine Claudin und Occludin den Extrazellulärraum, sodass eine dichte Permeabilitätsbarriere entsteht. Dieser Mechanismus ist für die Polarität von Epithelien entscheidend. Es handelt sich um ein

dynamisches Konstrukt, welches durch vorübergehende Lücken oder spezifische Claudin-Moleküle eine selektive Permeabilität sicherstellt. Intrazellulär sind die Transmembranproteine über die Adapterproteine Zonula-occludens-Proteine-1 und -2 mit dem Aktinzytoskelett verbunden. Zur mechanischen Stabilität sind diese junctionalen Adhäsionsmoleküle sowie die räumliche Nähe zu mechanischen Kontakten (Adhäsionskontakte) notwendig [77].

Adhäsionskontakte sorgen im Zellverband für die mechanische Stabilität und verankern die Zellen untereinander (Zell-Zell-Kontakte). Sie sind vor allem in Geweben wie der Haut von Bedeutung, die besonderer mechanischer Beanspruchung unterliegen. Zu den Zell-Zell-Kontakten zählen Desmosomen und Adhärensjunctionen (Zonulae adhaerentes) [22]. Der Aufbau aus Transmembranproteinen, Plaque-Proteinen und dem inserierenden Zytoskelett ist bei beiden gleich. Unterschiede liegen in der jeweiligen Zusammensetzung der Proteine sowie den assoziierten Zytoskelettelementen [41, 77]. In Kapitel 1.3 werden Desmosomen behandelt. Adhärensjunctionen verlaufen je nach Epitheltyp gürtelförmig um die Zelle oder verbinden sie punktförmig mit den Nachbarzellen. Als Transmembranproteine sind Cadherine über Plaqueproteine mit dem Zytoskelett in Kontakt. Hierbei wird in Epithelien überwiegend E-Cadherin exprimiert, in Nervenzellen N-Cadherin. Zu den Plaqueproteinen zählen  $\alpha$ -,  $\beta$ - und p120-Catenin,  $\alpha$ -Actinin und Vinculin. Intrazellulär verläuft das Aktinzytoskelett parallel zur Zellmembran und ist durch Myosin-II-Moleküle verspannt, sodass ein kontraktiler Apparat entsteht [77].

## 1.3 Das Desmosom

Desmosomen (Maculae adhaerentes) sind scheibenförmige Strukturen, die diskontinuierlich entlang der Membran angeordnet sind und den Zusammenhalt zwischen benachbarten Zellen vermitteln. Aufgrund ihres elementaren Beitrags zur Zellkohäsion und damit Stabilisierung gegenüber Zug- und Scherkräften kommen sie besonders häufig in Geweben vor, die starker mechanischer Beanspruchung ausgesetzt sind [24, 130, 93]. Dazu zählen beispielsweise die Schleimhäute, die Haut oder der Herzmuskel. Außerdem sind Desmosomen Teil des Junctionskomplexes, der in polarisierten Epithelien

ausgebildet wird. Durch den Junktionskomplex wird die strikte Unterscheidung eines luminalen (apikal) und basalen extrazellulären chemischen Milieus ermöglicht, in dem eine Zonula occludens, eine Zonula adhaerens und Desmosomen von apikal nach basal hintereinander geschaltet werden [32].

Desmosomen wurden als lichtmikroskopische Entdeckung im 19. Jahrhundert vom italienischen Pathologen Bizzozero zuerst beschrieben. Ihren heutigen Namen erhielt die Struktur allerdings erst später vom Wiener Anatomen Josef Schaffer, der die griechischen Wörter für Bindung „desmos“ und Körper „soma“ kombinierte [24]. Josef Schaffer ging wie viele seiner Zeitgenossen davon aus, dass es sich bei Desmosomen um zytoplasmagefüllte „Brücken“ zwischen benachbarten Zellen handelt. Erst elektronenmikroskopische Untersuchungen lieferten Aufschluss über die Ultrastruktur der Desmosomen als Haftkontakte.

### 1.3.1 Struktur

Elektronenmikroskopisch zeigen Desmosomen einen charakteristischen Aufbau bestehend aus einer elektronendichten Plaque in jeder der benachbarten Zellen. Zwischen ihnen liegt ein Interzellularspalt von 24-30 nm. Der Durchmesser der gesamten scheibenförmigen Struktur beträgt 0.2-0.5  $\mu\text{m}$  [89, 32]. Innerhalb einer Plaque können morphologisch drei unterschiedliche Bereiche unterschieden werden: ein äußerer, elektronendichter von einem inneren, weniger dichten Plaque sowie eine extrazelluläre Einheit [47, 88]. Hierbei ist der innere, weniger dichte Plaque an Schleifen der Keratinintermediärfilamente gekoppelt [58] (siehe Abbildung 1.1).

Diese morphologischen Unterschiede spiegeln sich auch in unterschiedlichen biochemischen Zusammensetzungen wider, wobei vor allem drei Proteingruppen vertreten sind: desmosomale Cadherine (Desmogleine und Desmocolline), Proteine der Armadillo-Familie (Plakoglobin und Plakophilin) sowie der Plakin-Familie (Desmoplakin). Desmosomale Cadherine sind transmembranöse Moleküle. Sie interagieren über ihre Extrazellulärdomänen, wodurch sie den Kontakt zu den Nachbarzellen vermitteln [36]. Diese Bereiche zeigen sich elektronenmikroskopisch als Verdichtung im Interzellularspalt,

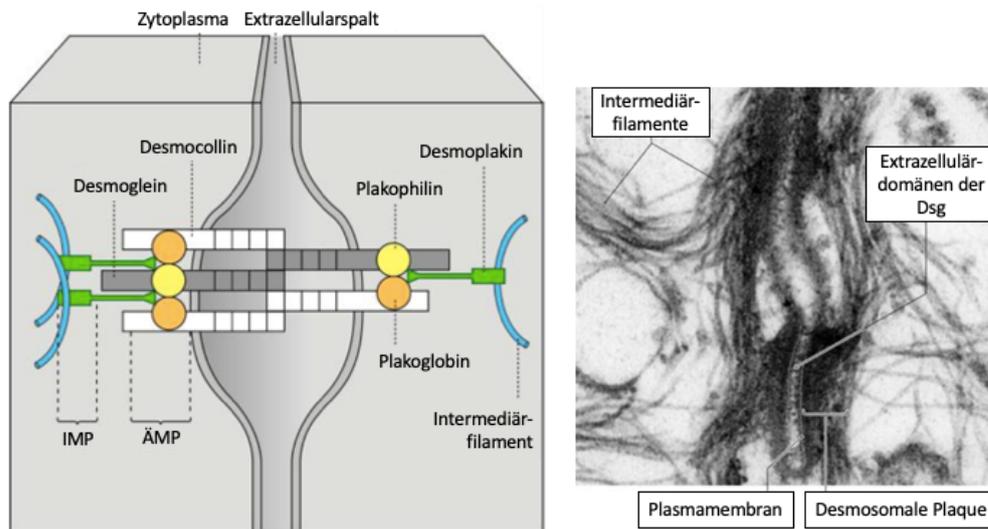


Abbildung 1.1: **Aufbau des Desmosoms.** Die Abbildung ist modifiziert nach Waschke 2008 [130]. Links wird die schematische Darstellung eines Desmosoms gezeigt. Die Extrazellulärdomänen der desmosomalen Cadherine interagieren mit denen der Nachbarzelle. Sie durchspannen die Plasmamembran und stehen mit ihren zytoplasmatischen Anteilen mit den Adapterproteinen Plakoglobin und Plakophilin in Verbindung, was sich elektronenmikroskopisch als äußere Membranplaque (ÄMP) darstellt. Die innere Membranplaque (IMP) stellt die Verbindung zu Desmoplakin dar, welches Desmosomen mit Intermediärfilamenten verknüpft. Rechts wird die Elektronenmikroskopie eines Desmosoms mit einstrahlenden Intermediärfilamenten dargestellt.

genannt Desmoglea [47]. Der zytoplasmatische Teil der desmosomalen Cadherine bindet an Plakoglobin, ein Plaqueprotein aus der Armadillo-Familie [68, 20]. Plakoglobin (Pg) seinerseits bindet an Desmoplakin [21], welches die Verbindungsstelle zum Keratinzytoskelett darstellt und damit wesentlich zur Widerstandsfähigkeit der Haftung bei äußeren Krafteinwirkungen beiträgt. Zusätzlich erfolgt eine Interaktion der desmosomalen Cadherine mit weiteren Mitgliedern der Armadillo-Familie, den Plakophilinen (Pkp) 1-3. Die Plakophilinen weisen selbst eine Vielzahl an Interaktionspartnern auf, darunter auch Desmoplakin und Intermediärfilamente [50, 8]. Sie nehmen eine Rolle in der strukturellen Zusammensetzung der Desmosomen ein, sind aber auch

Teil mehrerer zellulärer Signalkaskaden [46]. Zusammengenommen entspricht diese Verbindungsstelle aus Cadherinen und Plaqueproteinen der Armadillo-Familie der inneren, elektronendichten Plaque.

### 1.3.2 Desmosomale Cadherine

Die desmosomalen Cadherine Desmoglein (Dsg) 1-4 und Desmocollin (Dsc) 1-3 entstammen der Cadherinsuperfamilie und sind Transmembranmoleküle, die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig interzelluläre Haftung vermitteln. Ultrastrukturell setzen sie sich aus vier hochkonservierten Extrazellulärdomänen, einem variablen extrazellulären Anker, einer einzelnen Transmembrandomäne und einem intrazellulären Anker, gefolgt von intrazytoplasmatischen Domänen, zusammen [24]. Zwischen den Extrazellulärdomänen liegen Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-Bindungsstellen.  $\text{Ca}^{2+}$  ermöglicht den Domänen die Ausbildung einer rigiden Form und ist so für die interzelluläre Haftung wesentlich [94]. Die Expression der desmosomalen Cadherine ist gewebe- und differenzierungsspezifisch. In der Haut kommen alle desmosomalen Cadherine vor, wobei sich ihr Expressionsmuster im Rahmen der epidermalen Ausreifung verändert [51]. So werden Dsg2 und Dsg3 sowie Dsc2 und Dsc3 vermehrt im Stratum basale der Epidermis ausgebildet, in höheren Zellschichten dominieren Dsg1 und Dsc1 mit ihrem größten Vorkommen im Stratum spinosum. Dsg4 ist das vorherrschende Cadherin in Haarfollikeln [61, 133].

### 1.3.3 Auf- und Abbau von Desmosomen

Desmosomen sind dynamische Strukturen, die einem ständigen Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau unterliegen. Sie gewährleisten nicht nur Stabilität, sondern ebenso Plastizität, um auf äußere Einflüsse reagieren zu können. So passen sich Desmosomen unter anderem im Rahmen der epidermalen Differenzierung oder Wundheilung an. Die desmosomalen Komponenten werden nach ihrer Synthese und posttranslationalen Modifizierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Zytoskelettelemente zur Zellmembran transportiert [85]. Cadherine gelangen dabei mittels Kinesin-Motorproteinen über Mikrotubuli zur Membran [86], wo die Moleküle wahrscheinlich über laterale Ver-

schiebung in Desmosomen integriert werden [102] oder de novo Desmosomen bilden. Der Zusammenbau der zytoplasmatischen Plaqueproteine läuft anders ab. Pkp2 spielt hierbei eine zentrale Rolle. Das Molekül bildet einen Komplex mit Desmoplakin und PKC $\alpha$ , der anschließend an die Keratinintermediärfilamente bindet [9]. Die Integration in Desmosomen erfolgt im weiteren Schritt über einen Umbau des Aktinzytoskeletts und ist abhängig von der Myosin II-Aktivität [38]. Für die Ausbildung von Desmosomen ist eine extrazelluläre Kalziumkonzentration von  $>0,1$  mM nötig [48]. Die Zellverbindungen durchlaufen einen Reifungsprozess, der in Calciumunabhängigkeit endet. Dies bedeutet, dass auch nach Entzug von Calcium die Desmosomen und deren Haftfunktion stabil bleiben, was als Hyperadhäsion bezeichnet wird. Dieser Zustand kann durch die PKC $\alpha$  wieder beendet werden. Damit ist die Kinase nicht nur in die Assemblierung von Desmosomen involviert, sondern scheint insgesamt eine wichtige Rolle in der Homöostase von Desmosomen einzunehmen. Desmosomen sind stabile Konstrukte. Daten zeigen jedoch auch, dass die Cadherine, aus denen Desmosomen aufgebaut sind, einem ständigen Austausch unterliegen [137]. Dies legt nahe, dass zwei Kompartimente an Cadherinen an der Zelloberfläche bestehen: jene, die Desmosomen bilden und jene, die extradesmosomal in der Membran liegen (extradesmosomaler Pool) [117]. Die Extrazellulärdomänen dieser assemblierten „halben“ Desmosomen interagieren mit denen einer benachbarten Zelle. Die desmosomalen Cadherine können sowohl homophile Interaktionen (mit Molekülen des gleichen Typs) als auch heterophile Interaktionen (mit anderen Molekülen) ausbilden [24]. Ein wichtiges Merkmal im Rahmen des Aufbaus von Desmosomen scheint die Abhängigkeit von lipidreichen Membrandomänen (engl.: „lipid rafts“) zu sein. Lipidreiche Membrandomänen sind Organisationseinheiten innerhalb der Plasmamembran, die Sphingolipide und Cholesterol beinhalten. Diese veränderte Zusammensetzung ermöglicht durch die gesättigten Hydrocarbonsäuren eine dichtere Ordnung der Moleküle [109]. Diverse Studien zeigten eine Assoziation desmosomaler Moleküle mit Proteinen, welche typisch für lipidreiche Membrandomänen sind [119, 74]. Die Störung der Integrität dieser Membraneinheiten mit Cholesterol-depletierenden Substanzen wie Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (kurz  $\beta$ -MCD) verhindert die Assemblierung von

Desmosomen und reduziert die Zelladhäsion [119].

Zum Abbau beziehungsweise der Internalisierung desmosomaler Komponenten unter physiologischen Bedingungen ist wenig bekannt. Phosphorylierung und proteolytische Veränderungen der Cadherine scheinen bei der Endozytose der Moleküle wichtig zu sein [23]. Für unterschiedliche Mechanismen der Endozytose wurde eine Beteiligung am Desmosomenumsatz gezeigt. So scheinen Clathrin- und Dynamin-abhängige Prozesse, aber auch die Makropinozytose und eine direkte Internalisierung aus der intrajunktionalen Region eine Rolle zu spielen [41]. Eine gestörte Endozytose von Dsg3 wird im Rahmen der Autoimmunerkrankung Pemphigus vulgaris beobachtet. Die Integrität der lipidreichen Membrandomänen scheint auch hier von Bedeutung zu sein. Durch Cholesterol-Depletion kann die durch PV-Antikörper induzierte Dsg3-Internalisierung verhindert werden [119].

## 1.4 Das Zytoskelett

Das Zytoskelett durchzieht als dreidimensionales Netzwerk das Zytosol, wobei die Filamente anhand ihres Durchmessers in drei Gruppen unterteilt werden können: Aktinfilamente ( $\varnothing 7\text{nm}$ ), Intermediärfilamente ( $\varnothing 10\text{nm}$ ) und Mikrotubuli ( $\varnothing 25\text{nm}$ ). Diese Arbeit handelt in erster Linie von Keratinfilamenten, welche zu den Intermediärfilamenten zählen und der in Epithelzellen exprimierte Intermediärfilament-Typ sind. Ihnen ist das folgende Kapitel gewidmet. An dieser Stelle seien als zusätzliche Komponenten Aktinfilamente und Mikrotubuli erwähnt. Das Netzwerk bietet einerseits Stabilität und ermöglicht andererseits aufgrund seiner Dynamik die Reaktion auf unterschiedliche Stimuli. Zusammen mit speziellen Motorproteinen gewährleisten Aktinfilamente und Mikrotubuli die aktive Fortbewegung der Zelle, aber auch einen intrazellulären Transport entlang der Filamente im Zytoplasma. Im Rahmen des intrazellulären Transports von zum Beispiel Organellen erfolgt der „Langstreckentransport“ durch Mikrotubuli und deren Motorproteine Kinesin und Dynein. Kurze Strecken in der Zellperipherie werden durch Aktinfilamente zusammen mit Myosin organisiert [77]. Im Gegensatz zu Intermediärfilamenten weisen Aktinfilamente und Mikrotubuli eine Polarität auf. Sie besitzen ein

(+)Ende, an dem ATP-abhängig eine rasche Polymerisation erfolgt, sowie ein (-)Ende, an dem die Depolymerisation unter Ablösung der ADP-gebundenen Untereinheit stattfindet.

### 1.4.1 Keratinintermediärfilamente

Keratinfilamente sind stabile Gerüstelemente, die durch Polymerisierung aus einzelnen Molekülen entstehen. Ein Molekül besteht aus einer zentralen stabförmigen Domäne mit  $\alpha$ -helikaler Sekundärstruktur, an welche eine nicht-helikale Kopf- und Schwanzdomäne grenzen [82]. Die Heteropolymere entstehen durch die Aneinanderlagerung von Typ I und Typ II Keratinfilamenten, welche sich in ihrer Azidität unterscheiden. Sie weisen eine hohe molekulare Diversität mit 54 kodierenden Genen auf [82]. Keratinfilamente inserieren in Desmosomen und Hemidesmosomen, sodass sie Gewebe nicht nur eine interzelluläre Stabilität verleihen, sondern durch die Verankerung an der Basalmembran auch eine Integrität zum Bindegewebe ermöglichen [82]. Ihre Expression ist gewebespezifisch und auch differenzierungsabhängig. Dies macht man sich in der Pathologie im Rahmen der Tumordiagnostik zu nutzen. Zytokeratine (CK) können durch ihr spezifisches Profil Aufschluss über die Lokalisation eines Primärtumors geben. In mehrschichtigen Epithelien, so wie der Haut, findet sich abhängig von der Ausreifung zur Oberfläche hin ein unterschiedliches Zytokeratinprofil. In den basalen Zellschichten sind die Keratine 5 und 14 vorherrschend. Zur Oberfläche hin wird das Stützgerüst vor allem aus Keratin 1 und 10 aufgebaut [127].

### 1.4.2 Auf- und Abbau

Keratinintermediärfilamente weisen keine Polarität auf, sodass sich die Assemblierung und Zerlegung signifikant von der des Aktinzytoskeletts und Mikrotubuli unterscheiden. Kölsch et al. beschreiben in ihrer Arbeit einen löslichen Pool nicht-filamentärer Keratineinheiten und darauf basierend die Assemblierung und Disassemblierung des Keratinzytoskeletts [72].

Die Bildung des Zytoskeletts, die als Nukleation bezeichnet wird, beginnt in der Zellperipherie durch die Aneinanderlagerung von löslichen Keratin-

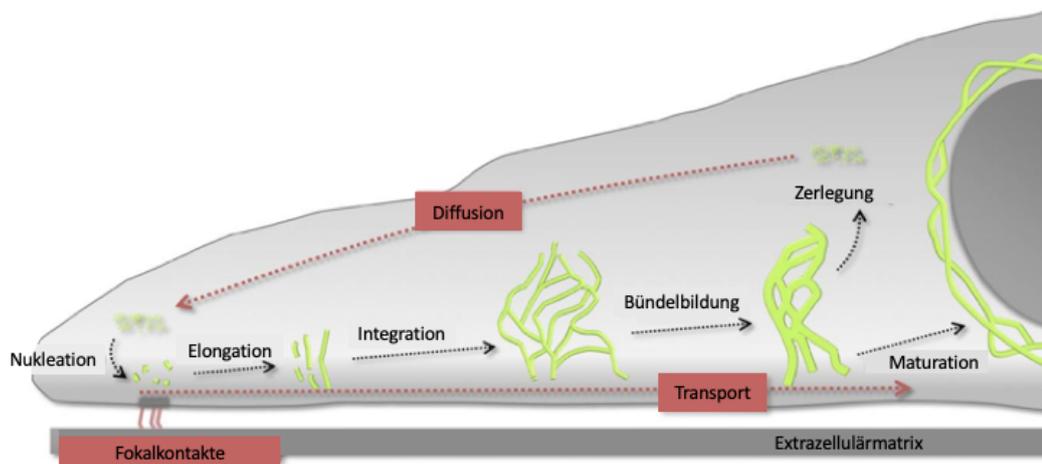


Abbildung 1.2: **Auf- und Abbau der Keratinintermediärfilamente.** Die Abbildung ist modifiziert nach Windorffer et al. [136]. Die Genehmigung des Rockefeller University Press Verlags liegt vor. Gezeigt ist der Zyklus des Auf- und Abbaus der Keratinfilamente. Lösliche Keratinoligomere lagern sich in der Zellperipherie aneinander (Nukleation). Dieser Prozess geschieht in räumlicher Nähe zu Fokalkontakten. Durch weitere Aneinanderlagerung (Elongation) wachsen die Filamente und werden in Abhängigkeit von Aktin Richtung Nukleus transportiert. Die so entstandenen Filamente werden in das periphere Keratinnetzwerk eingebaut (Integration). Durch weiteren zentripetalen Transport und Aneinanderlagerung in Richtung Nukleus entstehen Keratinbündel (Bündelbildung). An dieser Stelle können die Bündel weiter ausreifen (Maturation), um beispielsweise das stabile Keratingerüst rund um den Zellkern zu bilden. Alternativ werden lösliche Keratinoligomere abgespalten (Zerlegung), welche sich im Zytoplasma verteilen (Diffusion) und in der Zellperipherie für einen neuen Zyklus des Keratinaufbaus zur Verfügung stehen.

vorläufermolekülen (siehe Abbildung 1.2). Dieser Prozess geschieht oftmals in räumlicher Nähe zu Fokalkontakten. Somit stellen Fokalkontakte einen Knotenpunkt aller Zytoskelette dar, was eine Koordination des gesamten Systems ermöglicht [136]. Die Keratinmoleküle werden, solange sie ein freies Ende aufweisen, durch Zusammenlagerung verlängert (Elongation) und bewegen sich in Abhängigkeit des Aktinzytoskeletts in Richtung Nukleus. Im

Rahmen des Transports in Richtung Zellkern werden die Keratinmoleküle in das bestehende Netzwerk eingebaut (Integration) und durch laterale Assoziation der Moleküle entstehen zentralwärts dickere Keratinbündel (Bundling) [72, 136]. Die dickeren Bündel sorgen für erhöhte mechanische Stabilität sowie Widerstandsfähigkeit [33]. Dass das allerdings nicht immer so sein muss, zeigen Daten aus Zellen mit defizientem Linkerprotein Plectin, wodurch erhöhtes Bundling entsteht. Die Keratinbündel scheinen dysfunktional zu sein, da sich die Widerstandsfähigkeit als reduziert erweist [92]. Parallel zur Assemblierung werden immer wieder kleine lösliche Keratinmoleküle abgespalten (Disassembly), welche sich im Zytoplasma verteilen (Diffusion). Diese Moleküle stehen anschließend für einen weiteren Assemblierungszyklus zur Verfügung, sodass der Prozess eine Unabhängigkeit von der Biosynthese aufweist [72, 136]. Obwohl die Regulationswege des Abbaus nicht vollständig bekannt sind, scheinen p38MAPK und PKC involviert zu sein. Die pharmakologische Hemmung der Kinasen führt jeweils zu einer erhöhten Stabilität des Netzwerks [111, 138].

## 1.5 Die Verankerung der Desmosomen am Keratinzytoskelett

Die Verbindungsstelle zwischen Desmosomen und dem Keratinzytoskelett ist für intakte Gewebestrukturen essentiell. Der genaue Ablauf der Verankerung ist aber wenig erforscht. Die These bestand, dass sich Keratinpolymere und -filmante an entstehende Desmosomen anlagern [39, 9]. Moch et al. präsentierten Daten, die einen alternativen Mechanismus beschreiben. Die Daten legen nahe, dass der dichten Ansammlung von desmosomalen Proteinen die Akkumulation von Keratinmolekülen (Nukleation) folgt. Diese den Desmosomen anhaftenden Keratinmoleküle werden verlängert (Elongation), sodass Filamente entstehen. Die Filamente verdichten und verlängern sich zu Bündeln, die einerseits subcortical verlaufen und Desmosomen untereinander verbinden, und andererseits radial ins Zellinnere verlaufen. Daraus ergibt sich das Keratinnetzwerk mit der charakteristischen Radspeichen-Anordnung [81].

## 1.6 Pemphigus

Pemphigus ist eine Gruppe an Autoimmundermatosen, die sich durch IgG-vermittelten Zellhaftungsverlust (Akantholyse) und damit morphologisch durch Blasenbildung in der Haut und Schleimhaut auszeichnet [130]. Die Autoantikörper sind typischerweise gegen die desmosomalen Adhäsionsmoleküle Dsg1 und Dsg3 gerichtet. Die Lokalisation, in der Blasen auftreten, lässt sich durch unterschiedliche Antikörperprofile erklären. Man unterscheidet zwei große Subtypen: Pemphigus vulgaris und Pemphigus foeliacus. Auch andere wichtige Varianten werden beschrieben [56], darunter der paraneoplastische Pemphigus, der im Rahmen maligner Tumorerkrankung auftritt. Auch durch die Einnahme von bestimmten Arzneimitteln wie Penicillamin und Captopril kann ein Pemphigus auftreten. Pemphigus muss vom Bullösen Pemphigoid unterschieden werden, einer heterogenen Gruppe Autoimmundermatosen, in der Autoantikörper gegen Strukturproteine der dermal-epidermalen Junctionszone gerichtet sind. Die Unterscheidung ist aufgrund der unterschiedlichen Therapie und Prognose von Bedeutung [106]. Insgesamt ist Pemphigus eine seltene Autoimmunerkrankung mit einer Inzidenz von 0.75 bis 5 pro einer Million pro Jahr, wobei Pemphigus vulgaris 80-90% der Diagnosen ausmacht [130]. Männer und Frauen sind im Gegensatz zu vielen anderen Autoimmunerkrankungen gleich häufig betroffen. Die Zahlen in der Literatur variieren, da sich Inzidenz und Prävalenz sowie Alters- und Geschlechtsverteilung in unterschiedlichen Populationen beträchtlich unterscheiden. Zudem gibt es endemische Formen des Pemphigus, wie beispielsweise in Tunesien oder Brasilien [83, 129]. Die pathogene Immunglobulinfraktion in Pemphigus vulgaris wird im Folgenden als PV-IgG bezeichnet.

### 1.6.1 Klinik und Diagnostik

In ihrer klinischen Erscheinungsform werden Pemphigus vulgaris und Pemphigus foeliacus voneinander unterschieden. Während Pemphigus vulgaris durch die suprabasale intraepidermale Blasenbildung sowie Schleimhautoberflächencharakteristika (siehe Abbildung 1.3), finden sich bei Pemphigus

foeliacus oberflächliche epidermale Spaltbildungen vorwiegend im Stratum granulosum. Die klinischen Phänotypen korrelieren meist mit dem Antikörperprofil. Antikörper gegen Dsg3, wie beim PV, führen zur Ausprägung in der Schleimhaut. Treten Symptome auch oder nur in der Haut auf, sind in der Regel Dsg1-Antikörper vorhanden. Die Lokalisation der Blasen ergibt sich in Abhängigkeit des Expressionsmusters der Desmogleine (siehe [1.6.3](#)). Pemphigus vulgaris und Pemphigus foliaceus unterscheiden sich klinisch zudem darin, dass beim Pemphigus foliaceus die Schleimhautbeteiligung fehlt und er überwiegend in den seborrhoischen Arealen, d.h. Kapillitium, Gesicht oder an der vorderen und hinteren Schweißrinne auftritt.

Durch Anamnese und körperliche Untersuchung wird die Verdachtsdiagnose Pemphigus gestellt. Eine allgemeine klinische Untersuchung sollte spezifisch durch die Inspektion der Mund- und Nasenhöhle, Genitalregion sowie Nägel und die Testung des Nikolski-Zeichens ergänzt werden. Das Nikolski I Zeichen ist positiv, wenn erythematöse Haut durch tangentialen Druck verschoben bzw. abgelöst werden kann. Nikolski II bezeichnet das Phänomen, dass eine bestehende Blase weitergeschoben werden kann [\[62\]](#). Die beiden Zeichen sind bei der Erkrankung positiv, sie sind jedoch nicht spezifisch für die Pemphigus Gruppe. Zur Diagnosesicherung folgen weitere Tests. Der Goldstandard zur Diagnosestellung ist die direkte Immunfluoreszenzmikroskopie [\[122\]](#). Dabei wird periläsional ein Stanzzyylinder an Gewebe entnommen und auf Antikörperanreicherung untersucht [\[63\]](#).

