

Aus der
Anatomischen Anstalt
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München



***Bedeutung von ADAM10 und Cortactin für die Zelladhäsion von
Keratinocyten und die Pathogenese von Pemphigus Vulgaris***

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

vorgelegt von
Maresa Elisabeth Anders

aus
München

2025

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

Erstes Gutachten: Prof. Dr. Jens Waschke

Zweites Gutachten: Prof. Dr. Volker Spindler

Drittes Gutachten: PD Dr. Anne Gürtler

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 28.07.2025

Für meine drei „Eltern“

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Aufbau und Funktion der Haut	7
1.2	Aufbau der Epidermis	7
1.3	Zell-Zell-Kontakte der Keratinozyten	8
1.3.1	Verschlusskontakte	9
1.3.2	Haftkontakte.....	9
1.3.2.1	Adhärenskontakte	10
1.3.2.2	Desmosomen.....	10
1.4	Zytoskelett der Keratinozyten	13
1.4.1	Aktinfilamente und deren Begleitproteine	13
1.4.1.1	Aktin	13
1.4.1.2	Das aktinbindende Protein Cortactin	14
1.4.2	Intermediärfilamente	14
1.5	Pemphigus	14
1.5.1	Klinik und Unterformen.....	15
1.5.2	Pathophysiologie des Pemphigus.....	17
1.5.3	Zu untersuchende Signalwege	17
1.5.3.1	Sheddasen ADAM10 und ADAM17	18
1.5.3.2	EGFR und seine Liganden.....	19
1.5.3.3	Erk1/2	19
2	Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	20
3	Material und Methoden	23
3.1	Material	23
3.1.1	Zelllinien	23
3.1.2	Chemikalien, Puffer und Lösungen	23
3.1.3	Antikörper und Mediatoren.....	26
3.1.4	Verbrauchsmaterial und Geräte.....	29
3.2	Methoden	30
3.2.1	Zellkultur	30
3.2.2	Proteinbiochemische Methoden	31
3.2.2.1	Herstellung von SDS-Zelllysaten	31

3.2.2.2	Triton-X-100-vermittelte Proteinextraktion	32
3.2.2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	32
3.2.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	33
3.2.2.5	Western Blot-Analyse	33
3.2.2.6	Immunodetektion der transferierten Proteine	34
3.2.3	Immunfluoreszenzuntersuchungen	34
3.2.4	Zelldissoziationsversuche	35
3.2.5	Zelldissoziationsversuche bei Hyperadhäsion	36
3.2.6	Statistische Auswertung und Bildbearbeitung	37
4	Ergebnisse	38
4.1	Bedeutung der Sheddases ADAM10 und ADAM17 für die basale Zelladhäsion	38
4.1.1	Destabilisierende Wirkung von ADAM10 auf die Zelladhäsion	38
4.1.2	Effekt der ADAM-Inhibitoren auf Dsg1, Dsg3 sowie EGFR	39
4.1.3	Induktion von Hyperadhäsion durch ADAM10-Inhibition	43
4.1.4	Verringerung des PV-Antikörper-induzierten Zelladhäsionsverlustes durch ADAM10-Inhibition.....	44
4.1.5	Abhängigkeit der adhäsionsstabilisierenden Wirkung durch ADAM10-Inhibition von Dsg 3	47
4.2	Charakterisierung der Cortactin-defizienten Maus-Zelllinie.....	49
4.2.1	Zelladhäsionsverlust durch Cortactin-Defizienz	50
4.2.2	Einfluss der Cortactin-Defizienz auf die Zellkontakte	51
4.2.2.1	Desmosomen.....	51
4.2.2.2	Adhärensjunktionen	55
4.2.2.3	Verschlusskontakte	56
5	Diskussion	57
5.1	Rolle von ADAM10 und ADAM17 für die basale Haftung und die Hyperadhäsion.....	57
5.2	Die ADAM10-Aktivierung durch PV-Antikörper ist vermutlich Dsg3-abhängig.....	58
5.3	Rolle und Effekt von ADAM10 sind mit Dsg3 assoziiert	58
5.4	ADAM10-Inhibition verbessert vor allem die PV-IgG-induzierten Effekte auf Dsg3.....	59
5.5	Abhängigkeit der Zelladhäsion in Cortactin-defizienten Zellen von Dsg1.....	60
5.6	Dsg1 als essenzielles Molekül für die Zelladhäsion	60
5.7	Regulation der Zelladhäsion durch Erk1/2	61
6	Zusammenfassung	63
7	Summary	64
8	Ausblick.....	65