Zudem werden serologische Untersuchungen durchgeführt. Hier kann einerseits der Antikörperspiegel mittels ELISA bestimmt werden, dessen Höhe mit der Krankheitsaktivität korreliert [\[105\]](#). Dadurch eignet sich der Parameter sowohl zur Diagnosestellung wie auch zur Verlaufskontrolle. Andererseits kann für eine indirekte Immunfluoreszenzdarstellung Affenösophagus zum Screening auf Serumautoantikörper genutzt werden [\[66\]](#). Klinische Bewertungssysteme dienen der Bestimmung und Quantifizierung von Krankheitsausdehnung und -aktivität. Die beiden zur Verfügung stehenden Scores sind der ABSIS (englisch: Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score) und der PDAI (Pemphigus Disease Area Index) [\[100\]](#). Die Einteilung nach Schwere der Erkrankung ist für die Therapieplanung wichtig, da sich die



Abbildung 1.3: **Pemphigus vulgaris**. Die Abbildungen a bis c sind modifiziert nach Kneisel und Hertl 2011a [62]. Die Genehmigung des John Wiley & Sons Verlags liegt vor. Die Abbildung d ist modifiziert nach Waschke 2008 [130]. Gezeigt sind die für Pemphigus vulgaris typischen Effluoreszenzen an Schleimhäuten und Haut sowie eine entsprechende Histologie.

Intensität der Behandlung daran orientiert.

### 1.6.2 Therapie

Es gibt keine kausale Therapie des Pemphigus. Grundsätzlich besteht das Behandlungskonzept aus unterstützenden Maßnahmen sowie einer systemischen Therapie zur Suppression des Immunsystems, ähnlich wie bei anderen Autoimmunerkrankungen. Die unterstützenden Maßnahmen umfassen eine adäquate Wundversorgung und Analgesie. Die systemische Therapie richtet sich nach der Schwere der Erkrankung. Das initiale Ziel ist es, das Auftreten neuer Läsionen zu verhindern (Induktionstherapie). Ehe eine Erhaltungstherapie eingeleitet wird, folgt eine zweiwöchige Konsolidierungsphase, in der keine neuen Effluoreszenzen auftreten und sich der Großteil der alten Läsionen in Abheilung befinden sollten [25]. Bei einem leichten Verlauf kommen Kortikosteroide bevorzugt in Kombination mit nichtsteroidalen Immunsup-

pressiva zum Einsatz, um Nebenwirkungen zu reduzieren. Bei moderaten und schweren Verläufen kommt aktuell Rituximab zum Einsatz [25, 52]. Rituximab ist ein monoklonaler CD20-Antikörper, der zur Depletion CD20-positiver B-Lymphozyten führt und ein geringeres Nebenwirkungsspektrum als Kortikosteroide aufweist. Studien konnten eine Überlegenheit einer kombinierten Rituximab-Kortikosteroid-Therapie im Vergleich zur alleinigen Kortikosteroidgabe zeigen [55]. Auch wenn die Therapie mit einer 80-90%igen Remissionsrate [2, 128] gute Ergebnisse erzielt, weisen Therapieversagen und schwerwiegende Nebenwirkungen auf die Wichtigkeit hin, neue Therapien zu erforschen [106].

### 1.6.3 Pathogenese

Eine zentrale Rolle in der Pathogenese von Pemphigus spielen Antikörper gegen desmosomale Cadherine. Bei Pemphigus vulgaris sind dies die Autoantikörper gegen Dsg1 und Dsg3 [80]. Bei Pemphigus foeliacus sind sie ausschließlich gegen Dsg1 gerichtet. Neben diesen desmosomalen Komponenten wurden zusätzlich mehr als fünfzig weitere Antigene identifiziert, gegen welche Antikörper aus Pemphigus-Seren gerichtet sein können [40]. Unter weiteren Adhäsionsmolekülen wie Desmocollinen [28, 27], E-Cadherin [31] und Verschlusskontakt-Proteinen [1] finden sich auch Antikörper gegen Zellmembranrezeptoren, Annexine sowie intrazelluläre Moleküle, wie zum Beispiel mitochondriale Bestandteile [40]. In welcher Form diese nicht-desmosomalen Pemphigus-Antikörper eine relevante Rolle in der Pathogenese der Erkrankung einnehmen, ist weitestgehend unbekannt [40]. Klar ist jedoch, dass Antikörper alleine ausreichen, um die Krankheit hervorzurufen, was Daten aus Transfer-Experimenten von Patientenseren in Mäuse zeigen [5]. Außerdem wird die zentrale Rolle der Pemphigus Antigene durch genetische Deletion von Dsg3 in Mäusen und auch die Inaktivierung von Dsg1 durch das von *Staphylococcus aureus* produzierte exfoliative Toxin A untermauert, wodurch PV bzw. PF ähnliche Phänotypen entstehen [67, 4, 42].

Unterschiedliche Erklärungsansätze beschreiben die Rolle der desmosomalen Antikörper in der Pathogenese von Pemphigus. Die erste Theorie be-

schreibt die die mechanische Behinderung, auch sterische Behinderung oder direkte Inhibition genannt, der Adhäsionsmoleküle durch die Antikörper als singulären Mechanismus. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse von Tsunoda et al. gestützt, die zeigten, dass die Antikörper mit der Extrazellulärdomäne der Desmogleine (EC1) interferieren, die für die Haftung am wichtigsten ist [121]. Tatsächlich konnten Untersuchungen mittels Rasterkraftmikroskopie die Reduktion von Dsg3-Bindungsereignissen nach PV-IgG-Exposition nachweisen [49]. Interessanterweise ließ sich dieser Nachweis für Dsg1, sowohl bei PV als auch bei PF nicht erbringen [131].

Begleitend zu dieser Theorie der direkten Inhibition wird die Desmoglein-Kompensations-Theorie als Ursache des Phänotyps beschrieben. Sie soll erklären, wie die unterschiedlichen Antikörperprofile und klinischen Ausprägungen von PV und PF korrelieren. Die Theorie besagt, dass, sobald sowohl Dsg1 als auch Dsg3 exprimiert werden, das jeweils andere Molekül für den Verlust des einen kompensieren kann. Damit bleibt die Zellhaftung soweit erhalten, dass keine spontanen Blasen entstehen. [79] Unter physiologischen Bedingungen wird in der Haut Dsg3 in den basalen Schichten exprimiert und Dsg1 überwiegend alleine in den obersten Zellschichten. Daraus ergibt sich bei PF, wo Antikörper gegen Dsg1 vorliegen, eine Blasenbildung in den obersten Schichten der Haut, da dort Dsg3 zur Kompensation fehlt. Bei Pemphigus vulgaris können Antikörper gegen Dsg3 alleine oder gegen Dsg1 und Dsg3 vorliegen. Liegen Dsg3-Antikörper vor, führt dies phänotypisch zu mukosalen Blasen, da in der Mukosa kaum Dsg1 exprimiert wird. Dementsprechend treten bei einem Antikörperprofil von Dsg1 und Dsg3 Blasen sowohl in der Haut als auch der Mukosa auf. Diese Kompensationstheorie erklärt aber nicht ausreichend, wieso ein simultanes Vorliegen von Dsg1- und Dsg3-Antikörpern zur phänotypischen Ausbildung von suprabasalen Blasen führt und nicht diffus über alle Schichten hinweg.

Zudem weisen Daten darauf hin, dass direkte Inhibition alleine den Haftungsverlust nicht vollständig erklärt. Vielmuth et al. zeigten zum Beispiel, dass alleine die Bindung von Antikörpern gegen Dsg3 nicht ausreicht, um eine Zelldissoziation zu induzieren [125]

So etablierte sich als weitere Theorie, dass die Immunglobuline durch ihre

Bindung an desmosomale und extradesmosomale Desmogleine Signalkaskaden in Gang setzen, die unter anderem zu einer Depletion der betroffenen Desmogleine und einer Retraktion des Keratinzytoskeletts führen. Dieser Effekt trat in Plakoglobin-defizienten Mäusen jedoch nicht auf [15]. Studien identifizierten PG als Suppressor von c-Myc in Keratinozyten, welcher die Proliferation stoppt und somit für die terminale Differenzierung wichtig ist. Die Bindung von PV-IgG führt zur Depletion von Dsg3 und mit ihm zu der von PG, wodurch im Folgenden c-Myc hochreguliert wird und seine proliferative Wirkung entfaltet [135]. Dieser Proliferationsimpuls schwächt die Zellhaftung. Inzwischen gibt es zahlreiche weitere Signalwege, für die eine Beteiligung bei Pemphigus nachgewiesen wurde, darunter  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx [107], Proteinkinase C (PKC) [91], Sarkoma-assoziierte Kinase (Src) [19], und p38MAP Kinase [12]. p38MAPK ist einer der meistuntersuchten Signalwege im Rahmen der Pemphiguspathogenese und stellt auch einen zentralen Signalweg dieser Studie dar. Sowohl In-vivo- als auch In-vitro-Daten zeigen eine Phosphorylierung der p38MAPK und dem nachgeschalteten Protein HSP27 als Reaktion auf Antikörperexposition [11]. Die Inhibition von p38MAPK verhinderte sowohl den durch Antikörper induzierten Haftungsverlust als auch die Zytokeratinretraktion [12]. Weitere Signalwege sind in Abhängigkeit der p38MAPK in der Kaskade nachgestaltet, so RhoA [113] und EGFR [10], die ihrerseits zur Akantholyse beitragen. Die Daten klären jedoch nicht abschließend, ob die Modifikation des p38MAPK Signalweges krankheitsverursachend oder nur die Konsequenz auf Antikörperexposition ist. Auch für die Kinasen Src und PKC wurde gezeigt, dass ihre Inhibition den Zellhaftungsverlust nach PV-IgG-Inkubation verhinderte. Walter et al. erhoben außerdem Daten, wonach unterschiedliche Antikörperprofile zu unterschiedlichen Aktivierungen von Signalwegen führten [126].

Eine weitere Erklärung zur Pathogenese umfasst die Dsg3-Nonassemblierungs-Depletions-Hypothese und postuliert einen durch Antikörper verursachten gestörten Desmogleinumsatz [90]. Nach Antikörperexposition tritt eine Quervernetzung der betroffenen Dsg auf und folglich werden die extradesmosomalen Proteine internalisiert. Neu synthetisiertes Desmoglein wird im Weiteren nicht in die Desmosomen eingebaut und

desmosomales Desmoglein nach und nach abgebaut, sodass letzten Endes keine adäquate Zellhaftung gewährleistet wird.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Pathogenese von Pemphigus nicht vollständig geklärt ist. Unterschiedliche Daten sprechen für die verschiedenen beschriebenen Theorien, die wahrscheinlich in vivo koexistieren und Teile der komplexen Pathogenese der Erkrankung widerspiegeln.

## 1.7 Casein-Kinase-1

Die Familie der Casein-Kinase-1 (CK-1) ist eine Gruppe an Serin-/Threonin Proteinkinasen, die 1973 erstmals beschrieben wurde [13]. Eine distinkte chemische Struktur ist für die Interaktion mit der CK-1 notwendig, dazu zählt unter anderem ein N-terminaler phosphorylierter Serin- oder Threoninrest [34]. Unter physiologischen Bedingungen stellt die Milchproteinkomponente Casein selbst kein Substrat der Kinase dar. Sieben unterschiedliche Gene kodieren für die Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$ , sowie deren Spleisvarianten [65]. Abgesehen von der CK1- $\beta$ , die nur im Rind vorkommt, wurden sie alle im Menschen isoliert [18]. Die Kinasedomäne ist evolutionär konserviert, jedoch unterscheiden sich die Proteine im N-terminalen sowie C-terminalen nicht-katalytischen Ende. Die Kinasen wurden als konstitutiv aktiv beschrieben [64, 103]. Die Proteinfamilie ist physiologischerweise in zahlreichen zellulären Prozessen involviert, darunter dem circadianen Rhythmus, dem Wnt-Signalweg, dem Membrantransport, der DNA-Replikation, dem DNA-Reparatursystem und parasitären Infektionen [95, 76, 64, 35]. Zudem wurde gezeigt, dass die CK-1 zur Homöostase und Organisation des Zytoskeletts beiträgt. Durch das Protein FAM83H wird die CK-1 rekrutiert und kann mit dem Keratinzytoskelett kolokalisieren [70, 71]. Die Inhibition der Kinase führt zu einer Aggregation des Zytoskeletts perinukleär. Diese ähnelt phänotypisch der Keratinretraktion, die bei Pemphigus vulgaris beschrieben ist. Koga et al. zeigen zudem, dass die korrekte Organisation des Zytoskeletts durch die CK-1 ebenfalls für die Ausbildung von Desmosomen relevant ist, da bei gestörter Zytoskelettarchitektur durch CK-1-Inhibierung oder gekürzte FAM83H Mutanten Desmoplakin nicht mehr an der Membran

angesiedelt ist [\[71\]](#).

## 1.8 Fragestellung

Obwohl bekannt ist, dass nach Autoantikörperbindung schnelle molekulare Reaktionen stattfinden, sind die strukturellen Veränderungen zu frühen Zeitpunkten nach Antikörperbindung kaum untersucht. Zwei unterschiedliche Szenarien wären vorstellbar: Die Veränderungen des Zytoskeletts im Sinne einer Keratinretraktion sind ursächlich für eine Destabilisierung der Desmosomen und Internalisierung des Dsg3, oder aber der Kollaps des Zytoskeletts ist die Folge der Dsg3-Internalisierung. Die genaue Rolle der verschiedenen Zytoskelettbestandteile ist ebenso unklar wie ihr zeitlicher Zusammenhang. Deshalb sollen in dieser Arbeit die ersten 120 Minuten nach Antikörperexposition in Hinblick auf den Haftungsverlust, die Keratinretraktion sowie die Dsg3-Depletion engmaschig untersucht werden. Zudem stellt sich die Frage, wie diese Vorgänge voneinander abhängig sind. Pemphigus ist eine Autoimmunerkrankung, deren Pathogenese nach wie vor nicht abschließend geklärt ist. Zum besseren Verständnis sollen die oben genannten Aspekte näher untersucht werden.



# 2 Methoden

## 2.1 Zellkultur

Diese Arbeit wurde mit zwei Zelllinien durchgeführt, wobei eine durch stabile Transfektion der ursprünglichen entstand. HaCaT-Zellen (englisch: human adult low calcium elevated temperature) sind immortalisierte Keratinozyten, die als spontan transformiert gelten. In vivo zeigen sie keine Tendenz zur Invasion oder Tumorigenität und gleichzeitig bleibt ihre Fähigkeit zur Differenzierung erhalten [14]. Des Weiteren wurde mit HaCaT-Zellen gearbeitet, die ein an gelb fluoreszierendes Protein (yellow fluorescent protein, YFP) gebundenes humanes Zytokeratin 5 (CK5) zusätzlich zum endogenen CK5 stabil exprimieren (freundlicherweise von Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Windoffer und Dr. rer. nat. Nicole Schwarz aus dem Institut für Molekulare und Zelluläre Anatomie, RWTH Aachen, zur Verfügung gestellt). Beide Zelllinien wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) kultiviert. Das Medium wurde mit 50 U/ml Penicillin und 50 U/ml Streptomycin (beide von AppliChem, Darmstadt, Deutschland) sowie 10% fetalem Kälberserum versetzt. Im Falle der HaCaT-CK5-YFP Zelllinie wurde zudem G418 in einer Konzentration von 0,5 mg/ml zur Selektion hinzugefügt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Brutschränken bei einer Temperatur von 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt der Atmosphäre von 5% Prozent. Das Medium wurde bis zur Konfluenz des Zellrasens alle zwei Tage gewechselt. Experimente wurden 24 Stunden (h) nach Erreichen der Konfluenz durchgeführt. Zur Anzucht und zum weiteren Passagieren wurden die Zellen in T75-Kulturflaschen mit 20 ml Medium gehalten. Das Passagieren der Zellen er-

folgte nach einem einmaligen Waschvorgang mit steriler phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, engl.: phosphate-buffered saline) und anschließender 20-minütiger Chelation mittels PBS-EDTA-Lösung, welche der Lockerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Cadherin-Bindungen durch  $\text{Ca}^{2+}$  Entzug diente. Mittels 3 ml Trypsin wurden die Zellen vom Boden der Kulturflasche abgelöst und anschließend in 17 ml Medium resuspendiert, sodass ein Gesamtvolumen von 20 ml erreicht wurde. Abhängig vom Versuchsaufbau erfolgte die Aussaat in 24-Well-Platten mit (Immunofluoreszenz) oder ohne Deckgläschen (Western Blot Analyse), 6-Well-Platten (Biotinylierungsversuch), 12-Well-Platten (Phos-Tag-Versuch) oder 8-Well-ibidi-Slides (Lebendzellmikroskopie). Unbehandelte T75-Kulturflaschen wurden zur Weiterführung der Zelllinie genutzt. Ausgesät wurde im Verhältnis 1:2 bis 1:4.

## 2.2 Mediatoren und Antikörper

### 2.2.1 Mediatoren

Folgende Mediatoren wurden zur unmittelbaren Beeinflussung des Zytoskeletts oder dem Eingriff in PV-relevante Signalwege genutzt:

Tabelle 2.1: **Mediatoren.**

<b>Mediator</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Funktion</b>	<b>Konzentration in Lösung</b>
D4476	Abcam (Cambridge, Großbritannien)	Hemmung der Casein-Kinase-1	100 $\mu\text{M}$ in DMSO
SB203580	Sigma Aldrich (München, Deutschland)	Hemmung der p38MAPK	20 $\mu\text{M}$ in DMSO
Methyl- $\beta$ - Cyclodextrin	Sigma Aldrich (München, Deutschland)	Cholesterol- depletion	1mM in PBS

### 2.2.2 Antikörper

Primärantikörper dienen in der indirekten Immunfluoreszenzdarstellung sowie Western-Blot-Analyse der Detektion der zu untersuchenden Proteine durch Bindung an spezifische Epitope. Mit Hilfe von Sekundärantikörpern, die gegen den Fc-Teil der Primärantikörper gerichtet waren, wurden die Primärantikörper visualisiert. Im Falle der Immunfluoreszenzdarstellung handelte es sich um einen an einen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelten Sekundärantikörper, im Rahmen der Western-Blot-Analyse um eine Kopplung an ein Peroxidaseenzym (Detektion mittels ECL-Lösung). Die Antikörper wurden zur Inkubation des Zellrasens in der Immunfluoreszenzdarstellung in PBS verdünnt, zur Inkubation der Nitrozellulosemembran im Western-Blot-Versuch in 5% BSA (Bovines Serumalbumin) oder 5% Magermilchpulver in TBS-T (engl.: Tris-buffered saline with Tween).

Tabelle 2.2: **Primärantikörper.**

<b>Primär-antikörper</b>	<b>Typ, Spezies</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Einsatz</b>	<b>Konzentration in Lösung</b>
anti-Dsg3 Klon 5G11	monoklonal, Maus	Thermo- Fisher	IF	1:100
anti-Dsg3	polyklonal, Kaninchen	Biozol	WB	1:1000
anti-DP I,II	polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz	WB	1:1000
anti-CK14	monoklonal, Maus	Abcam (Cambridge, UK)	WB	1:1000
anti-GAPDH	monoklonal, Maus	Santa Cruz	WB	1:1000
anti-phospho- p38MAPK (Thr180/ Tyr182, D3F9)	polyklonal, Kaninchen	Cell Signaling (Cambridge, UK)	WB	1:1000
anti- p38MAPK	polyklonal, Kaninchen	Cell Signaling	WB	1:1000

Tabelle 2.3: Sekundärantikörper.

Sekundär-antikörper	Kopplung	Hersteller	Konzentration in Lösung
Ziege-anti-Maus-Fc	Cy3	Dianova (Hamburg, Deutschland)	1:300
Ziege-anti-Maus-Fc	Pox	Dianova	1:5000
Ziege-anti-Kaninchen-Fc	Pox	Dianova	1:5000

### 2.3 Pathogener Anti-Dsg3-Antikörper, Patientenseren und Aufreinigung

AK23 ist ein monoklonaler, pathogener Anti-Dsg3 Antikörper aus einem Pemphigus Mausmodell [121] (Biozol, Eching, Deutschland). Er wurde in einer Konzentration von 75 µg/ml eingesetzt.

Die beiden in dieser Studie verwendeten Patientenseren (PV1-IgG und PV2-IgG) stammten von Patienten mit histologisch sowie serologisch gesichertem Pemphigus vulgaris. Unter Einverständnis der Patienten wurden die Seren von Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Enno Schmidt (Universitätsklinikum Lübeck) zur Verfügung gestellt. Der nachstehenden Tabelle sind die ELISA-Titer für Anti-Dsg1 und Anti-Dsg3 Antikörper der Seren zu entnehmen. Für Kontrollbedingungen wurde ein Pool aus Seren gesunder Freiwilliger genutzt, der im Folgenden als C-IgG (engl.: Control-IgG) bezeichnet wird. Zur Extraktion der IgG-Fractionen aus den Seren wurde die Methode der Affinitätschromatographie mittels Protein A-Agarose (ThermoFisher) angewandt. Hierbei diente Protein A-Agarose auf kleinen Kügelchen als Ligand, um Antikörper aus einer Lösung zu binden. Dieser Schritt erfolgte in Aufreinigungssäulen unter ständigem Drehschwenken bei Raumtemperatur für drei Stunden. Danach wurden die Säulen zentrifugiert und das überstehende Serum entfernt. Die Agarose-Kügelchen wurden mit PBS gewaschen und anschließend die gebundenen Antikörper mit Natriumcitrat-Puffer (20 mM, pH 2,4) eluiert. Zur

Neutralisation diente  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Die so gewonnene Immunglobulin-Fraktion wurde in einer Konzentration von 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  eingesetzt.

Tabelle 2.4: **PV-IgG ELISA-Titer.**

	<b>anti-Dsg1 (U/ml)</b>	<b>anti-Dsg3 (U/ml)</b>
PV1-IgG	212.27	181.44
PV2-IgG	182.15	206.21

## 2.4 DNA Konstrukte

pDEST-mDsg3-mCherry-N1 ist ein Konstrukt, bei dem murines Dsg3 an das C-terminale Ende des Destinationsvektors mCherry (pDEST- mCherry-N1, Plasmid #31907, Addgene) fusioniert ist. Beim zweiten Konstrukt, das für Transfektionen genutzt wurde, handelte es sich um an GFP gekoppeltes Dsg3. Die Konstrukte wurden von Dr. rer. nat. Mariya Radeva konzipiert und zur Verfügung gestellt.

### 2.4.1 Transformation in Escherichia coli

Diese Methode ermöglicht die Vervielfältigung eines Plasmids, indem die DNA in kompetente Bakterienzellen transformiert wird. Die Transformation erfolgte mittels Hitzeschock. Hierzu wurde 1  $\mu\text{l}$  der zu vervielfältigenden DNA zu 20  $\mu\text{l}$  KCM-Puffer (5-fach, 500 mM KCl, 150 mM  $\text{CaCl}_2$ , 250 mM  $\text{MgCl}_2$ ) zugegeben und auf 100  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen mit sterilem Wasser aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde vorsichtig mit 100  $\mu\text{l}$  kompetenter DH5- $\alpha$  Bakterienzellen gemischt und im Anschluss 30 Minuten (min) auf Eis ruhen gelassen. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 5 min in einem Heizblock, gefolgt von weiteren 5 min auf Eis. 900  $\mu\text{l}$  Luria-Broth-Medium (LB-Medium, 20 g/L LB Medium Pulver, 5 g/L NaCl) ohne Antibiotikum wurden hinzugefügt und das Gemisch für eine Stunde bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde das Gemisch für 3 min bei 6000 xg zentrifugiert, 1 ml des Überstandes abgenommen und das sichtbare Bakterienpellet in den

übrigen circa 100 µl LB-Medium resuspendiert. Diese wurden auf eine Agarplatte mit der entsprechenden Resistenz des Plasmids aufgetragen. Im Falle des pDEST-mDsg3-mCherry war dies Kanamycin. Die Agarplatte wurde bei 37°C über Nacht bebrütet. Am Folgetag waren zahlreiche Bakterienkolonien ersichtlich. Eine Kontrolldigestion bestätigte nach der Aufreinigung der DNA die effektive Aufnahme des Plasmids durch die kompetenten Bakterien.

Mit einer sterilen Öse wurde eine Kolonie gepickt und eine Kulturflasche mit LB-Medium, dem das der Resistenz entsprechende Antibiotium zugegeben wurde, beimpft. Dies diente als Vorkultur, um in einem weiteren Schritt die für die DNA Aufreinigung notwendige Kultur von 100 ml zu generieren. Die Vorkultur wurde bei 37°C auf einem Schüttler für 8 Stunden inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde ein 100 ml Kulturkolben beimpft. So konnten die für die folgende DNA Aufreinigung notwendigen Mengen Bakterienkultur erzeugt werden.

### 2.4.2 DNA Aufreinigung

Bevor Zellen mit der vervielfältigten Plasmid-DNA transfiziert werden konnten, musste die DNA aus der Bakterienkultur kompetenter *E. coli* Zellen isoliert und aufgereinigt werden. Ziel ist hierbei ein hoher Reinheitsgrad der DNA sowie eine deutliche Reduktion der Endotoxinbelastung. Die Aufreinigung wurde mit einem Midi-Prep-Kit von Macherey-Nagel nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Das am Ende des Prozesses gewonnene DNA-Pellet wurde in TE-Puffer, eine Puffermischung aus TRIS und EDTA, gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt. Bei suffizienter Aufreinigung lag die 260/280-Ratio der DNA bei circa 1.8. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

### 2.4.3 Transiente Transfektion

Das Einbringen der an fluoreszierende Proteine gekoppelten Dsg3-Konstrukte in die humanen Keratinozytenzelllinien HaCaT und HaCaT-CK5 erfolgte mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine LTX mit Plus Reagenz (ThermoFisher). Diese Art der Transfektion folgt dem Prinzip der Lipofektion. Katio-

nische Liposomen bilden zusammen mit ungeladenem Helferlipid sowie DNA-kompaktierenden Substanzen einen Komplex mit der zugefügten Plasmid-DNA und bringen diese so in die Zellen ein [84]. Die Transfektion wurde drei Tage nach dem Aussäen der Zellen bei einer Konfluenz von circa 90 % durchgeführt. Der Ansatz wurde aus 3 µg Plasmid-DNA, 3 µl Plus-Reagenz und 5 µl LTX-Reagenz hergestellt und auf 50 µl Volumen mit DMEM ohne Zusätze ergänzt. Entsprechend dem Protokoll der Herstellerfirma ruhte dieser Ansatz für 5 min. Der Ansatz wurde auf 2 Wells der ibidi-Slides für Lebendzellmikroskopie aufgeteilt. Ein Mediumwechsel zur Reduktion der Toxizität der Transfektionsreagenzien erfolgte 4 Stunden nach Zugabe. Experimente wurden 24 Stunden nach der Transfektion durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt die Expression der fluoreszierenden Dsg3-Moleküle entlang der Membran am konsistentesten erschien. Die Transfektionseffizienz blieb trotz mehrfachem Austesten der Konditionen und unterschiedlicher Transfektionsreagenzien insgesamt gering und belief sich auf etwa 5 %. Ursächlich für die geringe Transfektionseffizienz könnte unter anderem die Größe des Plasmids sein.

## 2.5 Immunfluoreszenzdarstellung

Die indirekte Immunfluoreszenzdarstellung wird dazu genutzt, die Expression und Verteilung von Proteinen morphologisch aufzuzeigen. Primärantikörper binden an den Epitopen der gesuchten Proteine. Ein speziesspezifischer Antikörper (Sekundärantikörper) bindet an die Fc-Fragmente der Primärantikörper. In der Immunfluoreszenzdarstellung werden Sekundärantikörper genutzt, die an fluoreszierende Moleküle gekoppelt wurden. Das Licht einer definierten Wellenlänge kann diese Fluorophore anregen und auf ein höheres Energieniveau überführen. Fallen sie auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück, emittieren sie Licht einer jeweils spezifischen, energetisch niedrigeren Wellenlänge als des Anregungsspektrums. Das in dieser Studie verwendete Indocarbocyanin (Cy3) emittiert oranges Licht (Emissionsmaximum bei 570 nm) [30]. HaCaT Zellen, die das humane CK5-YFP stabil exprimieren, wurden auf 12 mm Deckgläschen bis zur Konfluenz in DMEM

kultiviert. Der Zellrasen wurde jeweils wie angegeben mit Immunglobulinen, Antikörper oder Mediator inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 2 % Formalin in PBS für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln fixiert. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit PBS für jeweils 5 min gewaschen und weiters mit 0,1 % Triton X-100 für 5 min permeabilisiert. Die Permeabilität erleichtert das Eindringen der Antikörper und damit die Bindung an intrazellulär gelegene Epitope. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurden die Deckgläschen auf Objektträger überführt. Es folgte die Behandlung mit 25  $\mu$ l von 1 % normalem Ziegenserum und 3 % Rinderserumalbumin in PBS für 45 min bei Raumtemperatur, um unspezifische Bindungsstellen des Antikörpers an Antigenen zu sättigen. Mit einem Tuch wurde die Flüssigkeit abgenommen und die Deckgläschen mit 30  $\mu$ l des Antikörpers bedeckt und bei 4°C in einer feuchten Kammer über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde nach dreimaligem Waschen mit PBS ein Cy3-konjugierter Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur zugegeben. Dieser wurde im Anschluss mit PBS abgewaschen und die Deckgläschen mit 1,5% N-Propylgallat (NPG)-Lösung auf einem Objektträger eingebettet. NPG schützt vor raschem Ausbleichen in kurzzeitigem Licht [37]. Die Objektträger wurden lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

## 2.6 Lebendzellmikroskopie

Die in einer  $\mu$ -slide 8-Well-Platte (Ibidi, Martinsried, Germany) kultivierten Keratinozyten wurden bis zur Konfluenz gehalten. Abhängig vom Versuch erfolgte die Transfektion der Zellen wie in Section 2.4.3 beschrieben. Zur Durchführung der Lebendzellmikroskopie wurde das Dulbecco's Modified Eagle Medium inklusive Zusätze durch ein entsprechendes Korrelat ohne Phenolrot ausgetauscht. Die Bilddaten wurden mit einem Leica SP5 Konfokalmikroskop mit einem 63 $\times$  NA 1.2 PL APO Wasser- oder einem 63 $\times$  NA 1.4 PL APO Ölobjectiv generiert (Leica, Mannheim, Deutschland). Zur Aufrechterhaltung der für die Kultivierung der Zellen notwendigen Konditionen wurde eine Inkubationskammer (ONKOLAB, Pozzuoli, Italy) genutzt. Diese ermöglichte ein feuchtes Milieu mit einer konstanten Temperatur von

37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt. Das Ölobjektiv wurde insbesondere für längere Aufnahmen gewählt, da das Wasser, das der Immersion diente, nach wenigen Stunden verdampfte. Das Exzitationsmaximum von YFP liegt bei 514 nm Wellenlänge. Entsprechend erfolgte die Bildaufnahme von HaCaT CK5-YFP Zellen ohne zusätzliche Transfektion mit einem 20-mW Argon Laser bei 514 nm und 3 % Laserstärke. Um eine räumliche Auflösung der gesamten z-Dimension der Zellen zu erhalten, wurden Bilder in Schichten generiert. Der Abstand zwischen den einzelnen Schichten betrug 0.5 µm. Ein quadratischer Bildausschnitt wurde so gewählt, dass zwei bis drei Zellen vollständig abgebildet waren. Die Seitenlänge eines Bildes betrug dabei circa 15 µm. Dieser Ausschnitt wurde in 512 x 512 Pixel aufgelöst. Alle 30 Sekunden wurde der gesamte z-Stack aufgenommen. Analog erfolgte die Bildaufnahme von HaCat Zellen, die mit Dsg3-GFP transfiziert wurden. Hierzu wurde das Fluorophor entsprechend seines Exzitationsspektrums mit 488 nm beleuchtet.

Bei Tranfektion der HaCaT-CK5 Zellen mit mDsg3-mCherry wurden Bilder sequenziell aufgenommen. Hierzu wurde zusätzlich zur Exzitation des YFP das mDsg3-mCherry mit einem 10-mW 543 nm Laser bei 20 % Laserstärke beleuchtet und ein Bild generiert. Zur Reduktion der Toxizität sowie der Bleichung der Fluorophore wurden z-Stacks alle 2 min erworben.

Um 12-Stunden-Aufnahmen von HaCaT-CK5 Zellen durchzuführen wurde ein größerer Bildausschnitt von 82.01 µm Seitenlänge gewählt. Die z-Stacks wurden alle 7.5 bis 15 min angefertigt.

## 2.7 Proteinquantifizierung

Zur Proteinquantifizierung von Zellysaten wurde die Bicinchoninsäure (BCA)-Methode mittels eines Pierce-BCA-Protein-Assay-Kits gemäß Herstellerangaben genutzt. Die Methode basiert auf der Fähigkeit von Proteinen, Cu<sup>2+</sup> in alkalischer Lösung zu Cu<sup>1+</sup> zu reduzieren (Biuret Reaktion). Zusammen mit der BCA färben die Ionen die Lösung violett. Die Intensität der Farbe nimmt bei steigender Proteinkonzentration zu [112]. Die Konzentration wird mit Hilfe eines Photometers bei 562 nm bestimmt. Die absolute Proteinkonzentration wurde durch eine Proteinstandardreihe mittels bovi-

nem Serumalbumin (BSA) bestimmt. Konzentrationen von 2000 - 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  BSA wurden im entsprechenden Lysepuffer gelöst und parallel prozessiert. In einer 96 Well-Platte wurden zu 20  $\mu\text{l}$  Lysepuffer 5  $\mu\text{l}$  des Zelllysats zur Proteinbestimmung zugegeben. Die Konditionen wurden doppelt aufgetragen und am Ende der Mittelwert der beiden Wells eruiert. Jeweils 25  $\mu\text{l}$  der Standardreihe wurden auf der gleichen Platte ebenso zweifach aufgetragen. Zu jedem Well wurden 200  $\mu\text{l}$  eines Gemisches aus BCA-Reagenz A + B zugegeben und die Platte für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Platte erfolgte die Auswertung mit dem Mikroplattenleser Infinite 2000 (Tecan, Männedorf, Schweiz).

## 2.8 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese und Western-Blot-Analyse

Um die exprimierte Menge einzelner Proteine zu analysieren erfolgt eine Proteinauftrennung durch Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [73]. Die anschließende immunologische Proteindetektion wird durch das Western Blotting ermöglicht. Es handelt sich um eine semiquantitative Analyse. HaCaT-CK5 Zellen wurden in 24-Well-Platten kultiviert und bis zur Konfluenz gehalten. Nach Beendigung der Zellbehandlung mit Mediatoren oder pathogenen Antikörpern erfolgte ein Waschschriff mit PBS und anschließend eine Lyse mit SDS-Lyse-Puffer (25 mmol/l HEPES, 2 mmol/l EDTA, 25 mmol/l NaF and 1% SDS, pH 7.4) und Proteaseinhibitoren (Verhältnis 1:1). Die Lysate wurden zur Homogenisierung sonifiziert. Der SDS-Lyse Puffer ist ein anionisches Detergens, welches durch die Störung hydrophober Wechselwirkungen zum Verlust der Sekundär-, Tertiär- sowie Quartärstruktur von Proteinen führt [78]. Zusätzlich werden unterschiedliche Ladungen maskiert, indem das ganze Molekül negativ geladen wird. Wie in Abschnitt 2.7 beschrieben, wurde die Proteinmenge des Lysats mittels der BCA-Methode determiniert.

Eine Mischung aus Lysat und 3-fach Laemmli Puffer (im Verhältnis 2:1), dem 50 mM Dithiothreitol (DTT) zugesetzt wurden, wurde vorbereitet. Das

zugefügte DTT diente der Reduktion von Disulfidbrückenbindungen in der Proteinstruktur [78]. Das Gemisch wurde für 5 min bei 95°C erhitzt, was ebenfalls der Zerstörung der Quartärstruktur diente, und kondensierte Flüssigkeit nach kurzem Abkühlen abzentrifugiert. Die genannten Schritte zur Denaturierung erlauben, dass die Proteine im elektrischen Feld nach ihrer Größe und nicht nach Ladung oder räumlicher Beschaffenheit in Richtung Anode migrieren. Es wurden 10 % Polyacrylamidgele zwischen Glasplatten gegossen, wobei dieses sich aus ca. 80 % Trenngel und einem oben gelegenen Sammelgel (5 % Polyacrylamidgel) zusammensetzte. Dem Sammelgel wurde ein Kamm mit 10 Zinken eingelegt, welcher nach seiner Entfernung Taschen für die Proteinbeladung hinterließ. Ammoniumperoxodisulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) sorgten für die Polymerisation der Gele. Die Gele wurden in ein vertikales Elektrophorese-Kammersystem (Biorad) eingespannt und die Kammer mit Elektrophorese-Puffer (1 M Glycin, 124 mM Tris/HCl, 17,3 mM SDS) aufgefüllt. Die Taschen wurden mit 10 µg des Proteingemisches befüllt und eine Spannung, welche die Migration der Proteingemische Richtung Anode bewirkte, angelegt. Die initiale Spannung wurde mit 80 V gewählt und auf 120 V erhöht, nachdem die Proteingemische das Trenngel erreichten. Kleine Moleküle wandern hierbei schneller als große und sind somit im Gel weiter unten zu detektieren. Mindestens eine Tasche wurde mit vorgefärbten Proteinen definierter Größe befüllt, welche als „Proteinleiter“ der Größenordnung, der zu detektierenden Proteine, diente (engl.: prestained protein ladder). Die Proteine wurden im Weiteren vom Gel in Transfer-Puffer bei 350 mA über 90 min auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Zur Absättigung freier Bindungsstellen an der Membran wurde diese für eine Stunde entweder in 5 % Magermilchpulver in Tris-gepufferter Salzlösung mit 0.05% Tween (TBS-T) oder 5 % bovinem Serum Albumin in TBS-T bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurde die Membran mit dem jeweiligen Antikörper (siehe Tabelle 2.2) bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde der speziesspezifische Peroxidase(POX)-gekoppelte Zweitantikörper für 2 Stunden bei Raumtemperatur zugegeben. Die Detektion eines Proteinsignals erfolgte mittels verstärkter Chemilumineszenz (engl. enhanced chemiluminescence) [132]. Dazu wurde die Membran

eine Minute in einem Gemisch aus ECL I und II geschwenkt. Das in ECL I enthaltene Luminol wird durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  aus ECL II mit der Peroxidase als Katalysator oxidiert. Das dabei emittierte Licht wurde über Chemilumineszenzdetektion aufgenommen. Die Auswertung der Western Blots erfolgte in der Software ImageJ durch die Messung der integrierten Dichte der Banden. Dabei wurde ebenfalls der spezifische Hintergrund der jeweiligen Proteinspur gemessen und von der Bandendichte abgezogen. Die gemessenen Werte wurden auf die jeweilige Kontrollbedingung des Experiments normiert und als dessen Vielfaches dargestellt.

## 2.9 Triton-X-100 Proteinfractionierung

Diese Methode ermöglicht es, zytoskelettale bzw. zytoskelettal-gebundene Anteile unabhängig von löslichen zellulären Anteilen zu betrachten. Zellen wurden in 24-Well-Platten bis zur Konfluenz gehalten und mit Mediatoren oder Antikörpern entsprechend vorbehandelt. Nach Ende der Inkubationszeiten wurden die HaCaT-CK5 Zellen auf Eis gestellt und einmalig mit eiskaltem PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit Extraktionspuffer (0.5% Triton X-100, 50 mmol/l MES, 25 mmol/l EGTA, 5 mmol/l  $\text{MgCl}_2$ ), der mit 0.1% Leupeptin, Aprotinin und Pepstatin sowie 1% Phenylmethylsulfonyl Fluorid versetzt wurde, unter leichtem Schütteln für 10 min auf Eis. Die Zellrasen wurden danach vom Boden der Well-Platten gekratzt und die Lyrate in Reaktionsgefäßen aufgefangen. Das anschließende Zentrifugieren bei 19,000 g für 10 min bei 4°C trennte die zytoskelettale Fraktion von der Triton-löslichen, nicht zytoskelettal-gebundenen Fraktion. Die Triton X-100 lösliche Fraktion wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und separat für das Blotting behandelt. Das nach dem Zentrifugieren zurückgebliebene Pellet, das den zytoskelettalen Anteil darstellt, wurde in SDS-Lyse Puffer und Proteaseinhibitor (1:1) suspendiert und im Weiteren mit Ultraschall behandelt. Der Proteingehalt beider Fraktionen wurde mittels BCA-Methode (ThermoFisher) gemessen. Ein dem jeweiligen Puffer entsprechender Standard wurde dafür genutzt. Für die anschließende SDS-PAGE wurden 5 bzw. 10  $\mu\text{g}$  jeder Fraktion mit Laemmli Puffer gemischt.

## 2.10 Biotinylierungsversuch

Durch den Biotinylierungsversuch erlangt man eine isolierte Betrachtung der Moleküle an der Zelloberfläche. Die Zellen wurden für diesen Versuch in 6-Well-Platten gesät, um aufgrund der kleinen Proteinmenge, die von Interesse ist, ausreichend Protein gewinnen zu können. Nach Abschluss der Vorbehandlung der Zellen wurden sie auf Eis gestellt und mit HBSS (engl.: Hank's balanced salt solution, 130 mM HBSS-Pulver, 4 mM NaHCO<sub>3</sub>) gewaschen. Dem folgte eine einstündige Inkubation mit 0.25 mM membranimpermeablem EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin (ThermoFisher). Das überschüssige Biotin wurde durch mehrere Waschstschritte mit HBSS entfernt. Dem ersten Waschstschritt wurden 100 mM Glycin zur Bindung des freien Biotins zugefügt. Die Zellen wurden unter leichtem Schwenken mit Puffer (50 mM NaCl, 10 mM PIPES, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 % Triton X-100, 1 % Phenylmethylsulfonyl Fluorid, jeweils 0.1 % von Leupeptin, Aprotinin und Pepstatin) für 20 min auf Eis lysiert. Der Zellrasen wurde mit einem Schaber vom Boden der Well-Platte gekratzt und das Lysepuffer-Zell-Gemisch in Eppendorf-Gefäße überführt. Nach einem 5-minütigen Zentrifugationsschritt bei 4°C und 19,000 g wurde der Überstand aufgefangen und die Proteinkonzentration mittels des BCA-Kits (ThermoFisher) bestimmt. Um nun aus dem löslichen Überstand jene Proteine zu filtern, die an Biotin gebunden waren und damit ihren Ursprung an der Zelloberfläche fanden, wurden 70 µl NeutrAvidin (HighCapacity)-agarose Kügelchen (ThermoFisher) genutzt. NeutrAvidin bindet spezifisch an Biotin und wird daher für Aufreinigungen genutzt. Den 70 µl NeutrAvidin Kügelchen wurden 250 µg Protein zugegeben und über Nacht bei 4°C auf einem Rotator gemischt. Am nächsten Tag wurden die Kügelchen fünf Mal mit kaltem Lysepuffer gewaschen, um ungebundenes Protein zu entfernen. Das an die Kügelchen gebundene Protein wurde in 3-fach Laemmli Puffer mit 50 mM Dithiothreitol (AppliChem) suspendiert. Es folgte ein Hitzeschritt (95°C, 5 min), um die Proteine von den Kügelchen zu lösen und zu denaturieren. Wie in Section [2.8](#) beschrieben wurden Elektrophorese und Western Blotting durchgeführt. Die Proteindetektion auf den Nitrozellulosemembranen erfolgte mittels Streptavidin-HRP (Cell Signaling). Für die den-

sitometrische Auswertung wurde die integrierte Dichte der gesamten Spur jeder Bedingung gemessen und als Ladekontrolle genutzt. Das „gesamte Ly-sat“, also die Protein-Puffer Mischung, wurde parallel dazu prozessiert und zur GAPDH normalisiert. Diese parallele Verarbeitung ermöglichte den Vergleich zwischen dem Gesamtprotein und jenen Proteinen, die sich an der Zelloberfläche befanden. Repräsentative Ausschnitte der Membranen werden in den Abbildungen dargestellt.

## 2.11 Phos-Tag Versuch

Mit dieser Methode kann der Phosphorylierungsstatus eines Proteins mittels Mangan (II)-Phos-tag<sup>TM</sup> SDS-PAGE (Wako Chemicals GmbH, Steinbach, Germany) ermittelt werden [59]. Zwei Mangan-Moleküle bilden zusammen mit einem Phos-Tag-Molekül einen positivgeladenen Komplex und reduzieren durch Anlagerung an negativ geladene Phosphatreste die Migrationsgeschwindigkeit von phosphorylierten Proteinen in der Elektrophorese. Die unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten zwischen phosphorylierten Proteinen und ihren weniger- oder unphosphorylierten Korrelaten ermöglichen die Auswertung und Detektion des Phosphorylierungsstatus eines Proteins.

Die Zellen wurden auf Eis gestellt und mit kaltem TBS gewaschen, nachdem die HaCaT-CK5 Zellen mit dem D4476 Reagenz behandelt worden waren. Lysiert wurden die Zellen mit Laemmli Puffer, dem jeweils 0,1 % Leupeptin, Pepstatin und Aprotinen, 1 % PMSF, Phosphataseinhibitor (Roche) und 50 mM DTT zugesetzt wurden. Die Lysate wurden zur Homogenisierung mit Ultraschall behandelt. Die Phos-Tag Komponente Phos-tag<sup>TM</sup> ALL-107 (Wako Chemicals) wurde in einer Konzentration von 30 mmol/l zusammen mit 60 mmol/l MnCl<sub>2</sub> in ein reguläres 6 %-iges Trenngel inkorporiert. Parallel wurde mit einem Kontrollgel (0 mM Phos-Tag) gearbeitet. Die weitere Elektrophorese sowie das Western Blotting wurden wie in Section 2.8 beschrieben durchgeführt. Vor dem Blotting wurde das Mangan mit zwei 10-minütigen Waschschritten in Transfer-Puffer mit 30 mM EDTA aus den Gelen entfernt. Ein weiterer Waschschrift für ebenfalls zehn Minuten folgte in Transfer-Puffer ohne EDTA. Proteine wurden auf Polyvinylidenfluorid-

Membranen (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland), die zuvor mit Methanol aktiviert wurden, geblottet. Die Detektion der Banden erfolgte wie in Section [2.8](#) beschrieben. Die Auswertung erfolgte ebenfalls über die Messung der integrierten Dichte der zur Darstellung kommenden Banden. Das in dieser Studie ausgewertete CK14 wies zwei prominente Banden auf. Es wurde angenommen, dass sich durch die einstündige Behandlung mit D4476 der Phosphorylierungsstatus, aber nicht die Proteinmenge, ändert. So wurde zur Auswertung des Phosphorylierungsstatus der Quotient aus der tiefergelegenen zur höhergelegenen Bande gebildet (siehe roten und grünen Pfeil in Abbildung [3.16](#)).

## 2.12 Dispase-basierter Keratinozytendissoziationsversuch

Dieser etablierte Dissoziationsversuch dient der Quantifizierung der interzellulären Haftungsstärke [\[53\]](#). HaCaT Zellen wurden für jede Kondition doppelt in 24-Well-Platten ausgesät und bis 24 Stunden nach Erreichen der Konfluenz kultiviert. Wichtig als Ausgangspunkt für diesen Versuch war ein 100 % konfluenter Zellrasen. Die Zellen wurden mit vorgewärmten PBS gewaschen und folgend mit 150  $\mu$ l HBSS, welches Dispase II ( $>2.4$  U/ml; Sigma Aldrich) enthielt, für 20 min bei 37°C inkubiert. So löste sich der intakte Zellrasen vom Boden der Well-Platte ab. Nach dem vollständigen Ablösen der Zellrasen wurde die Dispase-II Lösung durch 350  $\mu$ l HbSS zur Beendigung der Reaktion ersetzt. Die flottierenden Zellrasen wurden einem definierten Scherstress ausgesetzt. Mit einer 1 ml elektrischen Pipette (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurden sie zehnmal auf- und abpipettiert. Die so entstandenen Zellfragmente als Zeichen des interzellulären Haftungsverlusts wurden mit einem Binokular-Mikroskop in jeweils gleicher Vergrößerung ausgezählt. Zur graphischen Aufarbeitung des Versuchs wurden 10  $\mu$ M Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium Bromid (MTT) (SigmaAldrich) zu den Kulturschalen zugefügt, welches vitale Zellen violett einfärbt.

## 2.13 Bilddatenanalyse

### 2.13.1 Immunfluoreszenzfärbungen

Die Bilder der Immunfluoreszenzdarstellung wurden mit einem Leica SP5 Konfokalmikroskop mit einem 63x NA 1.4 PL APO Objektiv aufgenommen. Die Mikroskopie wurde mit Lasern von 514 (für YFP) und 543 nm (für Cy3) Wellenlänge zur Exzitation der Fluorophore durchgeführt. Aufgenommen wurde ein quadratischer Ausschnitt von 98,41  $\mu\text{m}$  Seitenlänge mit einer Auflösung von 1024 x 1024 px. Pro Kondition wurden fünf Bilder aufgenommen. Eine Quantifizierung der morphologischen Zytoskelettveränderungen wurde mittels Intensitätsmessungen der jeweiligen Strukturen mit dem Programm ImageJ ([www.nih.gov](http://www.nih.gov)) durchgeführt. Zur Darstellung der Intensitätsprofile wurde ein 15  $\mu\text{m}$  langer und 20 px breiter Balken in einem annähernd rechten Winkel über die Zellgrenze zweier nebeneinanderliegender Zellen gelegt. Hierbei wurde die Dsg3-Färbung dafür genutzt, die Zellgrenzen beziehungsweise die Zellperipherie aufzuzeigen. Die Position des Balkens wurde für die korrespondierenden Dsg3- und CK5- Rohdatenbilder nicht verändert. Entlang des Balkens wurde die Intensität gemessen. Daraus resultierende Intensitätsprofile wurden in Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) zusammengestellt und im Weiteren zur Baseline normalisiert. Für die Normalisierung zur Baseline wurde ein etwa 15 Datenpunkte reichender Abschnitt an den Extremen des Analysebalkens gewählt, der keine größeren Ausschläge aufwies. Ausgewertet wurden 3 bis 5 Zellgrenzen aus 3 bis 5 Bildern pro Experiment.

### 2.13.2 Lebendzellmikroskopie

Insbesondere in der Lebendzellmikroskopie wird häufig die Methode der Dekonvolution genutzt, um die Auflösung zu verbessern. In diesem Fall wurden die in der Lebendzellmikroskopie erworbenen Schichtaufnahmen mit der Software Huygens Essentials 15.05 (Scientific Volume Imaging, The Netherlands, <http://svi.nl>) mit einer „Signal to noise ratio“ von 10 und dabei maximal 30 Wiederholungen (Iterationen) dekonvolviert.

Aufgrund der Vielseitigkeit der zellulären Veränderungen in den Lebendzellaufnahmen, war es notwendig, verschiedene Arten der Quantifizierung zu etablieren. Die Auswertungen wurden, sofern nicht anders genannt, an den Rohdaten der Bilder (16bit) mit ImageJ durchgeführt.

Zur Auswertung der Keratinfilamente, die rechtwinkelig in die Zellmembran einstrahlen, erfolgte in einem ersten Schritt die Anfertigung einer Maximumintensitätsprojektion aller erworbenen Ebenen. Die Keratinfilamente, die auf diese Weise zwei benachbarte Zellen „überbrücken“, wurden anschließend manuell ausgezählt und in Verhältnis zur Länge des gewählten Abschnittes der Zellgrenze gesetzt. Die Länge des Abschnittes wurde hierbei an Bewegungen der Zellen angepasst. Im Weiteren wurden Intensitätsmessungen der Zellperipherie durchgeführt. Hierfür wurde sich zu Nutze gemacht, dass die Größe des Filamentnetzes von peripher nach zentral variiert [110], was sich in den HaCaT-CK5-YFP Zellen ebenso zeigte. Es wurde eine Projektion der unteren circa 4  $\mu\text{m}$  der Zelle angefertigt, was in etwa der Hälfte der Zellhöhe entsprach. Anschließend wurden mit dem Zeichenwerkzeug von ImageJ - dem Gradienten der Netzgröße entsprechend - die mittlere Intensität der Zellperipherie, sowie die mittlere Intensität perinukleär erhoben. Um ein Maß für den Verlust des Keratins in der Zellperipherie zu definieren, wurde aus den Werten der Quotient gebildet (Intensität der Peripherie/Intensität perinukleär).

Um die Vergrößerung des Zytoskeletts zu charakterisieren wurden Maximumintensitätsprojektionen gewählt. In einem ersten Schritt wurden die Intensitäten der Bilder auf ein annähernd gleiches Niveau gehoben. Dies war notwendig, um die einzelnen Experimente vergleichen zu können und anschließend gleiche Schwellenwerte für Operationen definieren zu können. Die weitere Bildbearbeitung erfolgte mit dem Programm CellProfiler [17]. Ziel war die Skelettierung unter Anwendung eines hohen Schwellenwerts, so dass letzten Endes nur grobe Elemente des Zytoskeletts dargestellt wurden. Dazu wurde in einem ersten Schritt der „tubeness“ Filter angewandt. Der Schwellenwert 0.2 wurde für die Darstellung empirisch ermittelt. Weitere Filter ermöglichten es, Fehlersignale zu reduzieren, indem Signale von einem Pixel Größe entfernt und Lücken dieser Größe zwischen Filamenten geschlos-

sen wurden. Die daraus resultierenden Bilder zeigten nun grobe Filamente in weiß. Um dieser Vergrößerung des Zytoskeletts nun einen quantitativen Wert zuzuschreiben, wurde die Intensität des gesamten Bildes gemessen.

Die Auswertung der Verteilung des Dsg3 wurde an einer Projektion von 3 Schichten (1.5  $\mu\text{m}$ ) durchgeführt. Für die Aufnahmen wurden nur Zellen ausgewählt, die eine eindeutige Verteilung des Dsg3 entlang der Membran zeigten. Es wurde zuerst die Ebene mit dem größten Kerndurchmesser identifiziert und von dieser ausgehend die darüber- und darunterliegende gewählt. Die mittlere Intensität einer 2  $\mu\text{m}$  breiten Region entlang der Zellperipherie wurde mit der Intensität des übrigen Zytoplasmas verglichen. Der Zellkern wurde bei dieser Messung ausgeschlossen, da er frei von Signalen war. Dieser Index zeigt eine Intensitätsverlagerung von Zellgrenze in das Zytoplasma als Zeichen einer Dsg3-Internalisierung (Intensität Zellgrenze/Intensität Zytoplasma).

Zur Bestimmung der Aggregationen innerhalb der membranständigen Dsg3-Verteilung wurde ein 10  $\mu\text{m}$  langer und 10 px breiter Balken in Längsverlauf des membranösen Dsg3-Signals gelegt. Das Intensitätsprofil an dieser Stelle wurde alle 12 min evaluiert. So zeigten sich Anhäufungen als Spitzen im Intensitätsprofil. Um eine Zu- oder Abnahme der Spitzen detektieren zu können, wurde zuerst die durchschnittliche Intensität zum Zeitpunkt 0 min berechnet. Dieser Wert wurde mit 1.5 multipliziert und als Schwellenwert für die folgenden Zeitpunkte genutzt. Die Fläche, die von der Schwellenwertlinie und der Intensitätskurve begrenzt wurde, wurde für die jeweiligen Zeitpunkte berechnet und in einem Diagramm aufgetragen. Dieser Wert wurde als Aggregationsindex bezeichnet und als das Vielfache des Wertes zum Zeitpunkt  $t=0$  dargestellt.

## 2.14 Statistik und Auswertung

Zur Zusammenstellung der Abbildungen wurde Photoshop CC 2017 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA) genutzt. Die Datenauswertung erfolgte mit Excel Version 15.11 für Mac OS (Microsoft, Redmond, WA, USA). Statistische Signifikanz wurde mit dem gepaarten Student's T-Test für zwei Gruppen mit

Hilfe von Excel determiniert. Für mehr als zwei Gruppen wurde der one-way ANOVA gefolgt von einer Bonferroni Korrektur mit Graphpad Prism (Graphpad Software, LaJolla, CA, USA) durchgeführt. Für die Signifikanz wurde ein p-Wert  $< 0.05$  festgelegt. Die gezeigten Daten stellen den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler („Standard Error of the Mean“, SEM) dar. Ergebnisse wurden aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt.



# 3 Ergebnisse

In dieser Studie wurden zahlreiche biochemische und bildgebende Methoden zur räumlichen und zeitlichen Einordnung der Zytoskelettveränderungen sowie Dsg3-Umverteilung als Reaktion auf Immunglobuline von Patienten mit Pemphigus vulgaris genutzt. Insbesondere die Abhängigkeit zwischen der Keratinretraktion und Dsg3-Internalisierung stand im Fokus dieser Forschungsarbeit.