9	Abkürzungsverzeichnis.....	68
10	Literaturverzeichnis	70
11	Abbildungsverzeichnis.....	76
12	Tabellenverzeichnis.....	77
13	Publikation	77
	Danksagung	78
	Eidesstattliche Erklärung	79
	Erklärung der Übereinstimmung der gebundenen und elektronischen Fassung der Dissertation ...	80

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der Haut

Die Haut (Kutis) besteht aus zwei Teilen: An der Oberfläche liegt die epitheliale Epidermis und darunter die bindegewebige Dermis. Diese beiden Lagen sind eng miteinander verbunden, was sich lichtmikroskopisch an den Papillen in der dermo-epidermalen Verbindungszone erkennen lässt. Der Begriff Haut muss von dem Begriff Hautdecke abgegrenzt werden. Letztere bezeichnet die Einheit von Haut (Kutis) und dem darunter liegenden Binde- und Fettgewebe (Subkutis) (Lüllmann-Rauch, 2015).

Mit etwas weniger als zwei m² Fläche ist die Haut das größte Organ des menschlichen Körpers. Sie erfüllt mannigfaltige Aufgaben wie Schutz vor der Einwirkung schädlicher Noxen und Austrocknung (Barrierefunktion), Schutz vor UV-Strahlung, Wahrnehmung der Umwelt über zahlreiche, spezialisierte Sinnesorgane und auch Regulation der Körpertemperatur (Lüllmann-Rauch, 2015). Die Integrität der Haut ist somit von höchster Bedeutung für den menschlichen Organismus.

1.2 Aufbau der Epidermis

Die Epidermis ist ein mehrschichtig verhornendes Plattenepithel; der dominierende Zelltyp ist der Keratinozyt. Man unterscheidet vier übereinandergeschichtete Zellschichten, von basal nach apikal: *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum* und *stratum corneum* (s. Abb. 2). Im *stratum basale* findet Zellproliferation statt, anschließend wandern die Zellen in Richtung *stratum granulosum*. Während dieser Wanderung kommt es zu einer zunehmenden Differenzierung. Die Zellen mit gleichem Differenzierungsgrad liegen in derselben Höhe, somit ergibt sich eine Vierschichtung der Epidermis. Im *stratum corneum*, der obersten Schicht, ist die Differenzierung abgeschlossen. Die Zellen sind bereits abgestorben und verlieren einen Großteil des in ihrem Zytosol enthaltenen Wasser; sie bestehen dann fast ausschließlich aus Keratin. In den obersten Lagen des *stratum corneum* werden Kontakte zwischen den Zellen aufgelöst, sodass diese Zellschichten als Hautschuppen abgeschilfert werden können (Griffiths, Barker, Bleiker, Chalmers & Creamer, 2016).

Der Aufbau der Epidermis in diesen vier Schichten ist in fast allen Regionen des Körpers gleich, allerdings unterscheidet sich die Dicke der Epidermis und auch die Dicke der einzelnen Schichten erheblich. An der Felderhaut, die den Großteil der Körperoberfläche bedeckt und unter anderem durch das Vorhandensein von Haaren gekennzeichnet ist, beträgt die Dicke der Epidermis 50-100 µm. Die Leistenhaut dagegen, die nur einen kleinen Teil der Hautoberfläche, vor allem Hand- und Fußflächen, bedeckt und weder über Haare noch über Talgdrüsen verfügt, weist eine bis zu zehnmals dickere Epidermis auf als die Felderhaut. Diese Unterschiede in der Dicke beruhen vor allem auf einer Dickenzunahme des *stratum corneum*, das bis zu viermal mehr Zellschichten aufweisen kann. Zudem verfügt die Leistenhaut über eine zusätzliche fünfte Schicht, das *stratum lucidum*, das zwischen *stratum granulosum* und *stratum corneum* liegt und eine Übergangszone zwischen diesen beiden Schichten darstellt. Die

Zellen enthalten hier noch Reste der Zellorganellen und wandeln sich zu den Hornzellen des *stratum corneum* um. Das *stratum lucidum* kann als Übergangsschicht zwischen den lebenden und abgestorbenen Zellen gesehen werden. Hier findet die sogenannte *Cornification* statt, die einer speziellen Form der Apoptose entspricht.