## 3.1 PV-IgG induziert Veränderungen der Keratin- und Dsg3-Verteilung

### 3.1.1 PV-IgG führt zur Keratinretraktion und Dsg3-Depletion

Zu Beginn dieser Studie stellte sich die Frage, ob die aus der Literatur bekannten Zytoskelettveränderungen [134] durch Pemphigus-vulgaris-Immunglobuline (PV-IgG) unter statischen Bedingungen in der Zellkultur gezeigt werden können. Hierzu wurde mit HaCaT-Keratinocyten gearbeitet, die Zytokeratin 5 (CK5) gekoppelt an das gelb-fluoreszierende Protein zusätzlich zum endogenen CK5 stabil exprimieren. Nach Erreichen der Konfluenz wurde eine Inkubationsreihe mit PV1-IgG von 2 h, 12 h und 24 h durchgeführt. In dieser Immunfluoreszenzdarstellung zeigte sich das Zytoskelett insbesondere nach 12 h sowie 24 h von der Zellperipherie retrahiert (siehe Abbildung 3.1, Pfeile). Zudem waren auch Veränderungen der Verteilung des Dsg3 nach 12 h und 24 h deutlich ersichtlich.

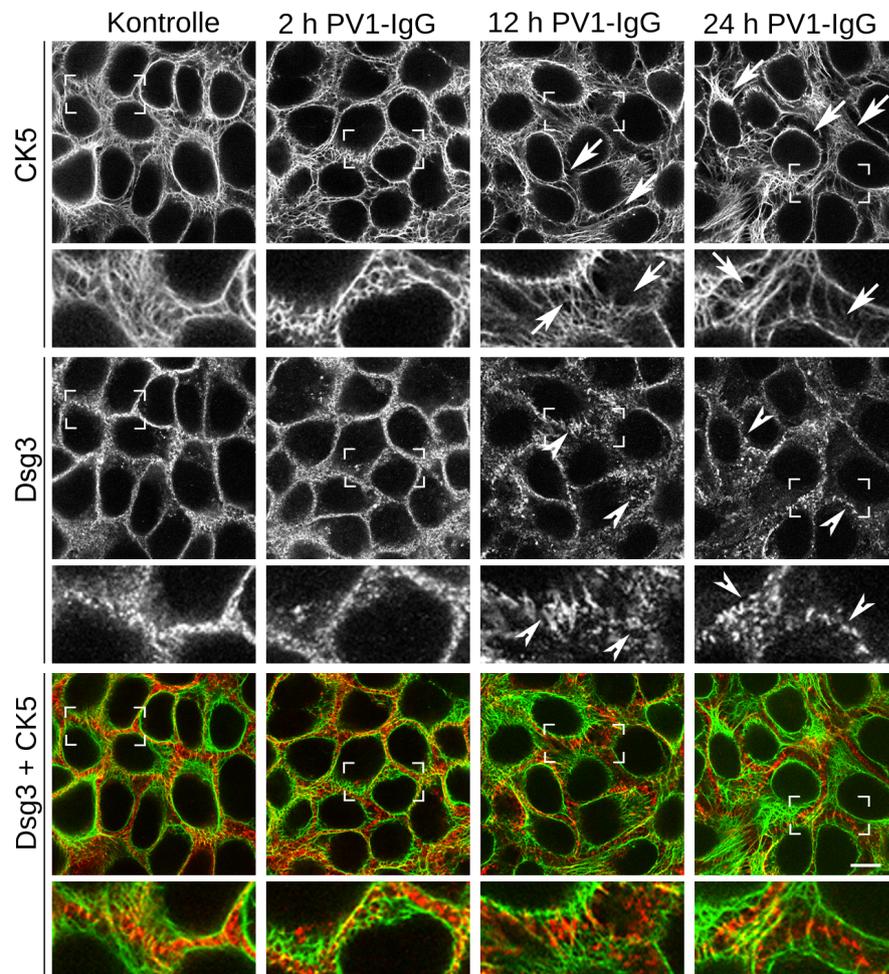


Abbildung 3.1: **Zytoskelettveränderungen unter statischen Bedingungen.** Die Abbildung ist modifiziert nach Schlögl et al. [104]. CK5-YFP-exprimierende HaCaT-Keratinozyten wurden 2 h, 12 h und 24 h lang mit PV1-IgG behandelt. Dargestellt sind die Dsg3-Färbung und CK5-YFP-Expression. Die Pfeile weisen auf den Zytokeratinverlust in der Zellperipherie hin. Die Pfeilspitzen zeigen die Dsg3-Veränderungen auf. Nach 12 h zeigen sich „linear arrays“. Die vergrößerten Areale entsprechen den umrandeten Arealen. Der Balken ist 10  $\mu\text{m}$  lang. Die Bilder sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

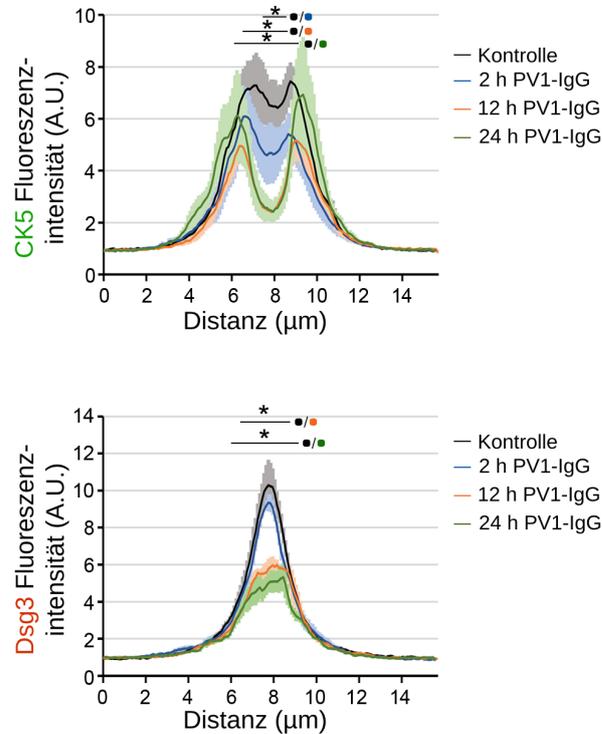


Abbildung 3.2: **CK5 und Dsg3 Fluoreszenzintensität unter statischen Bedingungen.** Die Abbildung ist modifiziert nach Schlögl et al. [104]. Gezeigt ist der Vergleich der Fluoreszenzintensitätsprofile entlang eines 15 µm x 10px Balken, der im rechten Winkel zur Zellmembran zweier benachbarter Zellen gelegt wurde (\*  $p \leq 0.05$  zur Kontrolle).

Dsg3 bildete verstärkt Aggregationen und zeigte eine reduzierte Verteilung entlang der Membran (siehe Abbildung 3.1, Pfeilspitzen). Insbesondere nach 12 h war ein Verteilungsmuster erkennbar, das in der Literatur als „linear arrays“ (dt.: lineare Anordnung) beschrieben ist [54]. Hierbei verläuft das Dsg3 strangförmig perpendicular zur Zellmembran. Intrazelluläre Dsg3-Aggregationen wiesen auf eine mögliche vorangehende Internalisierung hin. Auswertungen der Intensität der Fluoreszenz beider zellulärer Strukturkomponenten konnten eine signifikante Reduktion in der Zellperipherie nach 12 h sowie 24 h nachweisen (siehe Abbildung 3.2). Unter physiologischen Bedingungen zeigte das Intensitätsprofil des Zytokeratins zwischen zwei benach-

barten Zellkernen ein „Plateau“. Bei retrahiertem Zytoskelett und damit einhergehendem Verlust der Fluoreszenz „zwischen“ zwei benachbarten Zellen wurde dieser Verlust als Einsenkung im Plateau erkennbar. Ähnlich verhielt sich das Dsg3. Hier zeigte sich die lineare Anordnung entlang der Zellgrenze unter physiologischen Bedingungen als Intensitätspeak, der nach 12 bzw 24 h PV-IgG-Inkubation signifikant abgeflacht war. Während bei längerer Inkubation mit pathogenen Antikörpern Veränderungen deutlich erkennbar waren, zeigten sich nach 2 h nur subtile Veränderungen. Dsg3 erschien aufgelockert, die Auswertung zeigte jedoch keine signifikante Intensitätsumverteilung oder gar Intensitätsverlust. Im Gegensatz dazu war eine beginnende Reduktion der Keratinintensität an den Zellgrenzen bereits detektierbar.

Dass es sich hierbei auch tatsächlich um eine Änderung der Proteinmengen handelte und nicht nur um eine Umverteilung, zeigte eine semi-quantitative Bestimmung unter den gleichen Bedingungen mittels Western-Blotting (siehe Abbildung 3.3).

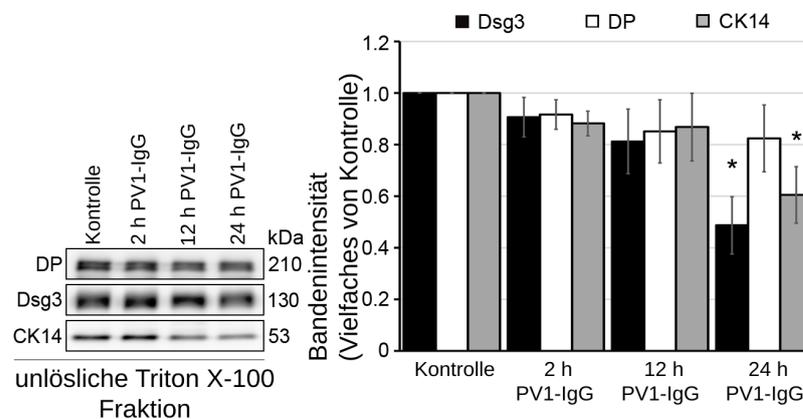


Abbildung 3.3: **Proteinmengen nach PV1-IgG-Inkubation in der Triton X-100 unlöslichen Fraktion.** Die Abbildung ist modifiziert nach Schlögl et al. [104]. Die Triton X-100 unlösliche Fraktion stellt zytoskelettalgebundene Proteine dar. Die Zellen wurden mit PV1-IgG für die angegebenen Zeitintervalle behandelt. Die densitometrische Auswertung der Proteine ist als ein Vielfaches der Kontrolle dargestellt.

Ermittelt wurden hierbei die zytoskelettalen bzw. zytoskelettalgebundenen Proteine (unlösliche Triton X-100 Fraktion). Während sich die

Proteinmenge von Desmoplakin (DSP) über 24 h PV1-IgG Behandlung nicht signifikant änderte, sanken die Mengen an Dsg3 und CK14 nach 24 h signifikant um 51,3 % (Dsg3) bzw. 39,5 % (CK14). Diese Ergebnisse deuten auf den Abbau des Zytoskeletts nach längeren Perioden der PV-IgG-Inkubation hin. Zu den früheren untersuchten Zeiten, also 2 h und 12 h, zeigte sich eine Tendenz, jedoch keine signifikante Reduktion der Proteinmengen. Im Balkendiagramm sind die gemessenen integrierten Dichtewerte normiert zur Kontrolle (0h Wert) dargestellt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die hier verwendete Zelllinie die typischen PV-IgG induzierten Veränderungen aufwies.

#### 3.1.2 PV-IgG führt zum Haftungsverlust in der Keratinozytenkultur

Trotz der nur geringen strukturellen Veränderungen nach 2 h PV1-IgG Behandlung war die Zellhaftung in Dispase-basierten Dissoziationsversuchen bereits deutlich eingeschränkt (siehe Abbildung [3.4](#)).

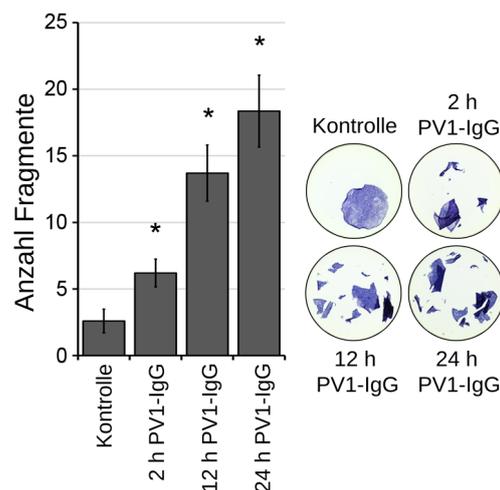


Abbildung 3.4: **Haftungsverlust nach PV1-IgG-Inkubation.** Die Abbildung ist modifiziert nach Schlögl et al. [\[104\]](#). Dispase-basierter Dissoziationsversuch in HaCaT-CK5-Zellen nach Behandlung mit PV1-IgG. Die Bilder zeigen die Zellrasen nach Färbung mit 10µM MTT zur besseren Darstellung.

Dies ist ein in Keratinozyten gut etablierter Versuchsansatz, bei dem nach Scherstressapplikation auf einen Zellrasen die Anzahl an Zellrasenfragmenten als indirektes Maß für die Zellkohäsion herangezogen wird. Passend zu den Veränderungen auf Proteinebene und in der räumlichen Verteilung war auch die interzelluläre Adhäsion zu späteren Zeitpunkten stärker gestört, sodass nach 24 h Antikörperexposition  $18,4 \pm 2,7$  Fragmente im Vergleich zur Kontrollbedingung mit  $1,8 \pm 0,7$  Fragmente vorlagen. Zusammenfassend nahm die Anzahl der Fragmente stetig über die 24 h zu und damit die Zellkohäsion ab.

### 3.1.3 Frühe Veränderungen des Keratinzytoskeletts

In den zuvor genannten Experimenten konnten schon nach 2 h Veränderungen des Zytoskeletts detektiert werden, doch ein genauer zeitlicher Ablauf und Zusammenhang zwischen Dsg3-Internalisierung und Zytokeratinretraktion nach PV-IgG-Zugabe waren unbekannt und sollten weiter untersucht werden. Nachdem nach 2 h auch die Zellhaftung eingeschränkt war, wurden von diesem Zeitintervall Lebendzellaufnahmen von HaCaT-CK5-Zellen mit einem Konfokalmikroskop angefertigt. Konfokalmikroskopie ermöglichte eine hochauflösende dreidimensionale Darstellung der Zellen. An der selben xy-Position wurden in 30-Sekunden-Intervallen Reihenaufnahmen in der z-Dimension (z-Stapel), die die gesamte Zelle überspannten, aufgenommen. Durch eine Inkubationskammer konnten Bedingungen für Lebendzellaufnahmen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> geschaffen werden (siehe Methoden [2.6](#)). Die HaCaT-CK5-Zellen wurden entweder mit PV1-IgG oder C-IgG für Kontrollbedingungen inkubiert. Zuerst wurde in Maximumintensitätsprojektionen die Anzahl an Keratinfilamenten, die perpendicular zur Zellmembran verlaufen, ausgewertet (siehe Abbildung [3.5](#)). Diese Filamente sind sehr stabil und zeigten keine Veränderung im Laufe von 2 h PV1-IgG Behandlung im Vergleich zu den Kontrollbedingungen. Aufgrund des unterschiedlichen Aufbaus des Keratinzytoskeletts von der Zellperipherie nach zentral (siehe Kapitel [1.4.2](#)) wurden die unteren 4 µm des Keratinozytenzellrasens separat analysiert (siehe Abbildung [3.6](#)). Die dicken Keratinbündel, die perpendicular zur Zellgrenze

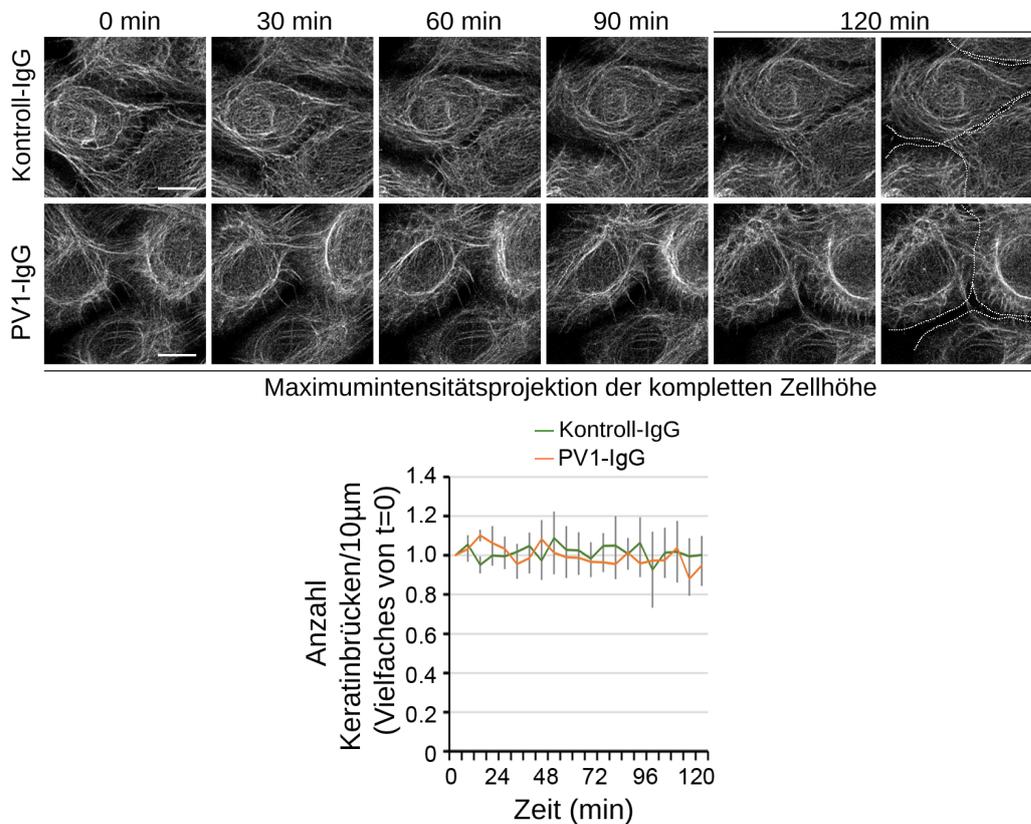


Abbildung 3.5: **Keratinbrücken unter 2 h PV-IgG-Inkubation.** Die Abbildung ist modifiziert nach Schlögl et al. [104]. Gezeigt sind die Maximumintensitätsprojektionen der gesamten Zellhöhe. Die Aufnahmen wurden alle 30 Sekunden angefertigt. Der eingefügte Balken ist 10 µm lang. Die Bilder sind repräsentativ für 8-10 Zellen aus 3 bzw. 4 unabhängigen Experimenten. Die Anzahl der Keratinbrücken, die zwei benachbarte Zellen überspannen, wurden in 6-Minuten-Intervallen ausgewertet. Die Signifikanztestung erfolgte zum jeweiligen Zeitpunkt im Vergleich zur C-IgG-Inkubation. Die gestrichelten Linien zeigen die Grenzen des Keratinzytoskeletts auf.

laufen, wurden auf diese Art und Weise ausgeblendet. So konnte ausgeschlossen werden, dass die Maximumintensitätsprojektion Effekte verschleierte. Im Bereich der Peripherie der Zelle, sowohl basal als auch perimembranär, ist das Keratinzytoskelett am volatilsten [72]. Tatsächlich konnte in diesen Ebenen nach etwa 60 min PV1-IgG-Inkubation ein signifikanter Verlust an Fluoreszenzsignal in der Zellperipherie detektiert werden. Insgesamt handelte es sich

um subtile Veränderungen, die jedoch konsistent zu beobachten waren.

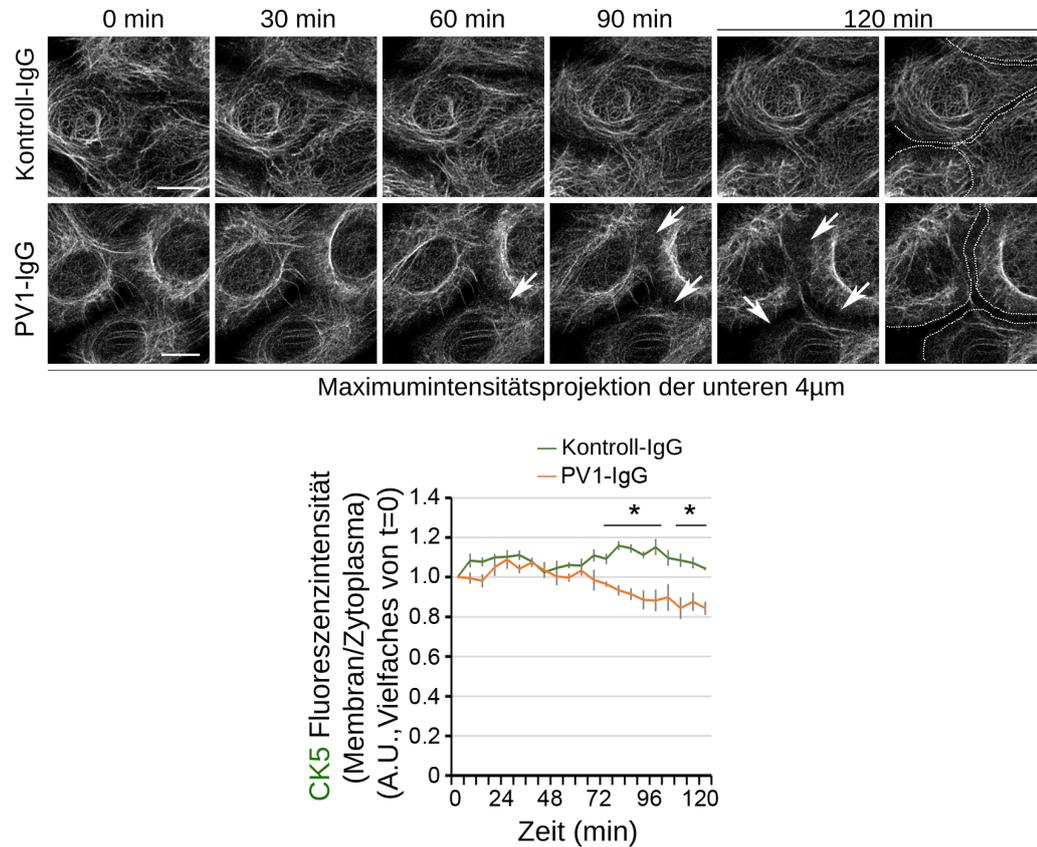


Abbildung 3.6: **Abnahme der CK5 Fluoreszenzintensität in der Zellperipherie unter 2 h PV1-IgG-Inkubation.** Die Abbildung ist modifiziert nach Schlögl et al. [104]. Gezeigt sind die Maximumintensitätsprojektionen der unteren 4 µm der Zellen. Die Pfeile weisen auf den CK5 Fluoreszenzintensitätsverlust hin. Der eingefügte Balken ist 10 µm lang. Die Ratio der CK5 Fluoreszenzintensität in der Zellperipherie und perinukleär wurde alle 6 min ausgewertet. Die Signifikanztestung erfolgte zum jeweiligen Zeitpunkt im Vergleich zur C-IgG-Inkubation. Die gestrichelten Linien zeigen die Grenzen des Keratinzytoskeletts auf.

### 3.1.4 Keratin-Bundling

Zur weiteren Einordnung der frühen Zytoskelettveränderungen wurden Übersichtsaufnahmen angefertigt. Die Experimente erfolgten über 12 h mit einer

geringeren zeitlichen Auflösung. Hierbei zeigte sich, dass die Keratinfilamente nach etwa 6 h zu dickeren Bündel kondensierten. Diese Kondensation nahm über den Zeitverlauf von 12 h weiter zu (siehe Abbildung 3.7). Zur Dar-

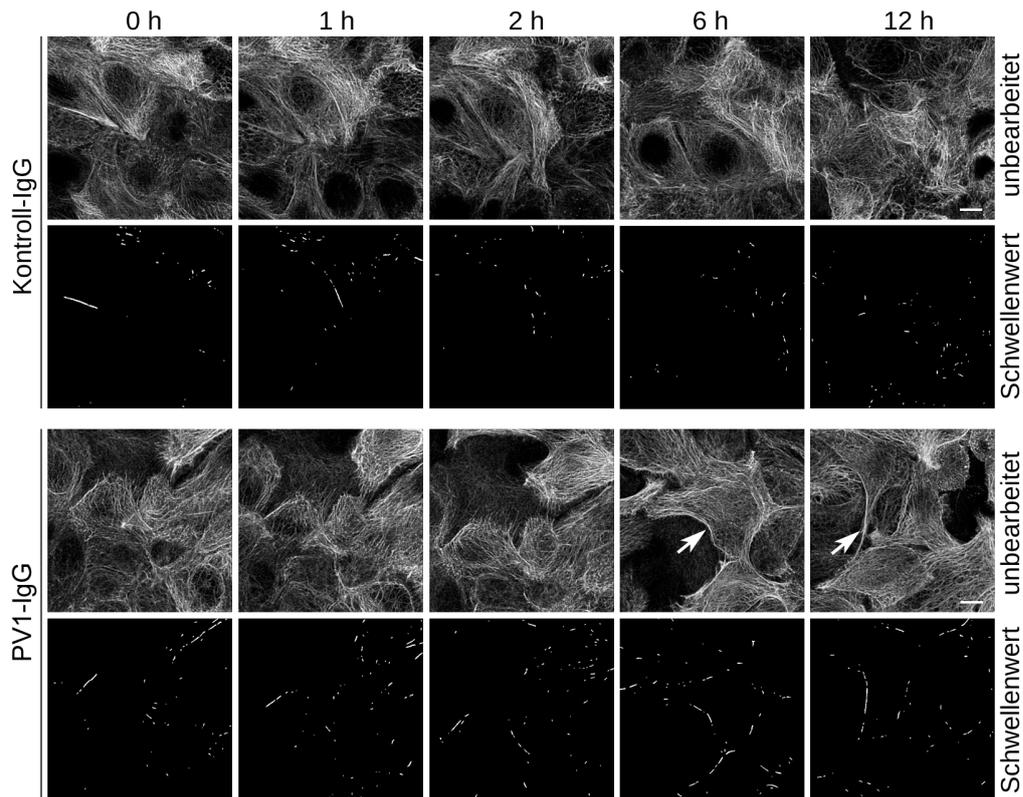


Abbildung 3.7: **Keratinbündel als Folge der PV1-IgG-Inkubation.** Die Abbildung ist modifiziert nach Schlögl et al. [104]. Die Bündelformation wurde dadurch veranschaulicht, dass ein Intensitätsschwellenwert auf die Bilder angewandt wurde. Dieser wurde so hoch gewählt, dass nur kräftige Bündel übrig blieben. Die Balken stellen 10  $\mu\text{m}$  dar. Die Bilder sind repräsentativ für drei bzw. vier unabhängige Experimente.

stellung dieser kondensierten Bündel wurde nach Skelettierung des Zytoskeletts ein Schwellenwert für die Intensität der Bilder appliziert. Das Signal, das über diesem Schwellenwert lag, wurde in Intensitätsmessungen bestimmt (siehe Methoden 2.13.2). Diese Intensität als indirektes Maß für das Keratin-Bundling war nach 12 h PV1-IgG-Inkubation im Vergleich zu Kontrollinkubationen signifikant erhöht (siehe Abbildung 3.8). Zusammen-

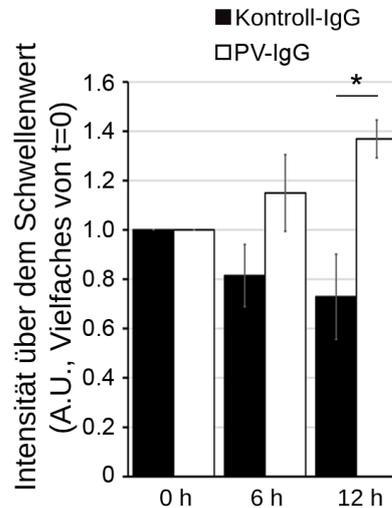


Abbildung 3.8: **Auswertung der Keratinbündel.** Die Abbildung ist modifiziert nach Schlögl et al. [104]. Die nach Applikation des Schwellenwertes verbleibende Intensität wurde gemessen und mit C-IgG-Inkubationen verglichen.

genommen lassen diese Ergebnisse einen biphasischen Verlauf der Keratinveränderungen nach PV-Antikörperexposition vermuten. Zuerst nimmt ein Pool an Zytokeratinmolekülen in der Zellperipherie ab, der entsprechend dem Lebenszyklus der Keratine möglicherweise für den Aufbau des Zytoskeletts verantwortlich ist. Gefolgt werden diese Veränderungen von der Kondensation zu stabilen, dicken Filamenten. Diese dicken Filamente könnten reaktive Veränderungen darstellen, die den kontinuierlichen Haftungsverlust kompensieren sollen. Gleichzeitig sind die perpendikulär in die Membran einstrahlenden Filamente jene, die Desmosomen verankern könnten.

### 3.1.5 Dsg3-Internalisierung und -Aggregation

Nach Etablierung des zeitlichen Verlaufs der Veränderungen der Keratinintermediärfilamente wurde die Beziehung zwischen Keratinveränderungen und Dsg3-Internalisierung mittels Lebendzellmikroskopie untersucht. Ein von Frau Dr. Mariya Radeva generiertes Konstrukt aus murinem Dsg3, an das C-terminal das fluoreszierende Protein mCherry gebunden wurde, wur-

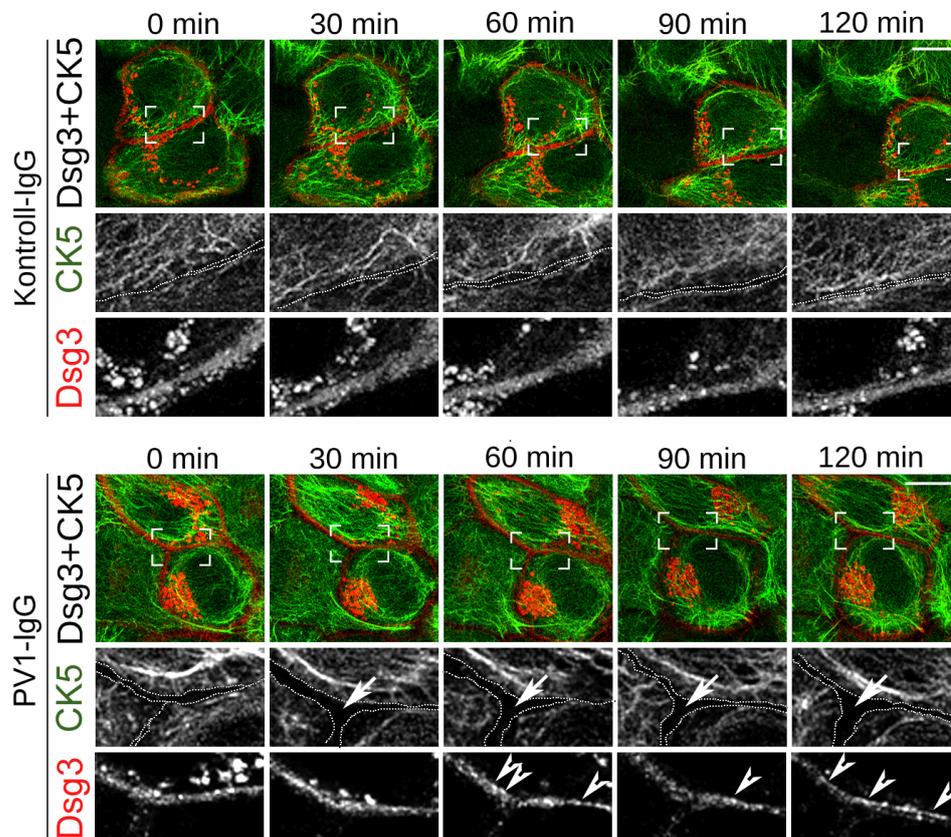


Abbildung 3.9: **Keratin- und Dsg3-Veränderungen unter 2 h PV1-IgG.** Die Abbildung ist modifiziert nach Schlögl et al. [104]. HaCaT-Keratinozyten mit CK5-YFP-Expression wurden mit Dsg3-mCherry transfiziert. Die Zellen wurden in der Lebendzellmikroskopie mit PV1-IgG oder für Kontrollbedingungen mit C-IgG behandelt. Die Bilder wurden in einem 2-Minuten-Intervall über 2 h hinweg aufgenommen. Die gepunkteten Linien zeigen die Grenzen des Keratinzytoskeletts auf. Die Pfeile markieren die breiter werdenden Lücken im Keratinzytoskelett zwischen benachbarten Zellen. Die Pfeilspitzen indizieren Dsg3-Aggregationen innerhalb der Membran. Fünf bzw. sechs Zellen aus separaten Experimenten wurden analysiert.

de für transiente Transfektionen von HaCaT-CK5-YFP-Zellen genutzt. Vergleichbar mit den Ergebnissen ohne zusätzliche transiente Transfektion wurde eine Reduktion der Fluoreszenz des Keratinnetzwerkes in der Zellperipherie nach circa 60 min PV1-IgG-Inkubation detektiert (siehe Abbildung 3.9). Dies kann als Hinweis gesehen werden, dass die Überexpression von Dsg3 die Dy-

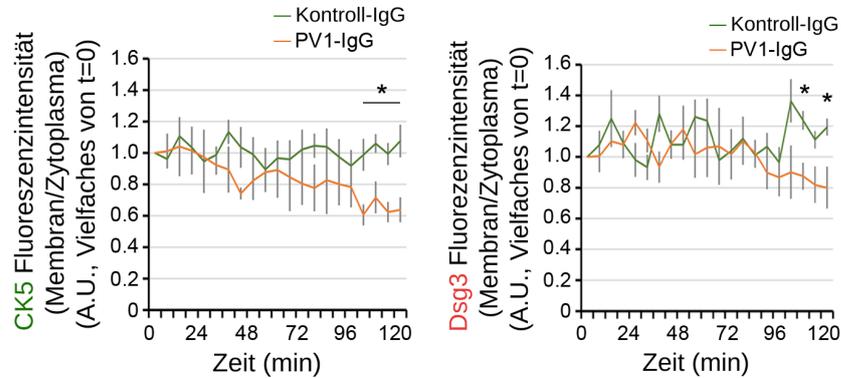


Abbildung 3.10: **Analyse der CK5 und Dsg3 Fluoreszenzintensität unter 2 h PV1-IgG.** Die Abbildung ist modifiziert nach Schlögl et al. [104]. Die CK5- sowie Dsg3-Fluoreszenzintensität wurden in der Zellperipherie gemessen und ins Verhältnis mit der Fluoreszenzintensität im Zytoplasma gesetzt. In 6-Minuten Intervallen wurden die Bilder analysiert.

namik des Keratins nicht beeinflusste. Zur Auswertung der Dsg3-Verteilung wurden ebenfalls Intensitätsanalysen in der Zellperipherie durchgeführt und diese in Relation zur Fluoreszenzintensität des Zytoplasmas gesetzt, um eine Verschiebung von der Zellgrenze ins Innere der Zelle wahrnehmen zu können (siehe Methoden 2.13.2). Das Dsg3-Signal entlang der Zellgrenze blieb in diesen Experimenten für 90 min nach PV1-IgG Zugabe stabil, ehe die Intensität des Dsg3-Signals entlang der Zellgrenze abnahm (siehe Abbildung 3.10). Entsprechend dieser Auswertungen fanden Veränderungen der Dsg3-Verteilung im Sinne einer Dsg3-Internalisierung zeitlich nach Veränderungen des Zytoskeletts statt. Zusätzlich sollte gezeigt werden, ob die exogene Expression von CK5 die zeitliche Abfolge der Dsg3-Veränderungen beeinflusste. Hierzu wurden HaCaT-Wildtypzellen mit Dsg3-GFP transient transfiziert und Lebendzellaufnahmen angefertigt (siehe Abbildung 3.11). Dsg3-GFP wurde aufgrund seiner höheren Transfektionseffizienz verglichen mit Dsg3-mCherry genutzt. Die Internalisierung des in diesen Zellen exprimierten Dsg3-GFPs konnte ebenfalls nach ca. 90 min detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass die Expression von CK5 keinen protektiven Einfluss auf die Dsg3-Internalisierung hat. Um die Bilddaten zur Dsg3-Internalisierung durch einen biochemischen Ansatz zu ergänzen, wurden Biotinylierungsver-

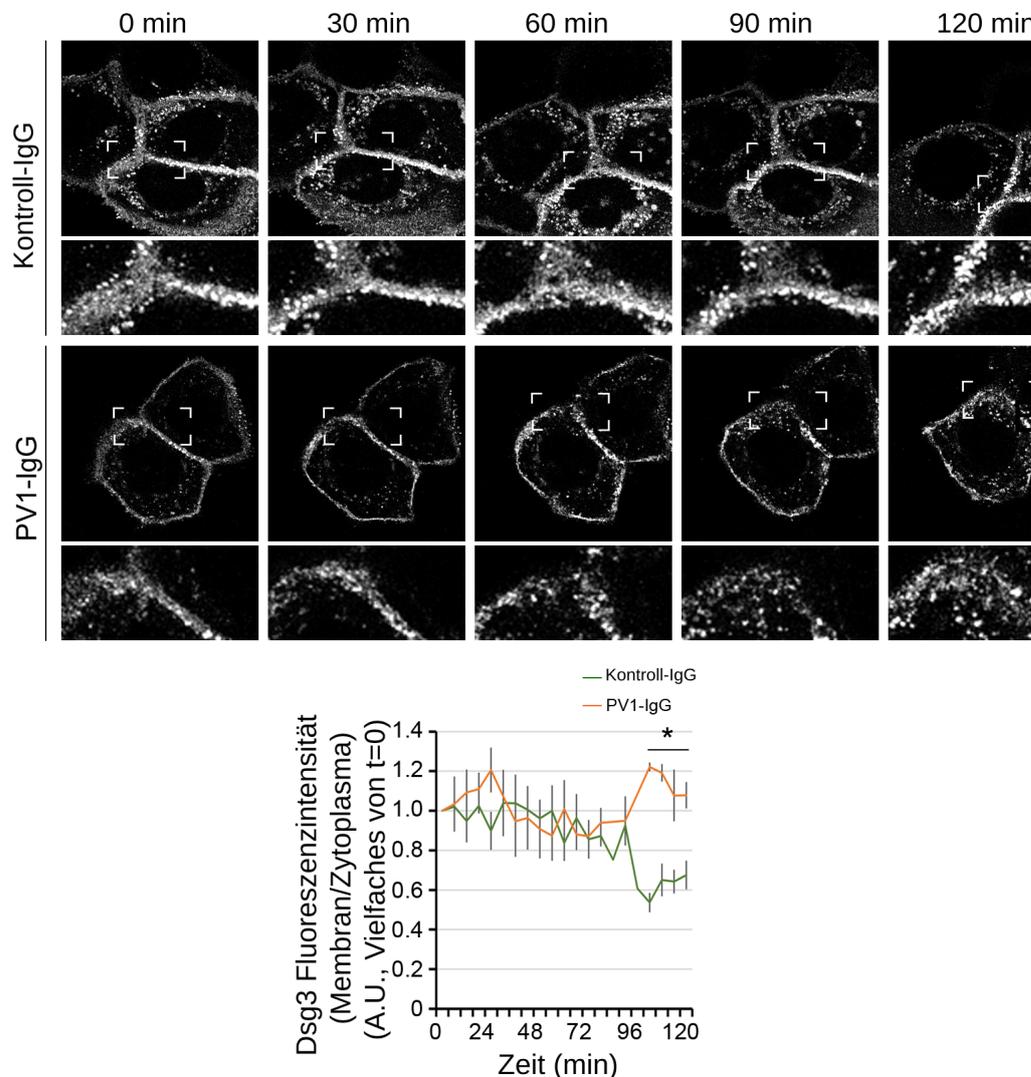


Abbildung 3.11: **Dsg3-Verteilung unter 2 h PV1-IgG in HaCaT-Wildtypzellen.** Die Abbildung ist modifiziert nach Schlögl et al. [104]. HaCaT-Wildtypzellen zeigten in Hinblick auf die Dsg3-Internalisierung einen ähnlichen zeitlichen Ablauf wie HaCaT-CK5-Zellen. Die Bilder sind repräsentativ für 4 unabhängige Experimente. Die Dsg3 Fluoreszenzintensität entlang der Membran im Verhältnis zum Zytoplasma wurde alle 6 Minuten evaluiert.

suche durchgeführt. Dabei werden spezifisch die an der Zelloberfläche gelegenen Proteine detektiert. Der Biotinylierungsversuch ermöglicht, die Internalisierung von Dsg3 zu analysieren, noch bevor quantitative Verände-

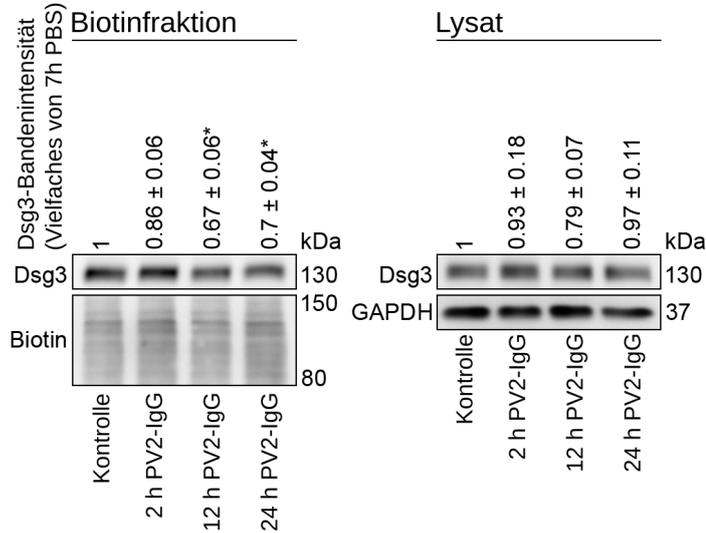


Abbildung 3.12: **Dsg3-Internalisierung in HaCaT-CK5-Zellen unter PV2-IgG-Inkubation.** Die Abbildung ist modifiziert nach Schlögl et al. [104]. Biotinylierungsansatz mit Streptavidin, wodurch biotinylierte Membranmoleküle isoliert wurden. Die Zellen wurden 2, 12 und 24 h mit PV2-IgG behandelt. Die Proteinmengen wurden mittels Westernblot Analyse ermittelt und densitometrisch ausgewertet. Die Abbildung ist repräsentativ für drei bzw. vier unabhängige Experimente.

rungen des Gesamtproteingehalts zustandekommen. Nach 12 h sowie 24 h PV2-IgG-Inkubation konnte eine signifikante Reduktion der membranständigen Dsg3-Moleküle gezeigt werden (siehe Abbildung 3.12). Passend zu den Bilddaten der frühen Zeitspannen nach Antikörperinkubation zeigte sich 2 h nach PV2-IgG-Inkubation nur eine geringe Reduktion der Dsg3-Menge an der Zelloberfläche ( $0,86 \pm 0,06$ ). Dieses Ergebnis schließt jedoch nicht aus, dass die Verteilung von Dsg3 innerhalb der Membran als Reaktion auf die Antikörperinkubation verändert war. In der Literatur ist beschrieben, dass der Internalisierung von Dsg3 eine Aggregation der Moleküle (Clusterbildung) entlang der Membran nach PV-IgG-Exposition vorausgeht [54]. Daher wurden Intensitätsprofile entlang der Membran angefertigt und über die Zeit der Lebendzellaufnahmen dargestellt (siehe Abbildung 3.13). Dabei konnten Dsg3-Aggregationen als neu aufgetretene Spitzen im Intensitätsprofil darge-

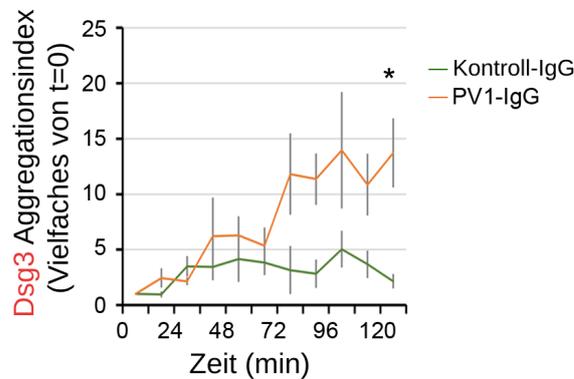


Abbildung 3.13: **Zunehmende Dsg3-Aggregationen unter PV1-IgG-Inkubation.** Die Abbildung ist modifiziert nach Schlögl et al. [104]. Die Dsg3-Aggregation entlang der Zellmembran wurde zwischen PV-IgG- und C-IgG-Inkubation verglichen. Gezeigt wird der Aggregationsindex. Die Werte wurden aus fünf bzw. sechs unabhängigen Experimenten ermittelt.

stellt werden. Erste Spitzen zeigten sich nach 60 min PV1-IgG Behandlung und ihr Ausmaß nahm über die Zeit zu. Mittels Dispase-basierendem Zelldissoziationsversuch wurde die Zellkohäsion parallel zu den morphologischen Daten in engen Zeitintervallen ermittelt (siehe Abbildung 3.14).

Über 2 Stunden hinweg wurde in 15 Minuten Abständen der Effekt von PV2-IgG oder - im Falle der Kontrollbedingungen - C-IgG untersucht. Während 24 h nach Inkubation mit pathogenen Dsg3-Antikörpern typischerweise eine massive Störung der Zellrasenintegrität auftritt, zeigte sich zu diesen sehr frühen Zeitpunkten vor allem ein Zerfall des Zellrasens im Randbereich. Im Zentrum der Zellschicht ist diese dichter als im Randbereich, sodass dies möglicherweise ein Grund für das Zerfallsmuster zu den frühen Zeitpunkten ist. Bereits nach 30 min zeigte sich unter PV2-IgG eine signifikante Zunahme an Zellfragmenten nach Applikation von Scherstress:  $2,7 \pm 0,6$  Fragmente nach C-IgG im Vergleich zu  $6,3 \pm 1,2$  Fragmenten unter PV2-IgG Zugabe. Die Fragmentzahl als indirektes Maß für den Haftungsverlust nahm im Laufe der 2 h weiter zu:  $4,5 \pm 1,4$  unter Kontrollbedingungen im Vergleich zu  $12,6 \pm 2,7$  unter PV2-IgG-Inkubation. Zusammenfassend konnten diese Experimente zeigen, dass die Veränderungen des Zytoskeletts zeitlich

mit dem Haftungsverlust und der Ausbildung von Dsg3-Aggregationen einhergehen, jedoch vor einer morphologisch und biochemisch detektierbaren Dsg3-Internalisierung auftreten.

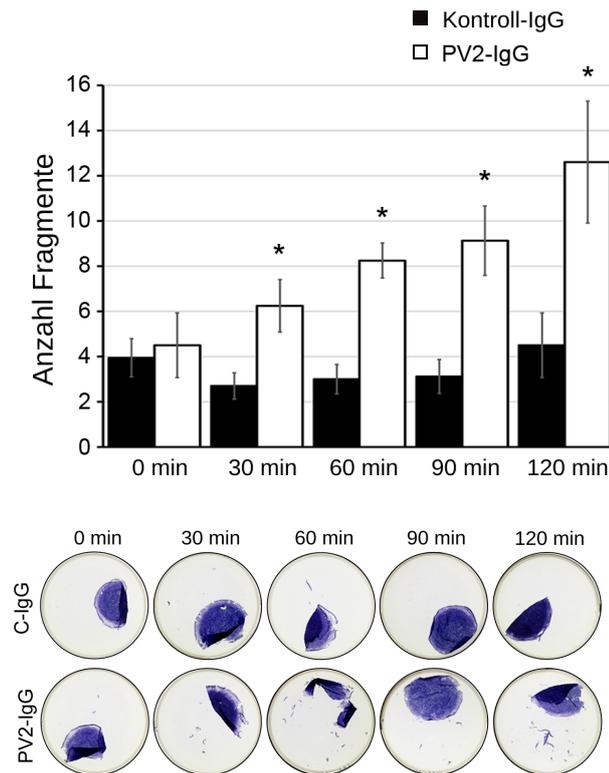


Abbildung 3.14: Engmaschige Verlaufskontrolle der Zellhaftung unter 2 h PV2-IgG-Inkubation. Die Abbildung ist modifiziert nach Schlögl et al. [104]. Der Zellhaftungsverlust innerhalb von 2 h PV2-IgG-Inkubation wurde mittels Dispase-basierendem Dissoziationsversuch erhoben. Die Werte entstammen vier bzw. fünf unabhängigen Experimenten.

### 3.2 Keratinumverteilung durch CK-1-Inhibition

Basierend auf dem Ergebnis, dass Veränderungen der Keratinfilamente mit einer Ausbildung von Dsg3-Aggregationen einhergehen, aber vor einer Dsg3-

Depletion auftreten, stellte sich die Frage, ob die Regulation des Dsg3-Umsatzes abhängig vom Keratinzytoskelett stattfindet. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurde ein pharmakologischer Ansatz zur Induktion von Keratinveränderungen unabhängig von PV-Antikörpern gewählt. Die Casein-Kinase-1 (CK-1) wurde als wichtiges Enzym in der Organisation des Keratinzytoskeletts identifiziert. Dies geschieht FAM83H-abhängig [70]. Die CK-1 reguliert den filamentären Status von Keratinfilamenten und die Inhibition der Kinase führt zur Anordnung des Zytoskeletts in kräftigen Bündeln rund um den Zellkern. Morphologisch ähnelt diese Keratinreorganisation unter CK-1-Inhibition dem Phänotyp der Keratinretraktion nach PV-IgG-Inkubation. D4476 ist ein selektiver und zellpermeabler CK-1-Hemmer. Die Auswirkungen der CK-1-Inhibition wurden in HaCaT-CK5-Zellen untersucht (siehe Abbildung 3.15). In diesen Zellen zeigte sich bereits nach einstündiger Inkuba-

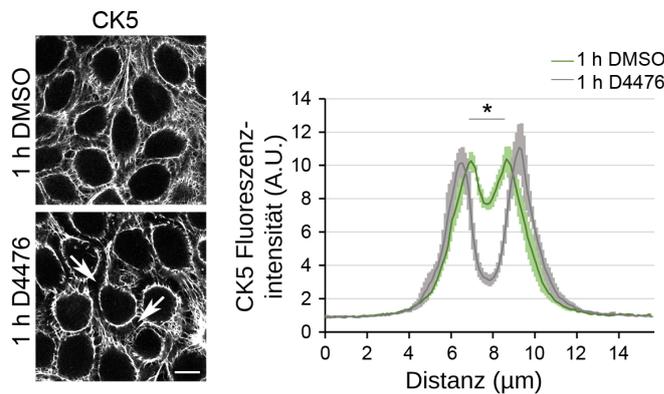


Abbildung 3.15: **Keratinumverteilung nach CK-1-Inhibition.** Die Abbildung ist modifiziert nach Schlögl et al. [104]. Die Inhibition der CK-1 führte zu Pemphigus-ähnlichen Keratinveränderungen in HaCaT-CK5-Zellen. Die Keratinretraktion wurde mittels Intensitätsprofilmessung analysiert. Ausgewertet wurden je 25 Zellen aus drei bzw. vier unabhängigen Experimenten. Der Balken ist 10  $\mu\text{m}$  lang.

tion mit D4476 die Reorganisation des Zytoskeletts mit einer vorwiegenden Anordnung perinukleär. Auswertungen der Intensitätsprofile zwischen zwei benachbarten Zellen ergaben einen signifikanten Verlust an Fluoreszenzintensität in der Zellperipherie (dargestellt durch die Senke im Intensitäts-

profil im Vergleich zur Kontrollinkubation mit DMSO). Experimente zum Phosphorylierungsstatus des Zytokeratins konnten den Effekt von D4476 auf das CK14 nachweisen (siehe Abbildung [3.16](#)). Der Phos-Tag Versuch enthüll-

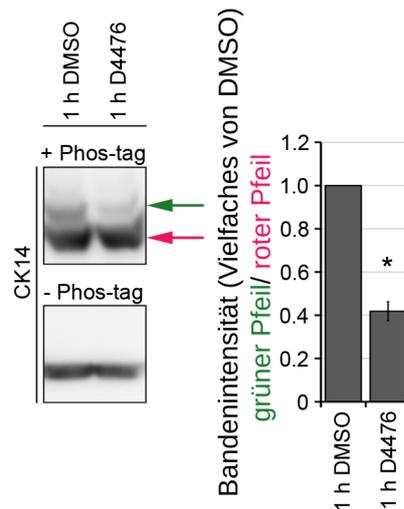


Abbildung 3.16: **Veränderte CK14-Phosphorylierung nach CK-1-Inhibition.** Die Abbildung ist modifiziert nach Schlögl et al. [\[104\]](#). Zum Nachweis des Phosphorylierungsstatus des CK14 wurde das Phos-tag<sup>TM</sup>-Molekül in 6% Western Blot-Gele eingearbeitet (+ Phos-tag). Parallel wurde ein Gel ohne dieses Molekül analog verarbeitet (- Phos-tag). Die Bandendensität beider Phosphorylierungsbanden wurde gemessen. Die stärker phosphorylierten Proteine (höhere Bande, grüner Pfeil) wurden in Relation zu den weniger phosphorylierten Proteinen gesetzt (tiefergelegene Bande, roter Pfeil). Die Werte entstammen vier unabhängigen Experimenten.

te zwei prominente CK14-Banden. Je weiter die Proteinbande im Gel läuft, desto weniger Phosphatreste weist sie im Vergleich zu höhergelegenen Banden auf. Die höhergelegene CK14-Bande verlor nach D4476-Applikation an Dichte, während gleichzeitig die Dichte der tiefergelegenen Bande zunahm. Entsprechend kann angenommen werden, dass die pharmakologische Inhibition der CK-1 in den Experimenten zu einer Dephosphorylierung des CK14 führte. Zur weiteren Charakterisierung der durch CK-1 induzierten Zytokeratinveränderungen wurde der p38MAPK Signalweg untersucht. Die durch PV Autoantikörper induzierte Keratinretraktion ist mit einem raschen Anstieg der Signalübertragung durch die p38MAPK assoziiert. Durch die Hemmung

der p38MAPK können die Reorganisation des Keratinzytoskeletts und der Zellhaftungsverlust nach Antikörperexposition verhindert werden [12]. Auf die Inkubation mit D4476 für 1 h reagierten HaCaT-CK5-Zellen mit erhöhtem phospho-p38MAPK-Spiegel (siehe Abbildung 3.17), ähnlich wie auch nach Inkubation mit pathogenen PV-Antikörpern [11]. Phospho-p38MAPK ist die phosphorylierte und damit aktivierte Form dieser Kinase. Letzten

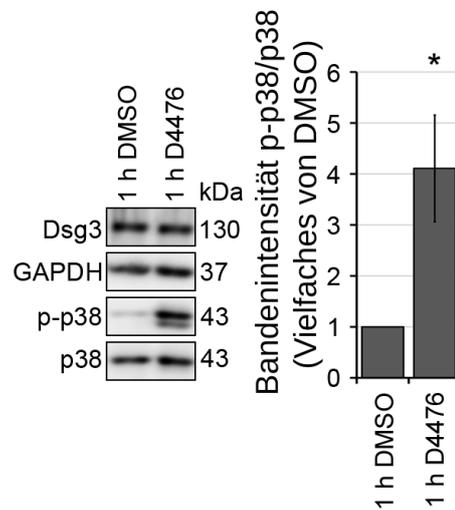


Abbildung 3.17: **p38MAPK-Phosphorylierung nach 1 h CK-1-Inhibition.** Die Abbildung ist modifiziert nach Schlögl et al. [104]. HaCaT-CK5-Zellen wurden mit D4476 bzw. DMSO für 1 h behandelt und daraus SDS-Lysate generiert. Analysiert wurde die Phosphorylierung der p38MAPK. Die densitometrischen Werte wurden zur unphosphorylierten p38MAPK als Ladekontrolle normalisiert. Der Blot ist repräsentativ für sechs unabhängige Experimente.

Endes sollte die Auswirkung der durch D4476 induzierten Keratinretraktion auf die Zellhaftung evaluiert werden (siehe Abbildung 3.18). Die Inkubation von HaCaT-CK5-Zellen mit D4476 führte in Dissoziationsversuchen zu einem Haftungsverlust (Anstieg der Zellfragmente von  $5,5 \pm 0,8$  auf  $15,4 \pm 1,0$ ), der durch die Hemmung der p38MAPK mittels SB203580 verhindert werden konnte (DMSO + 1 h D4476 mit  $15,4 \pm 1,0$  Fragmenten im Vergleich zu SB203580 + 1 h D4476 mit  $6,6 \pm 1,0$  Fragmenten).