Neben den Keratinozyten sind noch andere Zellen in der Epidermis vertreten, die insgesamt einen Anteil von etwa 10% ausmachen. Zu nennen sind hier Melanozyten, Langerhanszellen und Merkelzellen. Die Melanozyten dienen der Produktion des Pigments Melanin. Melanin wird an die im *stratum basale* liegenden Keratinozyten weitergegeben, sodass diese ihr Erbgut vor Schäden durch UV-Strahlung schützen können. Die Melanozyten selbst sind nur schwach pigmentiert. Langerhanszellen stehen im Dienst des Immunsystems. Es handelt sich dabei um sogenannte Antigen-präsentierende Zellen, die Teil des mononuklär-phagozytären Systems sind. Die Merkelzellen sind Mechanorezeptoren der Haut, deren Hauptaufgabe die Wahrnehmung und Weiterleitung von Druckreizen ist (Lüllmann-Rauch, 2015).

Der Epidermis kommt ein großer Teil der oben genannten Funktion der Haut als Barriere zu, wobei einen bedeutenden Beitrag dazu wiederum die abgestorbenen Zellen im *stratum corneum*, die sogenannten Korneozyten, leisten. Außerdem bilden Zellen im *stratum granulosum* diverse Lipide, die in Lamellenkörpern gespeichert und in den Interzellulärraum abgegeben werden. Auf diese Weise kommt es zu einer Abdichtung der Epidermis, es entsteht eine wasserdichte Barriere, die einerseits das Eindringen von Wasser, andererseits auch eine Austrocknung verhindert. Von entscheidender Bedeutung für die Integrität der Hautbarriere sind vor allem auch Strukturen, die die Zellen untereinander fest verbinden, die sogenannten Zell-Zell-Kontakte, beispielsweise die Tight Junctions im *stratum granulosum* oder Desmosomen im *stratum spinosum* (Deller, 2018).

1.3 Zell-Zell-Kontakte der Keratinozyten

Zell-Zell-Kontakte sind entscheidend für die Funktion der Epidermis, allerdings ist ihr Vorkommen nicht auf die Epidermis begrenzt. Die meisten Zellen des menschlichen Körpers sind über diverse Arten von Zell-Zell-Kontakten miteinander verbunden. Eine Ausnahme hiervon stellen beispielsweise die Blutzellen dar. Zell-Zell-Kontakte dienen nicht nur der mechanischen Stabilisierung von Zellen untereinander und zur extrazellulären Matrix, sondern unter anderem auch zur interzellulären Kommunikation, und ermöglichen so eine koordinierte Differenzierung und Wanderung von Keratinozyten. Es können drei Hauptgruppen von Zell-Zell-Kontakten definiert werden: Kommunikationskontakte, Verschlusskontakte und Adhäsionskontakte (Haftkontakte). Bei letzteren können Adhärenskontakte und Desmosomen unterschieden werden. Je nach der zu erfüllenden Aufgabe unterscheiden sich die Zell-Zell-Kontakte hinsichtlich ihrer Morphologie und Proteinausstattung, dennoch ist allen Zell-Zell-Kontakten ein charakteristisches Bauprinzip gemein: Transmembranproteine, die intrazellulär am Zytoskelett verankert sind. Mithilfe dieser Transmembranproteine wird der Interzellulärspalt überbrückt und der Kontakt zu

Nachbarzellen hergestellt. Im Folgenden werden die Verschluss- sowie die Haftkontakte aufgrund ihrer Bedeutung für die vorliegende Arbeit genauer beschrieben.