Mit AK23, einem monoklonalen anti-Dsg3-Antikörper aus einem Pemphi-

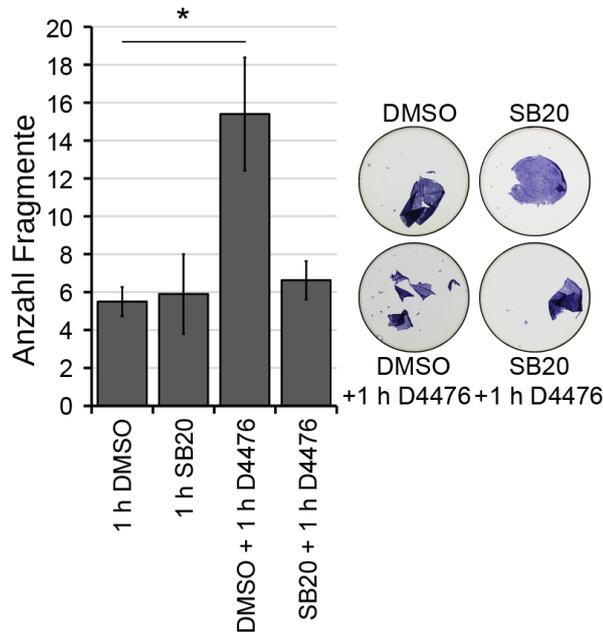


Abbildung 3.18: **Die Rolle der p38MAPK-Aktivierung für die Zellhaftung nach stattgehabter Keratinretraktion durch D4476.** Die Abbildung ist modifiziert nach Schlögl et al. [104]. Die Zelladhäsion wurde in HaCaT-CK5-Zellen mittels Dispase-basiertem Dissoziationsversuch quantifiziert. SB203580 (kurz SB20) wurde als spezifischer Inhibitor der p38MAPK genutzt. Die Prä-Inkubation mit SB20 bzw. DMSO als Kontrolle erfolgte für 1 h, ehe D4476 zugegeben wurde. Die Werte entstammen vier bis fünf unabhängigen Experimenten.

gus Mausmodell, wurde getestet, ob die Zellkohäsion nach CK-1-Inhibition weiter gestört werden konnte (siehe Abbildung 3.19). Tatsächlich führte die Inkubation mit AK23 für 3 h zu einer signifikanten Zunahme der Zellfragmentierung:  $13,5 \pm 2,9$  Fragmente bei 1 h D4476 Inkubation im Vergleich zu  $38,1 \pm 4,0$  bei 1 h D4476 gefolgt von 3 h AK23-Behandlung. Zudem war die Anzahl der Zellfragmente unter Doppelinkubation mit D4476 und AK23 im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit AK23 über 3 h signifikant erhöht ( $38,1 \pm 4,0$  vs.  $9,9 \pm 1,0$ ). Dies ist ein Hinweis, dass die durch pathogene Anti-Dsg3-Antikörper vermittelte Zellhaftungsstörung unabhängig von einer Keratinretraktion stattfinden kann. Zusammengenommen weisen diese Daten darauf hin, dass die Keratinzytoskelettveränderungen, die durch

CK-1-Inhibition mittels D4476 induziert werden, der Keratinretraktion bei Pemphigus vulgaris ähneln.

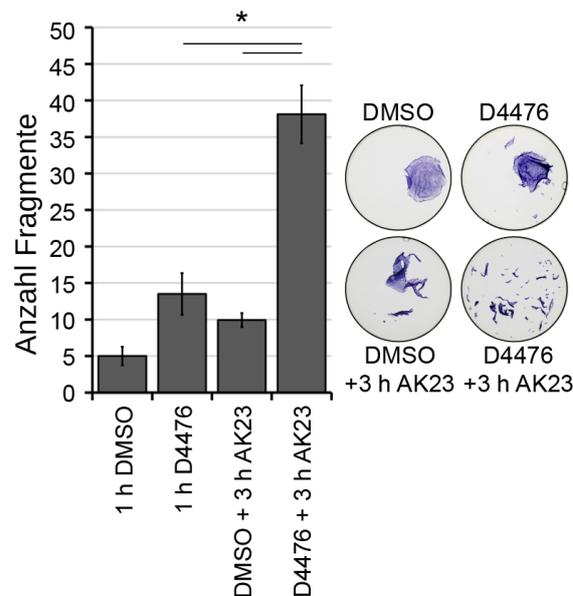


Abbildung 3.19: **Der Effekt von AK23 nach stattgehabter Keratinretraktion durch D4476.** Die Abbildung ist modifiziert nach Schlögl et al. [104]. Dispase-basierter Dissoziationsversuch in HaCaT-CK5-Keratinocyten. Die Vorbehandlung der Zellen erfolgte mit D4476 oder DMSO für eine Stunde. Dieser folgte die Inkubation mit AK23, einem pathogenen monoklonalen Dsg3-Antikörper, für drei Stunden.

### 3.3 CK-1-Inhibition führt zu Dsg3-Aggregationen

Im Weiteren sollte die mögliche Abhängigkeit zwischen Keratinretraktion und Dsg3-Verteilung herausgefunden werden. Dazu wurden HaCaT-CK5-YFP-Zellen mit mDsg3-mCherry transfiziert und in Lebendzellaufnahmen mit D4476 oder DMSO für Kontrollbedingungen inkubiert. Hierzu erfolgte zuerst eine Behandlung mit den genannten Substanzen, der dann eine Inkubation mit PV2-IgG folgte (siehe Abbildung 3.20).

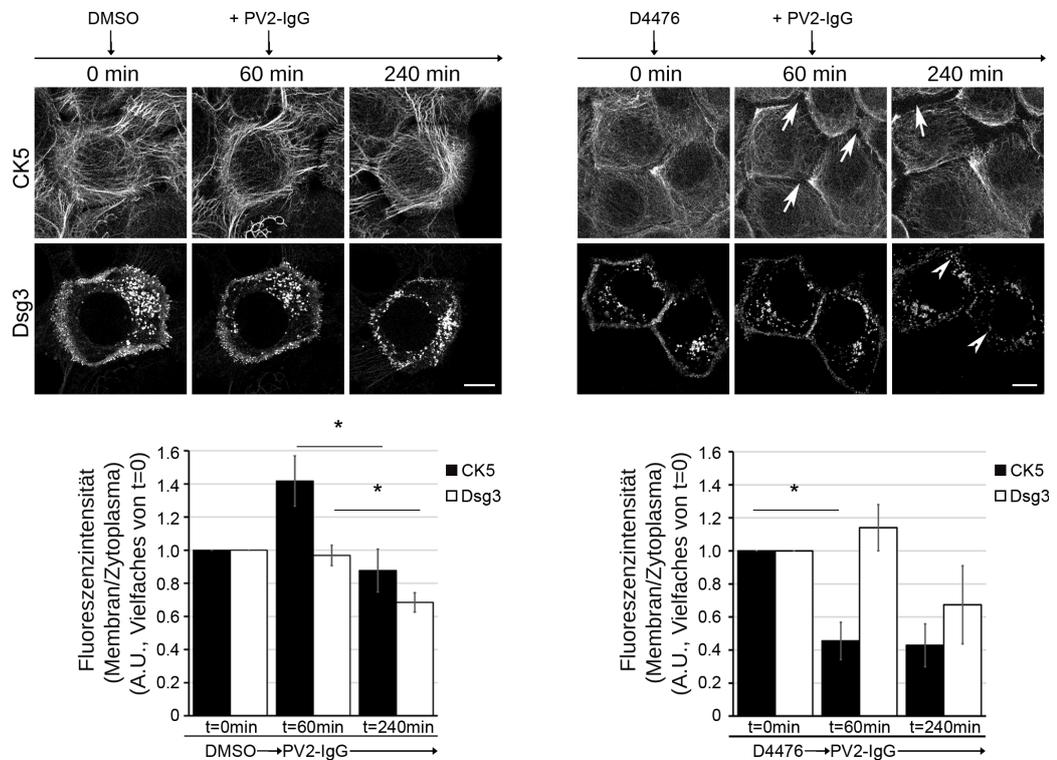


Abbildung 3.20: **Lebendzellaufnahmen unter D4476 und PV2-IgG.** Die Abbildung ist modifiziert nach Schlögl et al. [104]. HaCaT-CK5-Zellen wurden mit pDest-mDsg3-mCherry transfiziert und die weitere Behandlung der Zellen mittels dreidimensionaler Konfokalmikroskopie beobachtet. Die Zellen wurden mit DMSO oder D4476 für eine Stunde inkubiert. D4476 führte zu einer Keratinspindelretraktion (Pfeile) aber keiner Dsg3-Internalisierung. Die folgende Zugabe von PV2-IgG verursachte die Endozytose von Dsg3 (Pfeilspitzen). Der Balken stellt 10  $\mu\text{m}$  dar. Die Bilder und Ergebnisse stammen von vier Zellen aus vier unabhängigen Experimenten.

Die Hemmung der CK-1 mittels D4476 führte nach 1 h zu einer signifikanten Abnahme der CK5 Fluoreszenzintensität in der Zellperipherie, was unter Kontrollbedingungen mit DMSO-Inkubation nicht auftrat. Auswertungen der Dsg3 Fluoreszenzintensität in der Zellperipherie zeigten jedoch keine Internalisierung des Desmogleins. Nun stellte sich die Frage, ob die Internalisierung von Dsg3 bei bereits verändertem Zytoskelett möglich war. Dazu erfolgte nach einstündiger D4476 Applikation die Zugabe von PV2-IgG für weitere 3 h. Dies verursachte eine Dsg3-Internalisierung (siehe Pfeilspitzen).

Ähnliches konnte in der indirekten Immunfluoreszenzdarstellung unter statischen Bedingungen ohne Dsg3-Überexpression gesehen werden (siehe Abbildung [3.21](#)). Nach der Induktion einer Keratinretraktion mittels D4476 Applikation erschienen die membranständigen Dsg3-Signale im Vergleich zur Kontrollbedingung mit DMSO nicht verändert. Bei zusätzlicher Inkubation mit PV1-IgG waren Zeichen der Dsg3-Internalisierung im Sinne von intrazellulären Dsg3-Aggregationen sowie Aggregationen im Membranbereich zu erkennen. Die Zeichen der Dsg3-Internalisierung zeigten sich gleichfalls bei Vorinkubation mit DMSO und anschließender PV1-IgG Zugabe. Für Kontrollbedingungen erfolgte die Inkubation mit C-IgG. Der Biotinylierungsan-

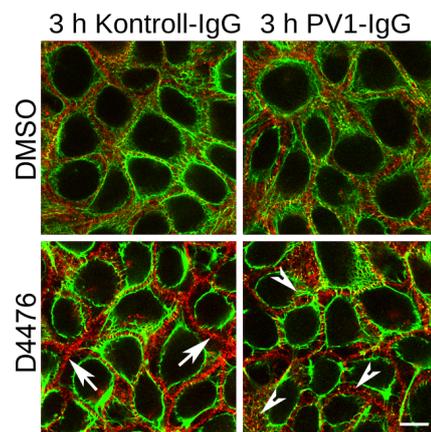


Abbildung 3.21: **D4476 und PV1-IgG in der Immunfluoreszenzdarstellung.** Die Abbildung ist modifiziert nach Schlögl et al. [\[104\]](#). Immunfluoreszenzdarstellung von HaCaT-CK5-Zellen mit Dsg3-Färbung. Keratinveränderungen traten unter D4476 Behandlung auf (Pfeile). Anzeichen einer Dsg3-Internalisierung im Sinne einer Fragmentierung und zyttoplasmatisch gelegener Dsg3-Signale traten nur nach PV1-IgG-Inkubation auf (Pfeilspitzen). Der Balken stellt 10  $\mu\text{m}$  dar. Die Bilder und Ergebnisse stammen aus drei bis vier unabhängigen Experimenten.

satz ermöglichte die biochemische Herangehensweise an die Frage der membranständigen Dsg3-Mengen nach Induktion einer Keratinretraktion mittels D4476 (siehe Abbildung [3.22](#)). Die Zugabe von D4476 für 4 h führte zu keiner Reduktion der membranständigen Dsg3-Moleküle im Vergleich zur Kontrollinkubation mit DMSO. Sowohl unter Vorinkubation mit DMSO als

auch D4476 führte eine dreistündige PV2-IgG Zugabe zu einer signifikanten Reduktion der membranständigen Dsg3-Mengen (um 18 % bei DMSO Vorinkubation bezogen auf 4 h DMSO, sowie 35 % bei D4476 Vorbehandlung bezogen auf 4 h D4476). Die Evaluierung der oberflächlichen Dsg3-

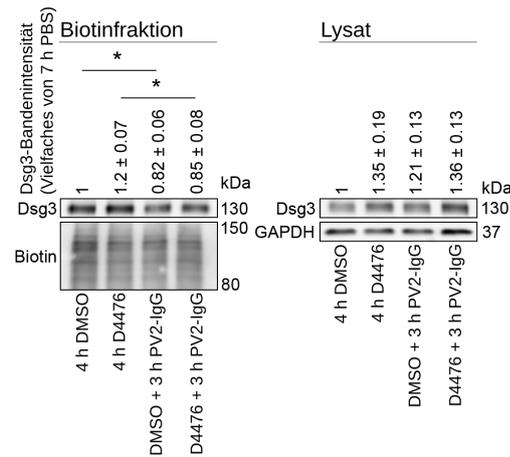


Abbildung 3.22: **Keine Dsg3-Internalisierung nach alleiniger CK-1-Inhibition.** Die Abbildung ist modifiziert nach Schlögl et al. [104]. Streptavidin Pulldown von biotinyliertem Dsg3. HaCaT-CK5-Zellen wurden mit DMSO oder D4476 und sequentiell PV2-IgG behandelt. Die Dsg3-Mengen wurden densitometrisch erfasst. Die Werte entstammen drei bis fünf unabhängigen Experimenten.

Verteilung unabhängig von den Dsg3-Mengen zeigte, dass die Inkubation mit D4476 für 1 h zur Ausbildung punktförmiger Dsg3-Aggregationen innerhalb der Membran führte (siehe Abbildung 3.23). Dazu wurde wieder der Aggregationsindex ermittelt, der im Laufe der D4476 Inkubation zunahm. Damit induzierte die durch D4476-induzierte Keratinretraktion keine Dsg3-Internalisierung, durchaus jedoch eine Umverteilung im Sinne von Aggregationen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass lokale Dsg3-Umverteilung und Dsg3-Internalisierung zwei eigenständige Ereignisse sind und die Dsg3-Verteilung von einer korrekten Ausbreitung des Keratinzytoskeletts abhängt. Gleichzeitig scheint die Dsg3-Internalisierung unabhängig von Keratinveränderungen zu sein und nicht als Reaktion auf diese stattzufinden. Andere Mechanismen nach Antikörperbindung stehen hier anscheinend im Vorder-

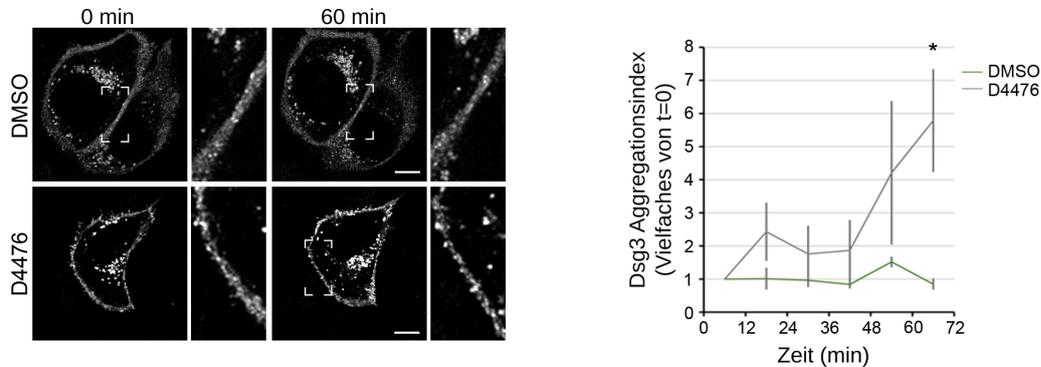


Abbildung 3.23: **Vermehrte Dsg3-Aggregationen nach CK-1-Inhibition.** Die Abbildung ist modifiziert nach Schlögl et al. [104]. Dsg3-Aggregationen innerhalb der Membran wurden nach 1 h D4476 Inkubation mittels Lebendzellaufnahmen ermittelt. Die Aggregationen wurden innerhalb eines 10 µm langen linearen Bereich der Membran erfasst. Die Werte entstammen vier unabhängigen Experimenten. Der Balken stellt 10 µm dar.

grund.

### 3.4 Keratinretraktion durch PV-IgG trotz gehemmter Dsg3-Internalisierung

Nun stellte sich die umgekehrte Frage, ob die Keratinretraktion nach PV-IgG-Inkubation unabhängig von Dsg3-Veränderungen stattfinden kann. Wie in Kapitel 1.3.3 erläutert, ist der Auf- und Abbau von Desmosomen von der Integrität lipidreicher Membrandomänen abhängig [119, 99]. Lipidreiche Membrandomänen (zu englisch „lipid rafts“) sind Untereinheiten der Zellmembran, die die Organisation und Funktion der Membran ermöglichen. Sie bestehen überwiegend aus Cholesterol, Sphingolipid und Proteinen [75].  $\beta$ -MCD kann Cholesterol depletieren und damit die Integrität lipidreicher Membrandomänen beeinträchtigen. Auf diese Weise kann die Endozytose von Dsg3 als Reaktion auf PV-Antikörper verhindert werden [119]. Dieser Mechanismus wurde genutzt, um die Abhängigkeit der durch PV-IgG ausgelösten Keratinveränderungen von einer Dsg3-Internalisierung zu untersuchen.

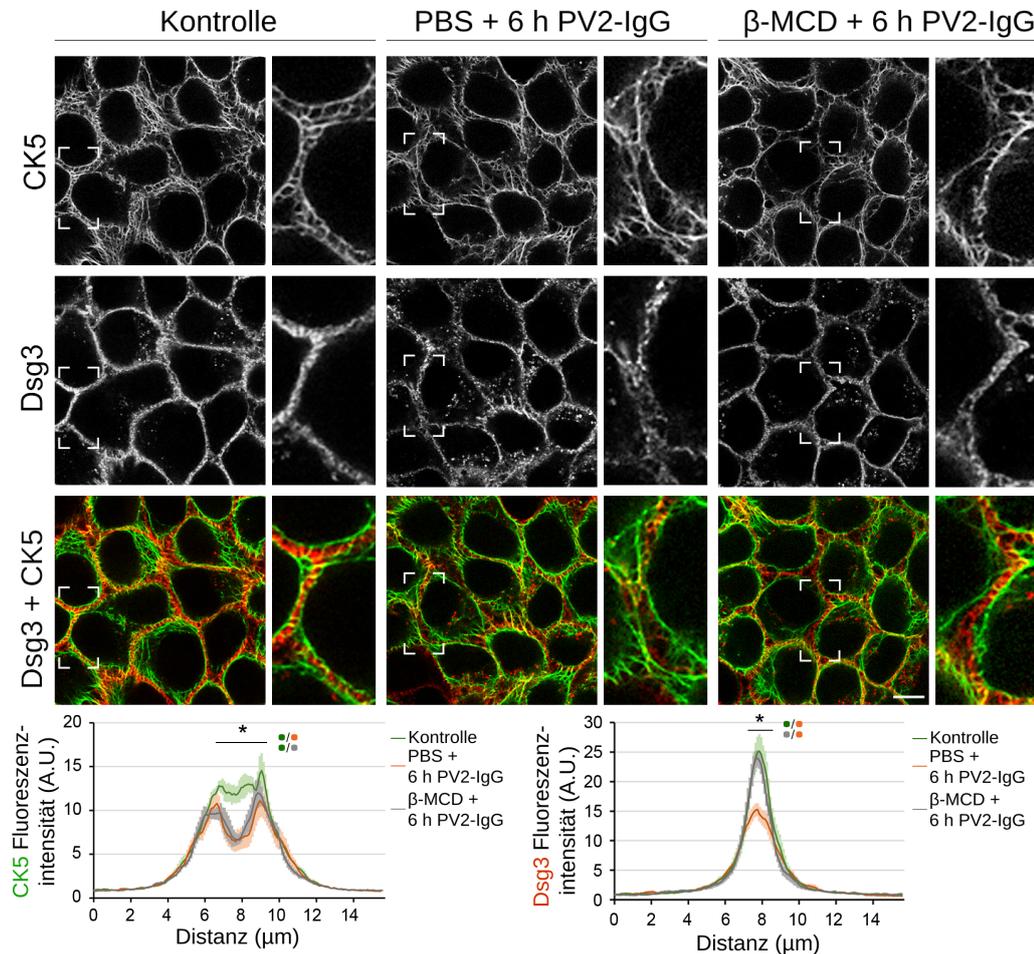


Abbildung 3.24: **Analyse der CK5- und Dsg3-Veränderungen unter  $\beta$ -MCD und PV2-IgG.** Die Abbildung ist modifiziert nach Schlögl et al. [104]. Immunfluoreszenzdarstellung von HaCaT-CK5-Zellen, welche mit PBS oder  $\beta$ -MCD vorinkubiert und dann 6 h lang mit PV2-IgG behandelt wurden. Die Bilder sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente. Für die Analyse wurde ein 15  $\mu\text{m}$ -langer Balken perpendicular zur Zellmembran zweier benachbarter Zellen platziert und die Fluoreszenzintensitäten entlang des Balkens für Dsg3 und CK5 erfasst. 100 Zellen aus vier Experimenten wurden ausgewertet. Der Balken stellt 10  $\mu\text{m}$  dar.

Für Immunfluoreszenzdarstellungen wurden HaCaT-CK5-YFP-Zellen mit PBS oder  $\beta$ -MCD für 1 h vorinkubiert, ehe PV2-IgG für 6 h zugegeben wurde (siehe Abbildung 3.24). Die Vorinkubation mit  $\beta$ -MCD verhinderte die Dsg3-Internalisierung größtenteils, eine Zytokeratinretraktion war jedoch

weiterhin präsent.

Biotinylierungsversuche unterstrichen die morphologisch erhobenen Ergebnisse zur Dsg3-Internalisierung (siehe Abbildung 3.25).

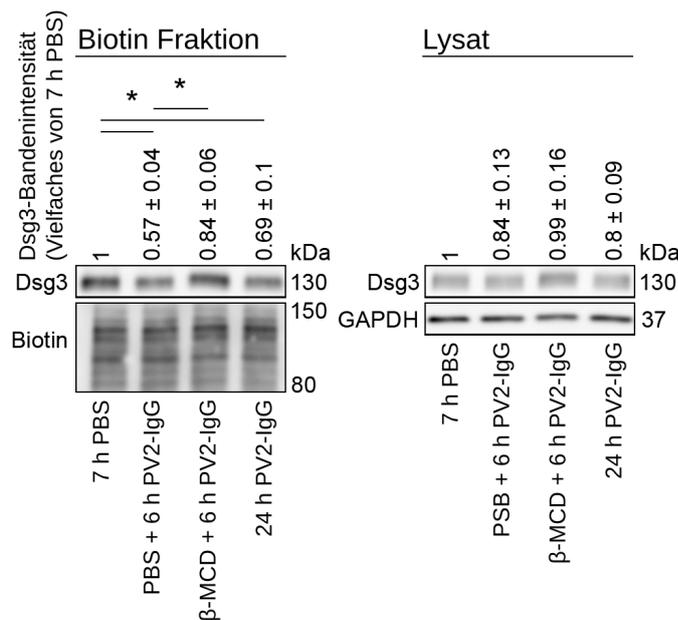


Abbildung 3.25: **Reduzierte Dsg3-Internalisierung nach Cholesterol-depletion.** Die Abbildung ist modifiziert nach Schlögl et al. [104]. Streptavidin Pulldown von biotinyliertem Dsg3. HaCaT-CK5-Zellen wurden wie angegeben inkubiert. Die Dsg3-Mengen wurden densitometrisch erfasst. Die Werte entstammen drei bis fünf unabhängigen Experimenten.

Die sechsstündige PV2-IgG-Inkubation führte zu einer signifikanten Reduktion des membranständigen Dsg3-Pools und belief sich auf  $0,57 \pm 0,04$  im Vergleich zur Kontrollbedingung (7 h PBS). Dieser Wert war signifikant weniger, als die Dsg3-Menge nach  $\beta$ -MCD Vorinkubation und anschließender PV2-IgG Zugabe:  $0,84 \pm 0,06$  in Relation zur Kontrollbedingung. Dass das Keratinzytoskelett trotz gestörter Dsg3-Internalisierung Veränderungen aufwies, deutet auf die Unabhängigkeit der Keratinretraktion von Dsg3-Veränderungen hin.

Passend zu dieser Annahme und einer p38MAPK-abhängigen Regulierung des Keratinzytoskeletts war die p38MAPK trotz eingeschränkter Dsg3-Internalisierung durch die Störung der Integrität lipidreicher Membrando-

mönnen aktiviert (siehe Abbildung [3.26](#)). Der durch densitometrische Dichtemessung erhobene Wert für die p38MAPK Aktivierung nach einstündiger PV2-IgG-Inkubation belief sich auf  $1,47 \pm 0,14$ , bei  $\beta$ -MCD Vorinkubation lag der Wert bei  $1,93 \pm 0,17$ . Beide Werte waren damit signifikant im Vergleich zur Kontrollinkubation mit PBS für 1 h erhöht.

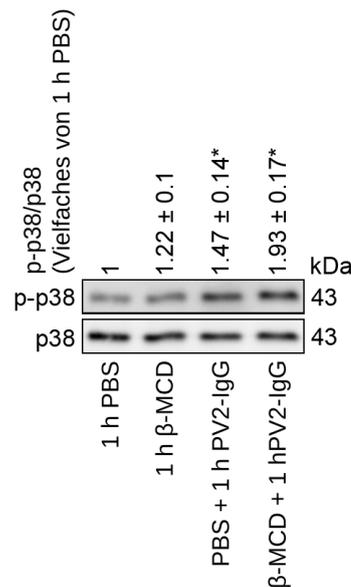


Abbildung 3.26: **p38-Aktivierung unter  $\beta$ -MCD und PV2-IgG**. Die Abbildung ist modifiziert nach Schlögl et al. [\[104\]](#). Der Phosphorylierungszustand der p38MAPK wurde densitometrisch erfasst.

In Dissoziationsversuchen erzielte die Störung der Integrität lipidreicher Membrandomänen und die damit einhergehende Einschränkung der Dsg3-Internalisierung eine Verbesserung der Zellhaftung (siehe Abbildung [3.27](#)).

Zusammengenommen weisen die Ergebnisse dieser Studie darauf hin, dass die Keratinretraktion sowie Dsg3-Internalisierung in Folge einer Exposition gegenüber PV-IgG zwei voneinander unabhängige Ereignisse darstellen. Beide Veränderungen tragen separat zum Verlust der Zellkohäsion bei, was darauf schließen lässt, dass unterschiedliche Pathomechanismen dahinterstehen.

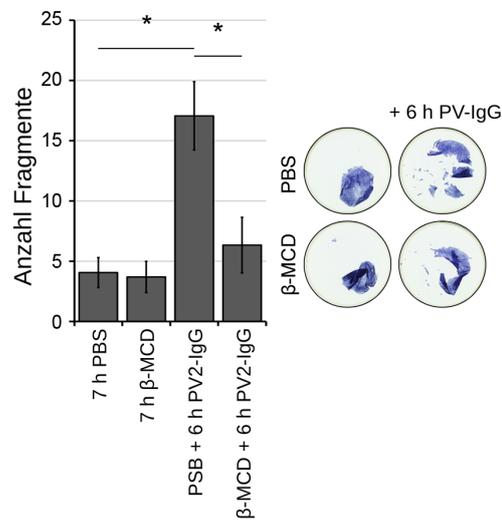


Abbildung 3.27: **Cholesteroldepletion verbessert die Zellhaftung unter PV2-IgG-Inkubation.** Die Abbildung ist modifiziert nach Schlögl et al. [104]. HaCaT-CK5-Zellen wurden bis zur Konfluenz gehalten und mit PBS oder  $\beta$ -MCD vorbehandelt, ehe PV2-IgG zugegeben wurde. Nach Applikation definierter Scherkräfte wurden die Fragmente als indirektes Maß der Zellhaftung ausgezählt.



# 4 Diskussion

## 4.1 Keratinveränderungen finden vor der Internalisierung von desmosomalen Adhäsionsmolekülen statt

### 4.1.1 Pemphigus vulgaris-Autoantikörper modifizieren frühzeitig das Keratinzytoskelett

Die Rolle der zellulären Veränderungen nach PV-Antikörperexposition ist Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten. Die Frage, die sich pathogenetisch stellt, ist, ob die Zytoskelettveränderungen sekundär als Reaktion auf die Antikörperexposition auftreten oder diese Auslöser der gestörten Desmosomendynamik sind. Studien mit Fokus auf Ultrastrukturanalyse identifizierten Keratinintermediärfilamente als primär betroffene Komponenten [120, 134]. In dieser Studie wurden die kennzeichnenden zellulären Veränderungen zeitlich aufgeschlüsselt und in Relation zum Haftungsverlust gesetzt. Es zeigt sich, dass Keratinveränderungen in der Zellperipherie schon 60 min nach PV-IgG Zugabe detektierbar sind. Die Internalisierung von Dsg3 hingegen beginnt nach circa 90 min. Ein interessanter Aspekt, den die Lebendzellaufnahmen des Zytoskeletts zeigen, ist, dass die initialen Veränderungen basal und in der Zellperipherie stattfinden. Dem Auf- und Abbau des Keratinzytoskeletts entsprechend liefert dieser Bereich der Zelle lösliche Keratinoligomere, welche sich zu Keratinvorläufermolekülen zusammenlagern und so im Weiteren ein filamentäres Netzwerk bilden [72]. Die langen, stabilen Keratinfilamente, die

rechtwinkelig in die Zellmembran einstrahlen und wahrscheinlich Desmosomen verankern, bleiben unmittelbar nach Antikörperexposition unverändert. Es wäre also denkbar, dass die Bindung von PV-Antikörpern an der Zelle zu einer Störung der Keratinassemblierung und damit langfristig des gesamten Keratinumsatzes führt. Diese These wird dadurch unterstützt, dass die Proteinmengen an CK14 im Laufe der Inkubationszeit mit PV-IgG signifikant sinken. Diese Interpretation lässt zudem den Schluss zu, dass das beobachtete Bundling der Keratinfilamente ein Kompensationsmechanismus für die gestörte Zellhaftung sein könnte [45].