1.3.1 Verschlusskontakte

Verschlusskontakte ermöglichen es, Diffusionsbarrieren und damit Räume von unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung zu bilden. Diese Verschlusskontakte kommen vor allem in ein- oder mehrschichtigen Epithelien sowie dem Endothel vor und bilden dort meist einen kleinen Gürtel (lat. Zonula) um die Zelle, weshalb die Bezeichnung als Zonula Occludens gebräuchlich ist. Die für Verschlusskontakte typischen Transmembranproteine sind Occludin sowie Claudine, die extrazellulär so eng miteinander verbunden sind, dass kein parazellulärer Stoffaustausch mehr möglich ist. Die Transmembranproteine sind mit dem Zytoskelett über Aktinfilamente unter Beteiligung von Adaptorproteinen verbunden. Es bildet sich auf diese Weise eine Plaque. Allerdings ist diese weit weniger stark ausgebildet als bei den Haftkontakten. Von Bedeutung ist, dass die Verschlusskontakte trotz der relativ diffusionsdichten Verbindung der Zellen miteinander nicht mechanisch stabil sind. Um die Verschlusskontakte zu sichern, ist es nötig, dass sie sich entweder in direkter Nachbarschaft zu Haftkontakten befinden oder aber, dass spezifische Haftproteine in die Verschlusskontakte integriert sind. Mit dieser Kenntnis lässt sich erklären, warum vor allem in Epithelien die Zellkontakte meist charakteristisch zum sogenannten epithelialen Schlussleistenkomplex angeordnet sind, der typischerweise von apikal nach basal aus der Zonula Occludens, der Zonula Adhaerens und den Desmosomen besteht (Deller, 2018; Niessen, 2007).

1.3.2 Haftkontakte

Bei den Haft- oder Adhäsionskontakten werden Adhärenskontakte und Desmosomen unterschieden. Hier liegt die Hauptaufgabe in einer mechanischen Verankerung der Zellen aneinander. Alle Haftkontakte sind aus drei Bestandteilen aufgebaut:

1. Transmembranproteine, 2. Plaqueproteine und 3. Bestandteile des Zytoskeletts.

Bei den Transmembranproteinen werden die Cadherine von den Integrinen abgegrenzt, wobei die Cadherine bei den Zell-Zell-, die Integrine dagegen bei den Zell-Matrix-Kontakten zu finden sind. Bedeutsam ist, dass es sich bei den Cadherinen um Ca^{2+} -abhängige Adhäsionsmoleküle handelt, was bedeutet, dass diese Proteine nur bei einer normalen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von etwa 1,3 mmol/l aneinanderbinden und so den Zell-Zell-Kontakt vermitteln (Deller, 2018; Lüllmann-Rauch, 2015).

Ultrastrukturell charakteristisch für Haftkontakte ist vor allem die Plaque, welche insbesondere bei den Desmosomen sehr deutlich ausgeprägt ist. Dabei handelt es sich um ein Konglomerat aus Plaqueproteinen, mit unterschiedlichen Funktionen wie Haftvermittlung zwischen Transmembranprotein und Zytoskelett oder Regulation dieser Haftvermittlung. Bei den Plaqueproteinen, die die Haftvermittlung bewirken, werden vor allem zwei Gruppen

unterschieden: Proteine der Armadillo-Familie, wie Plakoglobin und Plakophiline, sind mit dem intrazellulären Anteil der Transmembranproteine verbunden und weisen zudem eine Bindungsstelle für Adaptorproteine (zweite Gruppe), wie beispielsweise Proteine der Plakinfamilie oder bestimmte Catenine, auf, die wiederum mit dem Zytoskelett verbunden sind (Nekrasova & Green, 2013). Je nachdem an welchem Bestandteil des Zytoskeletts die Plaqueproteine verankert sind, werden zwei Arten von Adhäsionskontakten unterschieden, die Adhärens-Kontakte und die Desmosomen.

1.3.2.1 Adhärenskontakte

Die Adhärens-Kontakte kommen in den meisten Epithelien wie die Verschlusskontakte gürtelförmig vor und werden daher als Zonula Adhärens bezeichnet. Diese Zell-Zell-Kontakte sind an die Aktinfilamente des Zytoskeletts gekoppelt, wobei diese Ankopplung über Plaqueproteine erfolgt. Beispiele für solche Plaqueproteine sind α -, β - und γ -Catenin, Pro-Catenin und ZO-1. Die für Adhärens-Kontakte typischen Cadherine unterscheiden sich je nachdem, in welchem Gewebe die Kontakte vorliegen. So ist in Epithelien beispielsweise E-Cadherin (Epitheliales Cadherin) typisch, im Endothel dagegen VE-Cadherin (Vaskulär-Endotheliales Cadherin) und im Nervengewebe und auch in Herzmuskelzellen N-Cadherin (Gumbiner, 2005; Lüllmann-Rauch, 2015).