#### 4.1.2 Rolle der Keratinveränderungen am initialen Haftungsverlust

Der Haftungsverlust als Reaktion auf die Inkubation mit PV-Antikörpern war zumindest unter Applikation von mechanischem Stress bereits nach kurzen Zeitintervallen (ab 30 min) detektierbar. Tatsächlich korreliert damit der Haftungsverlust zeitlich besser mit den Veränderungen des Keratinzytoskeletts als mit der Dsg3-Internalisierung, was darauf hindeutet, dass die zytoskeletalen Veränderungen einen wichtigen Beitrag zum PV-induzierten Haftungsverlust leisten. Insbesondere am initialen Haftungsverlust könnten diese Veränderungen neben der sterischen Behinderung der Dsg3-Interaktionen durch PV-IgG einen wesentlichen Anteil haben. Darauf weisen auch andere Studien hin, die gezeigt haben, dass die Bindungskräfte zwischen Dsg3-Molekülen bei fehlendem Keratinzytoskelett geringer sind [123].

Unklar ist jedoch, ob diese Keratinmoleküle, die in der Zellperipherie früh retrahiert oder möglicherweise sogar depletiert werden, mit Desmosomen verbunden sind. Stattdessen könnte die Wirkung auf die Zellhaftung indirekt sein, indem die Assemblierung der Desosomen eingeschränkt ist. Die Verankerung der Desosomen am Zytoskelett erfolgt über die desmosomalen Plaqueproteine Desmoplakin sowie verschiedene Plakophilin-Isoformen. Diese werden in der juxtamembranären Region an Keratinfilamente angefügt und so in die entstehenden Desmosomen eingebaut [39, 3]. Wenn also die Assemblierung des Keratinzytoskeletts durch Antikörper eingeschränkt ist, wäre eine

mögliche Konsequenz, dass der Einbau von desmosomalen Plaqueproteinen, die an Zytokeratine gekoppelt werden, in Desmosomen gestört wird. Ein alternativer pathophysiologischer Erklärungsansatz ist die Ausbildung von interdesmosomalen Erweiterungen, die auf Keratinfilamentveränderungen zurückzuführen sein könnten. Es ist beschrieben, dass die Membranen benachbarter Keratinozyten zu frühen Zeitpunkten nach Autoantikörperinkubation im Bereich zwischen benachbarten Desmosomen aufspalten [44, 26]. Die Steifigkeit der Zellen wird elementar von Keratinfilamenten definiert [98, 108]. Nimmt die Steifigkeit der Zellen also durch den Verlust der Keratinmoleküle in der Zellperipherie ab, könnte dies zur interdesmosomalen Aufspaltung führen bzw. eine solche begünstigen. Das submembranöse Keratinnetzwerk, welches interdesmosomale Membranabschnitte stabilisieren könnte, könnte durch seine Schwächung ebenfalls zur interdesmosomalen Aufspaltung beitragen [97]. Dazu passt auch, dass durch Hemmung der p38MAPK sowohl die Keratinretraktion verhindert, als auch die interdesmosomale Aufspaltung reduziert wird [29]. Die interdesmosomalen Membranabschnitte scheinen also einen wichtigen Beitrag zur Zellhaftung zu leisten.

### **4.1.3 Beeinflussung der Überexpression von CK5 sowie Dsg3 für die Reaktion auf Pemphigus-Antikörper**

Es wurde mit einem Zellkulturmodell gearbeitet, in welchem CK5 überexprimiert wird. Obwohl die Zelllinie nach PV-Antikörperexposition die für Pemphigus vulgaris typischen Veränderungen zeigte, muss in Betracht gezogen werden, dass der Zeitverlauf unter Bedingungen ohne Überexpression anders sein könnte.

Ähnliche Überlegungen müssen für die Dsg3-Überexpression für die Lebendzellaufnahmen angestellt werden. In den Experimenten wurde die Endozytose von Dsg3 erst nach 90 min und damit nach Beginn der Keratinveränderungen erfasst. Dem gegenüber stehen Daten aus primären Keratinozyten, in denen die Internalisierung von Dsg3 bereits nach 60 min detektierbar war [16]. Dies kann von mehreren Faktoren abhängig sein. Einerseits spielt die Pa-

thogenität der applizierten Antikörperfraktion eine Rolle, andererseits die Eigenschaften der immortalisierten Zelllinie. Keratinozyten unterliegen einem calciumabhängigen Reifungsprozess, der das Ausmaß an Dsg3-Depletion beeinflusst und sich zwischen primären Keratinozyten und HaCaT-Zellen unterscheiden kann [115]. Die Lebendzellaufnahmen mit Dsg3-transfizierten Zellen und untransfizierten fixierten Zellen verhielten sich jedoch relativ ähnlich in Bezug auf die Zytoskelettveränderungen nach einer PV-IgG Inkubation.

Ein anderer Aspekt, der nicht ausgeschlossen werden kann, ist der Einfluss der Überexpression am zellulären Umsatz der entsprechenden Proteine. So wurde gezeigt, dass die Desmoglein-3-Überexpression die Internalisierung und den Abbau als Reaktion auf die Inkubation mit Pemphigus Antikörpern verlangsamt. Ebenso war der Haftungsverlust des einschichtigen Zellrasens nach einer PV-IgG-Inkubation geringer [54]. Es ist demnach nicht ausgeschlossen, dass die Internalisierung von Dsg3 in untransfizierten Zellen schneller vonstattengeht. Zudem wäre ein Einfluss der CK5-Überexpression auf die Dynamik der Dsg3-Veränderungen möglich. Auch hier zeigte sich ein ähnlicher zeitlicher Verlauf zwischen den Lebendzellaufnahmen in Dsg3-transfizierten HaCaT mit und ohne Überexpression von CK5. Das deutet darauf hin, dass die Keratinüberexpression die Dsg3-Internalisierung als Antwort auf die PV-IgG-Exposition nicht signifikant beeinflusst oder verändert. Über den Einfluss der Keratinüberexpression auf das zeitliche Auftreten der Keratinveränderungen kann anhand der durchgeführten Experimente keine Aussage getroffen werden. Doch unter den hier erhobenen Bedingungen der gleichzeitigen Überexpression von CK5 und Dsg3 gehen die Keratinveränderungen der Dsg3-Internalisierung voraus.

## 4.2 Unabhängige Regulationsmechanismen der strukturellen Veränderungen von Keratinen und Dsg3

### 4.2.1 Keratinretraktion führt nicht zur Dsg3- Internalisierung

Aufgrund der zeitlichen Beziehung zwischen Zytokeratinveränderungen und Dsg3-Internalisierung könnte man einen kausalen Zusammenhang der beiden Veränderungen annehmen und die Dsg3-Internalisierung als Folge der veränderten Keratinfilamentverteilung sehen. Die Ergebnisse aus den Experimenten mit dem CK-1-Inhibitor D4476 unterstützen diese Hypothese nicht. Die CK-1-Inhibierung führte stets zur phänotypischen Verteilung der Keratinfilamente entsprechend der Inkubation mit PV-IgG. Eine Dsg3-Internalisierung oder -Depletion wurde dadurch jedoch nicht hervorgerufen. Trotz der phänotypischen Ähnlichkeit ist jedoch nicht klar, ob die CK-1 eine Rolle bei den Zytoskelettveränderungen bzw. in der Pathogenese von Pemphigus vulgaris spielen könnte. Für weiterführende Studien könnte das Enzym jedoch von Interesse sein, um die Mechanismen, die bei PV zur Keratinretraktion führen, besser zu verstehen. Die zusätzliche Inkubation mit PV-IgG nach vorangegangener Induktion einer Keratinretraktion durch CK-1-Inhibierung führte zu einer Dsg3-Internalisierung. Diese Ergebnisse sprechen für die Unabhängigkeit der Dsg3-Membranlokalisation von der Keratinverteilung. Diese Ergebnisse passen zu Daten aus Keratin-Knock-Out-Mäusen. Die Zellen weisen membranständiges Dsg3 auf, wobei die Dsg3-Proteinmenge höher ist als bei entsprechenden Wildtyp-Zellen. Die Desmosomen sind allerdings kleiner und andere desmosomale Moleküle wie Dsg2 kommen in verringerter Proteinmenge vor [69, 7, 124]. Dass die Keratinzytoskelettveränderungen nicht gleichermaßen Einfluss auf alle desmosomalen Cadherine nehmen, könnte sich dadurch erklären, dass die unterschiedlichen desmosomalen Moleküle auf unterschiedliche Weise an der Zellhaftung beteiligt sind [43, 57].

### 4.2.2 Dsg3-Aggregationen als Resultat entkoppelter Zytokeratine

Die Retraktion des Zytoskeletts durch die Inhibierung der Casein-Kinase-1 führte zwar nicht zu einer Internalisierung von Desmoglein 3, doch eine vermehrte Aggregationsbildung konnte unter dieser Bedingung gezeigt werden. Daten aus Keratinozyten, die keine Keratinintermediärfilamente exprimieren, weisen auf eine erhöhte Mobilität des membranständigen Dsg3 hin [124]. Diese erhöhte Aggregationsbildung bzw. Mobilität der Dsg3-Moleküle könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Dsg3-Moleküle ihre Integration in Desmosomen und Kopplung an Keratinfilamente verlieren. Unter physiologischen Bedingungen könnten diese Anhäufungen durch Keratine bzw. deren Insertion unterdrückt werden.

Dsg3-Aggregationen wurden in der Literatur mehrmals als zelluläre Reaktion auf PV-IgG-Inkubation beschrieben [54, 102, 6]. In den Studien wurden jeweils die Bewegungen von Dsg3-Molekülen nach PV-IgG-Zugabe mittels Lebendzellaufnahmen oder Pulsmarkierung verfolgt. Die durch PV-IgG induzierte Dsg3-Endozytose setzte sich aus der Aggregation der Dsg3-Moleküle und einer folgenden Internalisierung dieser Aggregationen zusammen. Nachdem die Rolle der CK-1 in der Pathogenese von PV nicht bekannt ist, ist auch nicht klar, ob die Aggregationen auf unterschiedliche Mechanismen zurückzuführen ist. Die Aggregationsbildung könnte eine generelle Folge der Entkopplung des Zytokeratinskeletts sein.

Dem zeitlichen Zusammenhang von Keratinveränderungen und Dsg3-Aggregation entsprechend könnte diese Entwicklung keratinabhängig verlaufen, während die Internalisierung unabhängig davon vonstattengeht. Für letztere ist die Membranorganisation in lipidreiche Domänen möglicherweise essentiell [119].

### 4.2.3 Keratinretraktion durch PV-Autoantikörper ist kein Resultat der Dsg3-Internalisierung

Basierend auf der These, dass die Dsg3-Internalisierung unabhängig von einer Keratinretraktion stattfindet, sollte auch das Keratinzytoskelett unabhängig von der Internalisierung des membranständigen Moleküls retrahieren. Durch Störung der lipidreichen Membrandomänen mittels des cholesterindepletierenden Agens  $\beta$ -MCD wurde die Dsg3-Endozytose weitestgehend verhindert. Die Keratinveränderungen konnten dennoch detektiert werden, was auf das voneinander unabhängige Auftreten der Dsg3- sowie Keratinumverteilungen hindeutet.

## 4.3 Zeitliche Einordnung der strukturellen Veränderungen in Bezug zum Haftungsverlust bei Pemphigus vulgaris

Die Ergebnisse dieser Studie beziehen sich vor allem auf die frühen Zeitpunkte nach PV-IgG-Inkubation. Zusammen mit Daten aus Arbeiten anderer Forschungsgruppen fügen sich die Daten zu einem Erklärungsansatz für die zunehmende Zelldissoziation zusammen.

Der initiale Beitrag am Haftungsverlust könnte die sterische Inhibierung der Transinteraktionen der extrazellulären Dsg3-Domänen durch Dsg3-Antikörper sein [125, 49]. Zudem stellt die Antikörperbindung möglicherweise den Auslöser für die p38MAPK Aktivierung dar [116]. Dies sorgt zusammen mit einem vernetzenden Effekt der polyvalenten anti-Dsg3-Antikörper für eine frühe Aggregation der Dsg3-Moleküle in der Zellmembran [54, 101]. Ebenso scheinen frühe Keratinveränderungen, die in dieser Studie durch CK-1-Inhibierung induziert wurden, durch p38MAPK vermittelt zu werden. Es wäre also denkbar, dass diese Veränderungen zur Aggregationsbildung beitragen oder ursächlich dafür sind. Der Aggregationsbildung folgt die Internalisierung von Dsg3, welche von lipidreichen Membrandomänen abhängig ist [119]. Die Internalisierung von Dsg3 und anderen desmosomalen Molekü-

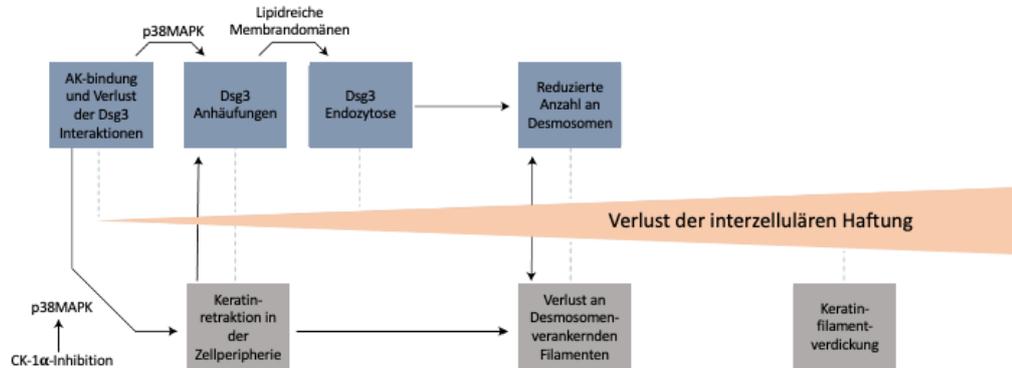


Abbildung 4.1: **Zusammenfassung.** Die Abbildung ist modifiziert nach Schlögl et al. [104]. Die Darstellung fasst die morphologischen Veränderungen zusammen, welche in Reaktion auf PV-Antikörper zum Haftungsverlust führen.

len führt zur Destabilisierung der Desmosomen. Diese Destabilisierung geht sowohl mit Veränderungen beim Auf- als auch Abbau von Desmosomen einher, was eine reduzierte Größe und Anzahl an Desmosomen zur Folge hat [118, 60]. Die Keratinretraktion und damit Entkopplung von Desmosomen sowie desmosomale Destabilisierung beeinflussen sich gegenseitig [7, 124]. Eine Behandlung über längere Zeiträume hinweg führte zur Ausbildung von verdickten Keratinbündeln, welche möglicherweise als zelluläre Stressreaktion gewertet werden können. Ein dahinterstehender Mechanismus könnte sein, dass die verbleibenden, in ihrer Anzahl und Größe verringerten, Desmosomen verstärkt verankert werden, um die Zell-Zell-Haftung zu verbessern.

Insgesamt wirken sich aber zahlreiche Faktoren auf die morphologischen Veränderungen aus, so zum Beispiel verschiedene Veränderungen intrazellulärer Signalwege, das Auftreten von nicht-desmosomalen Autoantikörpern sowie genetische Faktoren [114]. Im Sinne eines multifaktoriellen Geschehens müssen möglicherweise mehrere dieser Faktoren zusammentreffen, um zur Krankheitsentstehung mit Blasenbildung zu führen.

## 4.4 Ausblick

Pemphigus vulgaris ist eine seltene, ohne Behandlung potentiell zum Tode führende Autoimmunerkrankung. Einerseits stellt die Erforschung PV-relevanter Pathophysiologie die Möglichkeit dar, langfristig eine zielgerichtete Therapie zu entwickeln. Pemphigus wird nach wie vor immunsuppressiv therapiert, was eine nebenwirkungsreiche Behandlung darstellt. Andererseits zeigt die Vielfalt an Erkrankungen, in denen Veränderungen an Haftkontakten festgestellt wurden, wie wichtig das Verständnis über den Auf- und Abbau dieser Strukturen unter physiologischen Bedingungen ist. Daraus könnten sich unter Umständen Rückschlüsse zur Pathogenese und Pathophysiologie von z.B. Metastasierung, verschiedenen Tumorerkrankungen oder Kardiomyopathien ergeben.

In dieser Studie konnte ein präziser Zeitablauf struktureller Veränderungen als Antwort auf PV-IgG gezeigt werden. Die Pemphigus vulgaris typischen Veränderungen Dsg3-Endozytose und Keratinretraktion wurden in Relation zueinander gestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass beide Mechanismen einen Beitrag am Haftungsverlust leisten, aber dennoch weitestgehend unabhängig voneinander auftreten. Dass die Keratinveränderungen vor der Dsg3-Endozytose auftreten und zeitlich besser mit dem Haftungsverlust korrelieren, spricht für eine entscheidende Rolle der Keratinretraktion in der Pathophysiologie von Pemphigus. Was in dieser Studie wenig beleuchtet wurde, ist die Korrelation zwischen strukturellen Veränderungen und der Aktivierung verschiedenster Signalwege. Eine gemeinsame Verbindung in der Pathophysiologie von Pemphigus zwischen den unterschiedlichen Veränderungen zu finden, könnte ein elementarer Schritt sein, um zielgerichtete Therapieansätze zu entwickeln. Eine weitere offene Frage ist, ob die CK-1 im Rahmen der bei Pemphigus auftretenden Keratinretraktion eine Rolle spielt und damit einen noch unentdeckten Mechanismus in der Pathogenese darstellt.

Pemphigus vulgaris wird in der Literatur oft als Krankheit des gestörten Desmosomenumsatzes bezeichnet. Basierend auf den Beobachtungen stellt sich die Frage, ob dies analog für das Keratinzytoskelett gilt. Wie gezeigt werden konnte, werden all jene Moleküle zuerst retrahiert bzw. wahrschein-

lich depletiert, die in der Zellperipherie für den Aufbau neuer Keratinfilamente zur Verfügung stehen. Auch die Antwort auf diese Frage könnte einen wichtigen Einblick in die Pathogenese liefern.

# Literaturverzeichnis

- [1] A. M. Abreu-Velez, M. S. Howard, Z. Jiao, W. Gao, H. Yi, H. E. Grossniklaus, M. Duque-Ramírez, and S. C. Dudley. Cardiac autoantibodies from patients affected by a new variant of endemic pemphigus foliaceus in Colombia, South America. *J Clin Immunol*, 31(6):985–997, Dec 2011.
- [2] A. R. Ahmed and S. Shetty. A comprehensive analysis of treatment outcomes in patients with pemphigus vulgaris treated with rituximab. *Autoimmun Rev*, 14(4):323–331, Apr 2015.
- [3] L. V. Albrecht, L. Zhang, J. Shabanowitz, E. Purevjav, J. A. Towbin, D. F. Hunt, and K. J. Green. GSK3- and PRMT-1-dependent modifications of desmoplakin control desmoplakin-cytoskeleton dynamics. *J Cell Biol*, 208(5):597–612, Mar 2015.
- [4] M. Amagai, N. Matsuyoshi, Z. H. Wang, C. Andl, and J. R. Stanley. Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1. *Nat Med*, 6(11):1275–1277, Nov 2000.
- [5] G. J. Anhalt, R. S. Labib, J. J. Voorhees, T. F. Beals, and L. A. Diaz. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. *N Engl J Med*, 306(20):1189–1196, May 1982.
- [6] Y. Aoyama, M. Nagai, and Y. Kitajima. Binding of pemphigus vulgaris IgG to antigens in desmosome core domains excludes immune

- complexes rather than directly splitting desmosomes. *Br J Dermatol*, 162(5):1049–1055, May 2010.
- [7] J. Bar, V. Kumar, W. Roth, N. Schwarz, M. Richter, R. E. Leube, and T. M. Magin. Skin fragility and impaired desmosomal adhesion in mice lacking all keratins. *J Invest Dermatol*, 134(4):1012–1022, Apr 2014.
- [8] A. E. Bass-Zubek, L. M. Godsel, M. Delmar, and K. J. Green. Plakophilins: multifunctional scaffolds for adhesion and signaling. *Curr Opin Cell Biol*, 21(5):708–716, Oct 2009.
- [9] A. E. Bass-Zubek, R. P. Hobbs, E. V. Amargo, N. J. Garcia, S. N. Hsieh, X. Chen, J. K. Wahl, M. F. Denning, and K. J. Green. Plakophilin 2: a critical scaffold for PKC alpha that regulates intercellular junction assembly. *J Cell Biol*, 181(4):605–613, May 2008.
- [10] M. Bektas, P. S. Jolly, P. Berkowitz, M. Amagai, and D. S. Rubenstein. A pathophysiologic role for epidermal growth factor receptor in pemphigus acantholysis. *J Biol Chem*, 288(13):9447–9456, Mar 2013.
- [11] P. Berkowitz, L. A. Diaz, R. P. Hall, and D. S. Rubenstein. Induction of p38MAPK and HSP27 phosphorylation in pemphigus patient skin. *J Invest Dermatol*, 128(3):738–740, Mar 2008.
- [12] P. Berkowitz, P. Hu, Z. Liu, L. A. Diaz, J. J. Enghild, M. P. Chua, and D. S. Rubenstein. Desmosome signaling. Inhibition of p38MAPK prevents pemphigus vulgaris IgG-induced cytoskeleton reorganization. *J. Biol. Chem.*, 280(25):23778–23784, Jun 2005.
- [13] K. D. Bingham and D. A. Shaw. The metabolism of testosterone by human male scalp skin. *Journal of Endocrinology*, 57(1):111 – 121, 01 Jan. 1973.
- [14] P. Boukamp, R. T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham, and N. E. Fusenig. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol*, 106(3):761–771, Mar 1988.

- [15] R. Caldelari, A. de Bruin, D. Baumann, M. M. Suter, C. Bierkamp, V. Balmer, and E. Müller. A central role for the armadillo protein plakoglobin in the autoimmune disease pemphigus vulgaris. *J Cell Biol*, 153(4):823–834, May 2001.
- [16] C. C. Calkins, S. V. Setzer, J. M. Jennings, S. Summers, K. Tsunoda, M. Amagai, and A. P. Kowalczyk. Desmoglein endocytosis and desmosome disassembly are coordinated responses to pemphigus auto-antibodies. *J Biol Chem*, 281(11):7623–7634, Mar 2006.
- [17] A. E. Carpenter, T. R. Jones, M. R. Lamprecht, C. Clarke, I. H. Kang, O. Friman, D. A. Guertin, J. H. Chang, R. A. Lindquist, J. Moffat, P. Golland, and D. M. Sabatini. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol.*, 7(10):R100, 2006.
- [18] J. K. Cheong and D. M. Virshup. Casein kinase 1: Complexity in the family. *Int J Biochem Cell Biol*, 43(4):465–469, Apr 2011.
- [19] A. I. Chernyavsky, J. Arredondo, Y. Kitajima, M. Sato-Nagai, and S. A. Grando. Desmoglein versus non-desmoglein signaling in pemphigus acantholysis: characterization of novel signaling pathways downstream of pemphigus vulgaris antigens. *J Biol Chem*, 282(18):13804–13812, May 2007.
- [20] N. A. Chitaev, R. E. Leube, R. B. Troyanovsky, L. G. Eshkind, W. W. Franke, and S. M. Troyanovsky. The binding of plakoglobin to desmosomal cadherins: patterns of binding sites and topogenic potential. *J Cell Biol*, 133(2):359–369, Apr 1996.
- [21] P. Cowin, H. P. Kapprell, W. W. Franke, J. Tamkun, and R. O. Hynes. Plakoglobin: a protein common to different kinds of intercellular adhering junctions. *Cell*, 46(7):1063–1073, Sep 1986.
- [22] T. Deller, W. Kummer, and U. Welsch. *Histologie : Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie : das Lehrbuch*. Elsevier, 5. auflage. edition, 2018.

- [23] E. Delva and A. P. Kowalczyk. Regulation of cadherin trafficking. *Traffic*, 10(3):259–267, Mar 2009.
- [24] E. Delva, D. K. Tucker, and A. P. Kowalczyk. The desmosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(2):a002543, Aug 2009.
- [25] A. der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF)-Ständige Kommission Leitlinien. *AWMF-S2k-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Pemphigus vulgaris / foliaceus und des bullösen Pemphigoids“*. AWMF, 2019.
- [26] G. F. Diercks, H. H. Pas, and M. F. Jonkman. The ultrastructure of acantholysis in pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol*, 160(2):460–461, Feb 2009.
- [27] M. Dmochowski, T. Hashimoto, M. A. Chidgey, K. K. Yue, R. W. Wilkinson, T. Nishikawa, and D. R. Garrod. Demonstration of antibodies to bovine desmocollin isoforms in certain pemphigus sera. *Br J Dermatol*, 133(4):519–525, Oct 1995.
- [28] M. Dmochowski, T. Hashimoto, D. R. Garrod, and T. Nishikawa. Desmocollins I and II are recognized by certain sera from patients with various types of pemphigus, particularly Brazilian pemphigus foliaceus. *J Invest Dermatol*, 100(4):380–384, Apr 1993.
- [29] D. T. Egu, E. Walter, V. Spindler, and J. Waschke. Inhibition of p38MAPK signalling prevents epidermal blistering and alterations of desmosome structure induced by pemphigus autoantibodies in human epidermis. *Br J Dermatol*, 177(6):1612–1618, 12 2017.
- [30] L. A. Ernst, R. K. Gupta, R. B. Mujumdar, and A. S. Waggoner. Cyanine dye labeling reagents for sulfhydryl groups. *Cytometry*, 10(1):3–10, Jan 1989.
- [31] F. Evangelista, D. A. Dasher, L. A. Diaz, P. S. Prisanh, and N. Li. E-cadherin is an additional immunological target for pemphigus autoantibodies. *J Invest Dermatol*, 128(7):1710–1718, Jul 2008.

- [32] M. G. Farquhar and G. E. Palade. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol*, 17:375–412, May 1963.
- [33] E. W. Flitney, E. R. Kuczumski, S. A. Adam, and R. D. Goldman. Insights into the mechanical properties of epithelial cells: the effects of shear stress on the assembly and remodeling of keratin intermediate filaments. *FASEB J*, 23(7):2110–2119, Jul 2009.
- [34] H. Flotow, P. R. Graves, A. Q. Wang, C. J. Fiol, R. W. Roeske, and P. J. Roach. Phosphate groups as substrate determinants for casein kinase I action. *J Biol Chem*, 265(24):14264–14269, Aug 1990.
- [35] M. Gallego and D. M. Virshup. Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(2):139–148, Feb 2007.
- [36] D. Garrod and M. Chidgey. Desmosome structure, composition and function. *Biochim Biophys Acta*, 1778(3):572–587, Mar 2008.
- [37] H. Giloh and J. Sedat. Fluorescence microscopy: reduced photobleaching of rhodamine and fluorescein protein conjugates by n-propyl gallate. *Science*, 217(4566):1252–1255, 1982.
- [38] L. M. Godsel, A. D. Dubash, A. E. Bass-Zubek, E. V. Amargo, J. L. Klessner, R. P. Hobbs, X. Chen, and K. J. Green. Plakophilin 2 couples actomyosin remodeling to desmosomal plaque assembly via RhoA. *Mol Biol Cell*, 21(16):2844–2859, Aug 2010.
- [39] L. M. Godsel, S. N. Hsieh, E. V. Amargo, A. E. Bass, L. T. Pascoe-McGillicuddy, A. C. Huen, M. E. Thorne, C. A. Gaudry, J. K. Park, K. Myung, R. D. Goldman, T. L. Chew, and K. J. Green. Desmoplakin assembly dynamics in four dimensions: multiple phases differentially regulated by intermediate filaments and actin. *J Cell Biol*, 171(6):1045–1059, Dec 2005.
- [40] S. A. Grando. Pemphigus autoimmunity: hypotheses and realities. *Autoimmunity*, 45(1):7–35, Feb 2012.