1.3.2.2 Desmosomen

Auch das Desmosom dient der mechanischen Verankerung von Zellen aneinander und ist für die Integrität der Haftung zwischen Zellen unabdingbar. Die erste lichtmikroskopische Beschreibung eines Desmosoms erfolgte bereits Mitte des 19. Jahrhunderts. Der Name Desmosom wurde von dem Wiener Anatom Josef Schaffer im frühen 20. Jahrhundert eingeführt und leitet sich von den griechischen Wörtern desmos für Bindung und soma für Körper ab (Waschke, 2008). Erst in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts gelang Keith Porter mithilfe der Elektronenmikroskopie die erste ultrastrukturelle Analyse eines Desmosoms (Delva, Tucker & Kowalczyk, 2009). Desmosomen weisen eine große Stabilität auf, auch starke pH-Schwankungen und der Einfluss vieler Lösungsmittel lösen den durch Desmosomen gebildeten Verbund nicht auf (Nekrasova & Green, 2013).

Pro Zelle kommen sehr viele der nur 0,3-0,5 μm großen Desmosomen vor. Sie verlaufen nicht gürtelförmig um die Zelle herum, sondern punktförmig, wie ein Fleck (lat. Macula) angeordnet, weshalb sie auch als Maculae Adhaerentes bezeichnet werden. Die für Desmosomen spezifischen Cadherine sind Desmogleine (Dsg), hier werden die Subtypen 1 bis 4 unterschieden, und Desmocolline (Dsc), bei denen man die Subtypen 1 bis 3 unterscheidet. Bei den Dsgs, Dscs und den klassischen Cadherinen ist fast ein Drittel der Aminosäuren homolog (Brooke, Nitoiu & Kelsell, 2012). Die extrazellulären Domänen der desmosomalen Cadherine interagieren in Abhängigkeit von Ca^{2+} miteinander, sodass es zu Haftung kommt.

Als ultrastrukturelles Korrelat dieser Interaktion kann die in der Elektronenmikroskopie sichtbare verdichtete Mittellinie angesehen werden, welche Mesophragma genannt wird (Thomason, Scothern, McHarg & Garrod, 2010). Zwischen den desmosomalen Cadherinen werden sowohl homophile, als auch heterophile Bindungen beobachtet (s. Abb. 1 A). Die Ankopplung an die Intermediärfilamente des Zytoskeletts erfolgt einerseits über Plaqueproteine der Armadillo-Proteinfamilie. Zu nennen sind hier Plakophilin (Pkp) und Plakoglobin (Pg), wobei letzteres auch in Adhärenskontakten zu finden ist. Allerdings erfolgt die Bindung an desmosomale Cadherine mit einer deutlich höheren Affinität als an E-Cadherin (Delva et al., 2009). Andererseits ist das desmosomenspezifische Adaptorprotein Desmoplakin (DP) als ein Vertreter der Plakinproteinfamilie typisch. Die intrazelluläre Plaque, welche für die Haftkontakte charakteristisch ist und durch die Ankoppelung der Transmembranproteine an das Zytoskelett über die eben beschriebenen Plaqueproteine zustande kommt, ist beim Desmosom besonders stark ausgeprägt. In der Elektronenmikroskopie ist die Unterscheidung einer inneren Membranplaque (IMP) und einer äußeren elektronendichten Membranplaque (ÄMP) möglich (s. Abb. 1B). Die äußere Plaque kommt durch die Interaktionen der intrazellulär liegenden Anteile der desmosomalen Cadherine mit den Plaqueproteinen zustande, die innere Plaque entsteht durch die Interaktion der Plaqueproteine mit den Intermediärefilamenten (Kowalczyk et al., 1994).