- [41] K. J. Green, S. Getsios, S. Troyanovsky, and L. M. Godsel. Intercellular junction assembly, dynamics, and homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(2):a000125, Feb 2010.
- [42] C. M. Hammers and J. R. Stanley. Mechanisms of Disease: Pemphigus and Bullous Pemphigoid. *Annu Rev Pathol*, 11:175–197, 05 2016.
- [43] E. Hartlieb, B. Kempf, M. Partilla, B. Vigh, V. Spindler, and J. Waschke. Desmoglein 2 is less important than desmoglein 3 for keratinocyte cohesion. *PLoS One*, 8(1):e53739, 2013.
- [44] K. Hashimoto and W. F. Lever. An Ultrastructural Study of Cell Junctions in Pemphigus Vulgaris. *Archives of Dermatology*, 101(3):287–298, 03 1970.
- [45] M. Hatzfeld, R. Keil, and T. M. Magin. Desmosomes and Intermediate Filaments: Their Consequences for Tissue Mechanics. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9(6), Jun 2017.
- [46] M. Hatzfeld, A. Wolf, and R. Keil. Plakophilins in desmosomal adhesion and signaling. *Cell Commun Adhes*, 21(1):25–42, Feb 2014.
- [47] W. He, P. Cowin, and D. L. Stokes. Untangling desmosomal knots with electron tomography. *Science*, 302(5642):109–113, Oct 2003.
- [48] H. Hennings and K. A. Holbrook. Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture. An ultrastructural study. *Exp Cell Res*, 143(1):127–142, Jan 1983.
- [49] W. M. Heupel, D. Zillikens, D. Drenckhahn, and J. Waschke. Pemphigus vulgaris IgG directly inhibit desmoglein 3-mediated transinteraction. *J Immunol*, 181(3):1825–1834, Aug 2008.
- [50] I. Hofmann, C. Mertens, M. Brettel, V. Nimmrich, M. Schnölzer, and H. Herrmann. Interaction of plakophilins with desmoplakin and intermediate filament proteins: an in vitro analysis. *J Cell Sci*, 113 ( Pt 13):2471–2483, Jul 2000.

- [51] B. Holthöfer, R. Windoffer, S. Troyanovsky, and R. E. Leube. Structure and function of desmosomes. *Int Rev Cytol*, 264:65–163, 2007.
- [52] M. M. Holtsche, K. Boch, and E. Schmidt. Autoimmune bullous dermatoses. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.*, 21(4):405–412, Apr. 2023.
- [53] K. Ishii, R. Harada, I. Matsuo, Y. Shirakata, K. Hashimoto, and M. Amagai. In vitro keratinocyte dissociation assay for evaluation of the pathogenicity of anti-desmoglein 3 IgG autoantibodies in pemphigus vulgaris. *J. Invest. Dermatol.*, 124(5):939–946, May 2005.
- [54] J. M. Jennings, D. K. Tucker, M. D. Kottke, M. Saito, E. Delva, Y. Hanakawa, M. Amagai, and A. P. Kowalczyk. Desmosome disassembly in response to pemphigus vulgaris IgG occurs in distinct phases and can be reversed by expression of exogenous Dsg3. *J. Invest. Dermatol.*, 131(3):706–718, Mar 2011.
- [55] P. Joly, M. Maho-Vaillant, C. Prost-Squarcioni, V. Hebert, E. Houivet, S. Calbo, F. Caillot, M. L. Golinski, B. Labeille, C. Picard-Dahan, C. Paul, M. A. Richard, J. D. Bouaziz, S. Duvert-Lehembre, P. Bernard, F. Caux, M. Alexandre, S. Ingen-Housz-Oro, P. Vabres, E. Delaporte, G. Quereux, A. Dupuy, S. Debarbieux, M. Avenel-Audran, M. D’Incan, C. Bedane, N. Bénéton, D. Jullien, N. Dupin, L. Misery, L. Machet, M. Beylot-Barry, O. Dereure, B. Sassolas, T. Vermeulin, J. Benichou, and P. Musette. First-line rituximab combined with short-term prednisone versus prednisone alone for the treatment of pemphigus (Ritux 3): a prospective, multicentre, parallel-group, open-label randomised trial. *Lancet*, 389(10083):2031–2040, May 2017.
- [56] M. Kasperkiewicz, C. T. Ellebrecht, H. Takahashi, J. Yamagami, D. Zillikens, A. S. Payne, and M. Amagai. Pemphigus. *Nat Rev Dis Primers*, 3:17026, May 2017.
- [57] R. Keil, K. Rietscher, and M. Hatzfeld. Antagonistic Regulation of Intercellular Cohesion by Plakophilins 1 and 3. *J Invest Dermatol*, 136(10):2022–2029, 10 2016.

- [58] D. E. Kelly. Fine structure of desmosomes, hemidesmosomes, and an adepidermal globular layer in developing newt epidermis. *Journal of Cell Biology*, 28(1):51–72, Jan. 1966.
- [59] E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, K. Takiyama, and T. Koike. Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5(4):749–757, 2006.
- [60] Y. Kitajima. 150th anniversary series: Desmosomes and autoimmune disease, perspective of dynamic desmosome remodeling and its impairments in pemphigus. *Cell Communication & Adhesion*, 21(6):269–280, 2014. PMID: 25078507.
- [61] A. Kljuic, H. Bazzi, J. P. Sundberg, A. Martinez-Mir, R. O’Shaughnessy, M. G. Mahoney, M. Levy, X. Montagutelli, W. Ahmad, V. M. Aita, D. Gordon, J. Uitto, D. Whiting, J. Ott, S. Fischer, T. C. Gilliam, C. A. Jahoda, R. J. Morris, A. A. Panteleyev, V. T. Nguyen, and A. M. Christiano. Desmoglein 4 in hair follicle differentiation and epidermal adhesion: evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris. *Cell*, 113(2):249–260, Apr 2003.
- [62] A. Kneisel and M. Hertl. Autoimmune bullous skin diseases. part 1: Clinical manifestations. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 9(10):844–857, 2011.
- [63] A. Kneisel and M. Hertl. Autoimmune bullous skin diseases. part 2: diagnosis and therapy. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 9(11):927–947, 2011.
- [64] U. Knippschild, A. Gocht, S. Wolff, N. Huber, J. Löhler, and M. Stöter. The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell Signal*, 17(6):675–689, Jun 2005.
- [65] U. Knippschild, M. Krüger, J. Richter, P. Xu, B. García-Reyes, C. Peifer, J. Halekotte, V. Bakulev, and J. Bischof. The CK1 Family: Con-

- tribution to Cellular Stress Response and Its Role in Carcinogenesis. *Front Oncol*, 4:96, 2014.
- [66] R. M. Knudson, A. N. Kalaaji, and A. J. Bruce. The management of mucous membrane pemphigoid and pemphigus. *Dermatol Ther*, 23(3):268–280, 2010.
- [67] P. J. Koch, M. G. Mahoney, H. Ishikawa, L. Pulkkinen, J. Uitto, L. Shultz, G. F. Murphy, D. Whitaker-Menezes, and J. R. Stanley. Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris. *J Cell Biol*, 137(5):1091–1102, Jun 1997.
- [68] N. J. Korman, R. W. Eyre, V. Klaus-Kovtun, and J. R. Stanley. Demonstration of an adhering-junction molecule (plakoglobin) in the autoantigens of pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris. *New England Journal of Medicine*, 321(10):631–635, 1989. PMID: 2770792.
- [69] C. Kröger, F. Loschke, N. Schwarz, R. Windoffer, R. E. Leube, and T. M. Magin. Keratins control intercellular adhesion involving PKC- $\alpha$ -mediated desmoplakin phosphorylation. *J Cell Biol*, 201(5):681–692, May 2013.
- [70] T. Kuga, H. Kume, N. Kawasaki, M. Sato, J. Adachi, T. Shiromizu, I. Hoshino, T. Nishimori, H. Matsubara, and T. Tomonaga. A novel mechanism of keratin cytoskeleton organization through casein kinase I $\alpha$  and FAM83H in colorectal cancer. *J. Cell. Sci.*, 126(Pt 20):4721–4731, Oct 2013.
- [71] T. Kuga, M. Sasaki, T. Mikami, Y. Miake, J. Adachi, M. Shimizu, Y. Saito, M. Koura, Y. Takeda, J. Matsuda, T. Tomonaga, and Y. Nakayama. FAM83H and casein kinase I regulate the organization of the keratin cytoskeleton and formation of desmosomes. *Sci Rep*, 6:26557, 05 2016.

- [72] A. Kölsch, R. Windoffer, T. Würflinger, T. Aach, and R. E. Leube. The keratin-filament cycle of assembly and disassembly. *J Cell Sci*, 123(Pt 13):2266–2272, Jul 2010.
- [73] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685, Aug 1970.
- [74] J. D. Lewis, A. L. Caldara, S. E. Zimmer, S. N. Stahley, A. Seybold, N. L. Strong, A. S. Frangakis, I. Levental, J. K. Wahl, A. L. Mattheyses, T. Sasaki, K. Nakabayashi, K. Hata, Y. Matsubara, A. Ishida-Yamamoto, M. Amagai, A. Kubo, and A. P. Kowalczyk. The desmosome is a mesoscale lipid raft-like membrane domain. *Molecular Biology of the Cell*, 30(12):1390–1405, 2019. PMID: 30943110.
- [75] D. Lingwood and K. Simons. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 327(5961):46–50, 2010.
- [76] J. Liu, L. P. Carvalho, S. Bhattacharya, C. J. Carbone, K. G. Kumar, N. A. Leu, P. M. Yau, R. G. Donald, M. J. Weiss, D. P. Baker, K. J. McLaughlin, P. Scott, and S. Y. Fuchs. Mammalian casein kinase 1 $\alpha$  and its leishmanial ortholog regulate stability of IFNAR1 and type I interferon signaling. *Mol Cell Biol*, 29(24):6401–6412, Dec 2009.
- [77] R. Lüllmann-Rauch and E. Asan. *Taschenlehrbuch Histologie*. Thieme, 2015.
- [78] W. Luttmann. *Der Experimentator: Immunologie*. Der Experimentator. Springer Spektrum, Berlin ; Heidelberg, 4., vollst. überarb. und korr. Aufl. edition, 2014.
- [79] M. G. Mahoney, Z. Wang, K. Rothenberger, P. J. Koch, M. Amagai, and J. R. Stanley. Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. *J Clin Invest*, 103(4):461–468, Feb 1999.

- [80] V. K.-K. Masayuki Amagai and J. R. Stanley. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell*, 67(5):869–877, 1991.
- [81] M. Moch, N. Schwarz, R. Windoffer, and R. E. Leube. The keratin-desmosome scaffold: pivotal role of desmosomes for keratin network morphogenesis. *Cell Mol Life Sci*, 77(3):543–558, Feb 2020.
- [82] R. Moll, M. Divo, and L. Langbein. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol*, 129(6):705–733, Jun 2008.
- [83] J. P. Morini, B. Jomaa, Y. Gorgi, M. H. Saguem, R. Nouira, J. C. Roujeau, and J. Revuz. Pemphigus foliaceus in young women. An endemic focus in the Sousse area of Tunisia. *Arch Dermatol*, 129(1):69–73, Jan 1993.
- [84] C. Mühlhardt. *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. Experimentator. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, 7., aktualisierte auflage edition, 2013.
- [85] O. Nekrasova and K. J. Green. Desmosome assembly and dynamics. *Trends Cell Biol*, 23(11):537–546, Nov 2013.
- [86] O. E. Nekrasova, E. V. Amargo, W. O. Smith, J. Chen, G. E. Kreitzer, and K. J. Green. Desmosomal cadherins utilize distinct kinesins for assembly into desmosomes. *J Cell Biol*, 195(7):1185–1203, Dec 2011.
- [87] M. S. Nielsen, L. N. Axelsen, P. L. Sorgen, V. Verma, M. Delmar, and N. H. Holstein-Rathlou. Gap junctions. *Compr Physiol*, 2(3):1981–2035, Jul 2012.
- [88] A. J. North, W. G. Bardsley, J. Hyam, E. A. Bornslaeger, H. C. Cordingley, B. Trinnaman, M. Hatzfeld, K. J. Green, A. I. Magee, and D. R. Garrod. Molecular map of the desmosomal plaque. *J Cell Sci*, 112 ( Pt 23):4325–4336, Dec 1999.
- [89] G. F. Odland. The fine structure of the interrelationship of cells in the human epidermis. *J Biophys Biochem Cytol*, 4(5):529–538, Sep 1958.

- [90] D. A. Otkarina, G. van der Wier, G. F. Diercks, M. F. Jonkman, and H. H. Pas. IgG-induced clustering of desmogleins 1 and 3 in skin of patients with pemphigus fits with the desmoglein nonassembly depletion hypothesis. *Br J Dermatol*, 165(3):552–562, Sep 2011.
- [91] K. Osada, M. Seishima, and Y. Kitajima. Pemphigus IgG activates and translocates protein kinase C from the cytosol to the particulate/cytoskeleton fractions in human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 108(4):482–487, Apr 1997.
- [92] S. Osmanagic-Myers, M. Gregor, G. Walko, G. Burgstaller, S. Reipert, and G. Wiche. J Cell BiolPlectin-controlled keratin cytoarchitecture affects MAP kinases involved in cellular stress response and migration. *J Cell Biol*, 174(4):557–568, Aug 2006.
- [93] A. L. Perl, J. L. Pokorny, and K. J. Green. Desmosomes at a glance. *Journal of Cell Science*, 137(12):jcs261899, 06 2024.
- [94] S. Pokutta and W. I. Weis. Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23:237–261, 2007.
- [95] M. A. Price. CKI, there’s more than one: casein kinase I family members in Wnt and Hedgehog signaling. *Genes Dev*, 20(4):399–410, Feb 2006.
- [96] E. Proksch, J. M. Brandner, and J. M. Jensen. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol*, 17(12):1063–1072, Dec 2008.
- [97] R. A. Quinlan, N. Schwarz, R. Windoffer, C. Richardson, T. Hawkins, J. A. Broussard, K. J. Green, and R. E. Leube. A rim-and-spoke hypothesis to explain the biomechanical roles for cytoplasmic intermediate filament networks. *J Cell Sci*, 130(20):3437–3445, Oct 2017.
- [98] L. Ramms, G. Fabris, R. Windoffer, N. Schwarz, R. Springer, C. Zhou, J. Lazar, S. Stiefel, N. Hersch, U. Schnakenberg, T. M. Magin, R. E.

- Leube, R. Merkel, and B. Hoffmann. Keratins as the main component for the mechanical integrity of keratinocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(46):18513–18518, 2013.
- [99] N. Resnik, K. Sepcic, A. Plemenitas, R. Windoffer, R. Leube, and P. Veranic. Desmosome assembly and cell-cell adhesion are membrane raft-dependent processes. *J. Biol. Chem.*, 286(2):1499–1507, Jan 2011.
- [100] M. Rosenbach, D. F. Murrell, J. C. Bystryrn, S. Dulay, S. Dick, S. Fakharzadeh, R. Hall, N. J. Korman, J. Lin, J. Okawa, A. G. Pandya, A. S. Payne, M. Rose, D. Rubenstein, D. Woodley, C. Vittorio, B. B. Werth, E. A. Williams, L. Taylor, A. B. Troxel, and V. P. Werth. Reliability and convergent validity of two outcome instruments for pemphigus. *J Invest Dermatol*, 129(10):2404–2410, Oct 2009.
- [101] M. Saito, S. N. Stahley, C. Y. Caughman, X. Mao, D. K. Tucker, A. S. Payne, M. Amagai, and A. P. Kowalczyk. Signaling dependent and independent mechanisms in pemphigus vulgaris blister formation. *PLOS ONE*, 7(12):1–14, 12 2012.
- [102] M. Sato, Y. Aoyama, and Y. Kitajima. Assembly pathway of desmoglein 3 to desmosomes and its perturbation by pemphigus vulgaris-IgG in cultured keratinocytes, as revealed by time-lapsed labeling immunoelectron microscopy. *Lab Invest*, 80(10):1583–1592, Oct 2000.
- [103] B. Schitteck and T. Sinnberg. Biological functions of casein kinase 1 isoforms and putative roles in tumorigenesis. *Mol Cancer*, 13:231, Oct 2014.
- [104] E. Schlögl, M. Y. Radeva, F. Vielmuth, C. Schinner, J. Waschke, and V. Spindler. Keratin Retraction and Desmoglein3 Internalization Independently Contribute to Autoantibody-Induced Cell Dissociation in Pemphigus Vulgaris. *Front Immunol*, 9:858, 2018.
- [105] E. Schmidt, C. Dähnrich, A. Rosemann, C. Probst, L. Komorowski, S. Saschenbrecker, W. Schlumberger, W. Stöcker, T. Hashimoto, E. B.

- Bröcker, A. Recke, C. Rose, and D. Zillikens. Novel ELISA systems for antibodies to desmoglein 1 and 3: correlation of disease activity with serum autoantibody levels in individual pemphigus patients. *Exp Dermatol*, 19(5):458–463, May 2010.
- [106] E. Schmidt, M. Kasperkiewicz, and P. Joly. Pemphigus. *Lancet*, 394(10201):882–894, Sep 2019.
- [107] M. Seishima, C. Esaki, K. Osada, S. Mori, T. Hashimoto, and Y. Kitajima. Pemphigus igg, but not bullous pemphigoid igg, causes a transient increase in intracellular calcium and inositol 1,4,5-triphosphate in djm-1 cells, a squamous cell carcinoma line. *The Journal of investigative dermatology*, 104(1):33–37, January 1995.
- [108] K. Seltmann, A. W. Fritsch, J. A. Käs, and T. M. Magin. Keratins significantly contribute to cell stiffness and impact invasive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(46):18507–18512, Nov 2013.
- [109] K. Simons and R. Ehehalt. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(5):597–603, 9 2002.
- [110] S. Sivaramakrishnan, J. V. DeGiulio, L. Lorand, R. D. Goldman, and K. M. Ridge. Micromechanical properties of keratin intermediate filament networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(3):889–894, 2008.
- [111] S. Sivaramakrishnan, J. L. Schneider, A. Sitikov, R. D. Goldman, and K. M. Ridge. Mol Biol CellShear stress induced reorganization of the keratin intermediate filament network requires phosphorylation by protein kinase C zeta. *Mol Biol Cell*, 20(11):2755–2765, Jun 2009.
- [112] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 150(1):76–85, Oct 1985.

- [113] V. Spindler, D. Drenckhahn, D. Zillikens, and J. Waschke. Pemphigus IgG causes skin splitting in the presence of both desmoglein 1 and desmoglein 3. *Am J Pathol*, 171(3):906–916, Sep 2007.
- [114] V. Spindler, R. Eming, E. Schmidt, M. Amagai, S. Grando, M. F. Jonkman, A. P. Kowalczyk, E. J. Müller, A. S. Payne, C. Pincelli, A. A. Sinha, E. Sprecher, D. Zillikens, M. Hertl, and J. Waschke. Mechanisms Causing Loss of Keratinocyte Cohesion in Pemphigus. *J Invest Dermatol*, 138(1):32–37, 01 2018.
- [115] V. Spindler, A. Endlich, E. Hartlieb, F. Vielmuth, E. Schmidt, and J. Waschke. The extent of desmoglein 3 depletion in pemphigus vulgaris is dependent on Ca(2+)-induced differentiation: a role in suprabasal epidermal skin splitting? *Am J Pathol*, 179(4):1905–1916, Oct 2011.
- [116] V. Spindler, V. Rötzer, C. Dehner, B. Kempf, M. Gliem, M. Radeva, E. Hartlieb, G. S. Harms, E. Schmidt, and J. Waschke. Peptide-mediated desmoglein 3 crosslinking prevents pemphigus vulgaris autoantibody-induced skin blistering. *J Clin Invest*, 123(2):800–811, 2013.
- [117] V. Spindler and J. Waschke. Desmosomal cadherins and signaling: lessons from autoimmune disease. *Cell Commun Adhes*, 21(1):77–84, Feb 2014.
- [118] V. Spindler and J. Waschke. Pemphigus—a disease of desmosome dysfunction caused by multiple mechanisms. *Frontiers in Immunology*, 9:136, 2018.
- [119] S. N. Stahley, M. Saito, V. Faundez, M. Koval, A. L. Mattheyses, and A. P. Kowalczyk. Desmosome assembly and disassembly are membrane raft-dependent. *PLoS ONE*, 9(1):e87809, 2014.
- [120] R. B. Stoughton. Mechanisms of blister formation. *AMA Arch Derm*, 76(5):584–590, Nov 1957.

- [121] K. Tsunoda, T. Ota, M. Aoki, T. Yamada, T. Nagai, T. Nakagawa, S. Koyasu, T. Nishikawa, and M. Amagai. Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. *J Immunol*, 170(4):2170–2178, Feb 2003.
- [122] N. van Beek, M. M. Holtsche, I. Atefi, H. Olbrich, M. J. Schmitz, J. Pruessmann, A. Vorobyev, and E. Schmidt. State-of-the-art diagnosis of autoimmune blistering diseases. *Front. Immunol.*, 15:1363032, June 2024.
- [123] F. Vielmuth, E. Walter, M. Fuchs, M. Y. Radeva, F. Buechau, T. M. Magin, V. Spindler, and J. Waschke. Keratins regulate p38mapk-dependent desmoglein binding properties in pemphigus. *Frontiers in Immunology*, 9, 2018.
- [124] F. Vielmuth, M. T. Wanuske, M. Y. Radeva, M. Hiermaier, D. Kugelmann, E. Walter, F. Buechau, T. M. Magin, J. Waschke, and V. Spindler. Keratins Regulate the Adhesive Properties of Desmosomal Cadherins through Signaling. *J Invest Dermatol*, 138(1):121–131, 01 2018.
- [125] F. Vielmuth, J. Waschke, and V. Spindler. Loss of desmoglein binding is not sufficient for keratinocyte dissociation in pemphigus. *Journal of Investigative Dermatology*, 135(12):3068 – 3077, 2015.
- [126] E. Walter, F. Vielmuth, L. Rotkopf, M. Sárdy, O. N. Horváth, M. Gobeber, E. Schmidt, R. Eming, M. Hertl, V. Spindler, and J. Waschke. Different signaling patterns contribute to loss of keratinocyte cohesion dependent on autoantibody profile in pemphigus. *Sci Rep*, 7(1):3579, 06 2017.
- [127] F. Wang, A. Ziemann, and P. A. Coulombe. Chapter twelve - skin keratins. In M. B. Omary and R. K. Liem, editors, *Intermediate Filament Proteins*, volume 568 of *Methods in Enzymology*, pages 303–350. Academic Press, 2016.

- [128] H. H. Wang, C. W. Liu, Y. C. Li, and Y. C. Huang. Efficacy of rituximab for pemphigus: a systematic review and meta-analysis of different regimens. *Acta Derm Venereol*, 95(8):928–932, Nov 2015.
- [129] S. J. Warren, M. S. Lin, G. J. Giudice, R. G. Hoffmann, G. Hans-Filho, V. Aoki, E. A. Rivitti, V. Santos, and L. A. Diaz. The prevalence of antibodies against desmoglein 1 in endemic pemphigus foliaceus in Brazil. Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. *N Engl J Med*, 343(1):23–30, Jul 2000.
- [130] J. Waschke. The desmosome and pemphigus. *Histochem Cell Biol*, 130(1):21–54, Jul 2008.
- [131] J. Waschke, P. Bruggeman, W. Baumgartner, D. Zillikens, and D. Drenckhahn. Pemphigus foliaceus IgG causes dissociation of desmoglein 1-containing junctions without blocking desmoglein 1 transinteraction. *J Clin Invest*, 115(11):3157–3165, Nov 2005.
- [132] T. P. Whitehead, L. J. Kricka, T. J. Carter, and G. H. Thorpe. Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. *Clin. Chem.*, 25(9):1531–1546, Sep 1979.
- [133] N. V. Whittock and C. Bower. Genetic evidence for a novel human desmosomal cadherin, desmoglein 4. *J Invest Dermatol*, 120(4):523–530, Apr 2003.
- [134] G. F. Wilgram, J. B. Caulfield, and W. F. Lever. An electron microscopic study of acantholysis in pemphigus vulgaris. *J. Invest. Dermatol.*, 36:373–382, May 1961.
- [135] L. Williamson, N. A. Raess, R. Caldelari, A. Zakher, A. de Bruin, H. Posthaus, R. Bolli, T. Hunziker, M. M. Suter, and E. J. Müller. Pemphigus vulgaris identifies plakoglobin as key suppressor of c-Myc in the skin. *EMBO J*, 25(14):3298–3309, Jul 2006.

- [136] R. Windoffer, M. Beil, T. M. Magin, and R. E. Leube. Cytoskeleton in motion: the dynamics of keratin intermediate filaments in epithelia. *J Cell Biol*, 194(5):669–678, Sep 2011.
- [137] R. Windoffer, M. Borchert-Stuhlträger, and R. E. Leube. Desmosomes: interconnected calcium-dependent structures of remarkable stability with significant integral membrane protein turnover. *J Cell Sci*, 115(Pt 8):1717–1732, Apr 2002.
- [138] S. Wöll, R. Windoffer, and R. E. Leube. J Cell Biolp38 MAPK-dependent shaping of the keratin cytoskeleton in cultured cells. *J Cell Biol*, 177(5):795–807, Jun 2007.

# Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
∅	Durchmesser
±	Plusminus
°C	Grad Celsius
ADP	Adenosindiphosphat
ÄMP	äußere Membranplaque
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
β-MCD	Methyl-β-Cyclodextrin
BSA	Bovines Serumalbumin
C-IgG	Kontroll-Immunglobuline
Ca <sup>2+</sup>	Calcium, Kalzium
CK-1	Casein-Kinase-1
CK	Cytokeratin, Zytokeratin
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cu <sup>2+</sup>	Kupfer
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	engl. deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DP	Desmoplakin
Dsc	Desmocollin
Dsg	Desmoglein
DSMO	Dimethylsulfoxid

---

DTT	Dithiotreitol
EC	Extrazellulärdomäne
ECL	engl. enhanced chemiluminescence, erweiterte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor, epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
engl.	englisch
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein
h	Stunde
HaCaT	engl. human adult low calcium elevated temperature cells
HBSS	Hank's balanced salt solution
HSP	engl. heat shock protein (zu deutsch Hitzeschockprotein)
IF	Immunfluoreszenzdarstellung
IgG	Immunglobulin
IMP	innere Membranplaque
LB(-Medium)	Luria-Broth(-Medium)
min	Minuten
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar = Mikromol/Liter
ml	Milliliter
mM	Millimolar = Millimol/Liter
MTT	Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium Bromid
mW	Milliwatt
Na	Natrium
nm	Nanometer
NPG	N-Propylgallat

---

p38MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate-buffered saline
PF	Pemphigus foeliacus
Pg	Plakoglobin
PKC	Proteinkinase C
Pkp	Plakophilin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PV	Pemphigus vulgaris
px	Pixel
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEM	standard error of the mean
Src	Sarkoma-assoziierte Kinase
TBS-T	Tris-buffered saline mit Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
U/ml	Units pro Milliliter
WB	Western Blot
YFP	yellow fluorescent protein



# Danksagung

Ich möchte an erster Stelle meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Volker Spindler für die Überlassung des Themas danken. Die Thematik hat mich seit der Weihnachtsvorlesung 2012 in meinem 1. Semester begeistert und mein Interesse am wissenschaftlichen Arbeiten geweckt. Vielen Dank für die Betreuung und die Möglichkeit, an Kongressen teilzunehmen und meine Daten zu präsentieren. Ebenso gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Jens Waschke für die wissenschaftlichen Diskussionen im Rahmen der Lab-Meetings. Bedanken möchte ich mich außerdem bei allen Mitarbeiter\*innen der Anatomischen Anstalt für die Einarbeitung und Unterstützung sowohl in wissenschaftlicher, als auch technischer Hinsicht. Besonders nennen möchte ich Frau Dr. Mariya Radeva für die Unterstützung bei molekulargenetischen Fragen und Schwierigkeiten.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite steht.



LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät  
Promotionsbüro



## Eidesstattliche Versicherung

Schlögl, Elisabeth

Name, Vorname

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

### **Untersuchung der Zytoskelettveränderungen bei Pemphigus vulgaris**

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.

Wien, 29.04.2025

Ort, Datum

Elisabeth Schlögl

Unterschrift Elisabeth Schlögl



LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät  
Promotionsbüro



## Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung

Schlögl, Elisabeth

---

Name, Vorname

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel:

**Untersuchung der Zytoskelettveränderungen bei Pemphigus vulgaris**

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

Wien, 29.04.2025

---

Ort, Datum

Elisabeth Schlögl

---

Unterschrift Elisabeth Schlögl