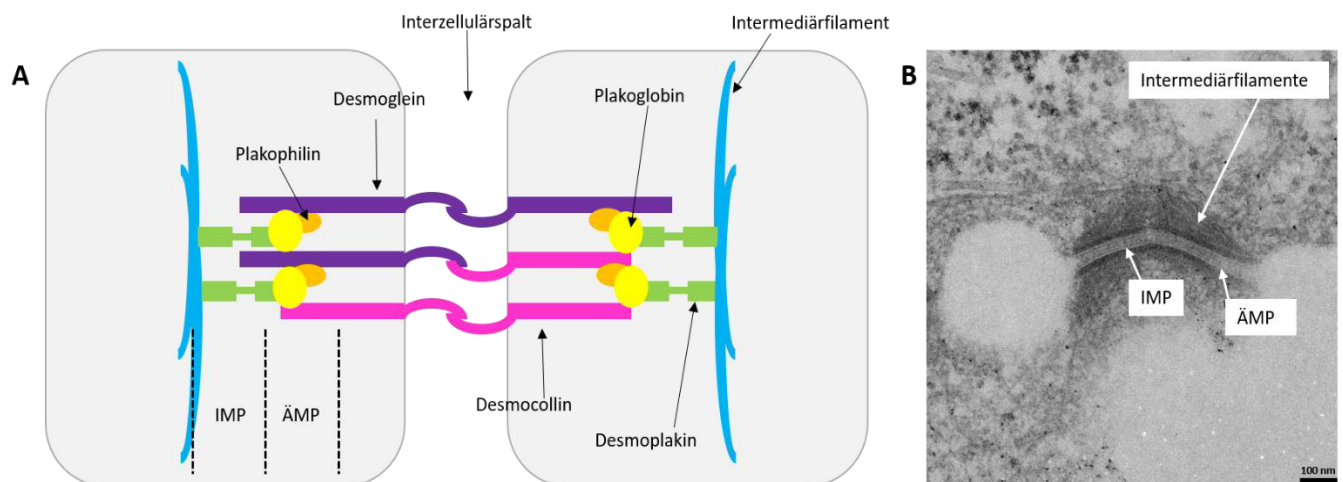


Abbildung 1: Schematische (A; nach (Waschke & Spindler, 2014)) und elektronenmikroskopische (B) Darstellung eines Desmosoms.

In der Mitte des Interzellulärspaltes interagieren die desmosomalen Cadherine miteinander. Im Bereich der äußeren Membranplaque (ÄMP) kommt es zur Interaktion der desmosomalen Cadherine mit den Plaqueproteinen Pg und Pkp. Die Ankopplung an die Intermediärfilamente wird über DP gewährleistet, dieser Bereich wird innere Membranplaque (IMP) genannt (A). In der elektronenmikroskopischen Aufnahme kann man die schematisch in A dargestellten innere und äußere Membranplaque erkennen. Zudem ist die Insertion der Intermediärfilamente am Desmosom sichtbar; Maßstabsleiste 100 nm (B).

Je nachdem in welchem Gewebe die Desmosomen vorliegen, finden sich auch andere Vertreter der desmosomalen Cadherine. In einfachen Epithelien wie beispielsweise dem des Gastro-Intestinal-Traktes und auch im Herzmuskel sind Dsg2 und Dsc2 die einzigen vorkommenden desmosomalen Cadherine. In der Epidermis dagegen treten alle oben genannten Isoformen auf (Hartlieb, Rötzer, Radeva, Spindler & Waschke, 2014; Nekrasova & Green, 2013). Für die Epidermis ist zu beachten, dass sich die Expression der desmosomalen Cadherine in den einzelnen Schichten unterscheidet (s. Abb. 2). Die herausragende Bedeutung von Desmosomen zeigt sich beispielsweise bei der Erkrankung Pemphigus. Besonders bedeutsam für das Verständnis der Pathogenese der unterschiedlichen Pemphigus-Subtypen ist, dass in der Epidermis Dsg3 vor allem in den basalen Schichten vorkommt, wohingegen Dsg1 vor allem in den oberflächlichen Schichten exprimiert wird (Green & Simpson, 2007).

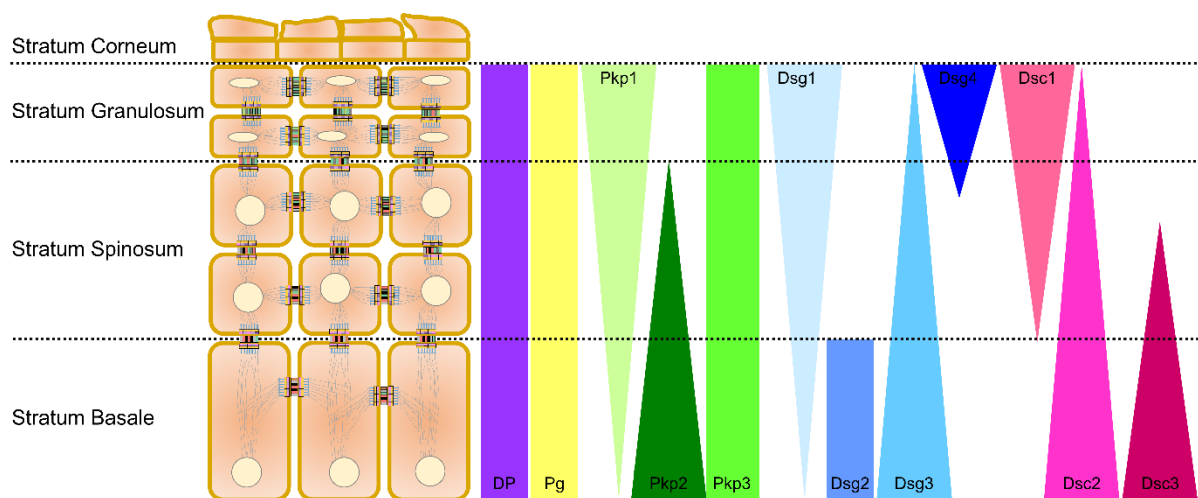


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Verteilung der desmosomalen Cadherine in der Epidermis (Egu, Schmitt & Waschke, 2022).

Deutlich erkennbar ist die vorher beschriebene unterschiedliche Verteilung der desmosomalen Cadherine in den einzelnen Hautschichten: Dsg3 dominiert basal, Dsg1 ist überwiegend superfizial zu finden. Wie in allen Epithelien sind auch Dsg2 und Dsc2 zu finden, deren Vorkommen beschränkt sich allerdings auf tiefere Schichten der Epidermis und auf Haarfollikel (speziell Dsg2) (Hartlieb, Kempf, Partilla, Vigh, Spindler & Waschke, 2013).

Die Haftkontakte zwischen Zellen sind keine statischen Gebilde, sondern im Gegenteil einem ständigen Auf- und Abbau unterworfen. Das ergibt sich aus der Notwendigkeit, dass Zellen in bestimmten physiologischen Gegebenheiten, wie zum Beispiel während der Embryonalentwicklung, der Ausdifferenzierung und auch bei der Wundheilung, wandern müssen. Viele Tumorzellen weisen Mutationen in den Genen für Zell-Kontaktproteine auf, womit die Fähigkeit zur Auflösung und Neubildung von Zell-Kontakten, also zur Zellwanderung, einhergeht und somit Metastasierung ermöglicht wird.

Eine Besonderheit der Desmosomen ist, dass sie in der Lage sind, zwischen zwei unterschiedlich stark adhäsiven Zuständen hin- und her zu wechseln, je nachdem, wie groß

der mechanische Stress ist, dem das Gewebe ausgesetzt ist. Der schwächer adhäsive Zustand ist dabei Calcium (Ca^{2+})-abhängig und wird beispielsweise während der Wundheilung eingenommen. Während der desmosomalen Reifung dagegen tritt zudem ein Zustand besonders stabiler Haftung auf, welcher Ca^{2+} -unabhängig ist. Dieser Zustand wird als Hyperadhäsion bezeichnet (Garrod & Kimura, 2008). Tatsächlich befindet sich wohl ein Großteil der Desmosomen im hyperadhäsiven Zustand, wenn die Epidermis intakt ist (Kimura, Merritt & Garrod, 2007). Für die Ca^{2+} -Unabhängigkeit der Desmosomen scheint dabei vor allem Dsg3 relevant zu sein, welches in hyperadhäsivem Zustand dazu tendiert, große Oligomere zu bilden, wohingegen Dsg1 kaum beteiligt zu sein scheint (Fuchs et al., 2020). Molekular geht die Hyperadhäsion mit einer Dephosphorylierung von Desmoplakin einher, bewirkt durch die Hemmung der Proteinkinase C (PKC) (Schmitt & Waschke, 2021).

1.4 Zytoskelett der Keratinozyten

Das Zytoskelett durchspannt die Zelle vom Zellkern bis zur Plasmamembran und besteht aus verschiedenen Arten von Filamenten. Es dient einerseits der Stabilität und Formgebung der Zelle (Aktin- und Intermediärfilamente), andererseits auch dem intrazellulären Transport (Mikrotubulsystem). Anders als der Begriff Skelett es vermuten lässt, handelt es sich bei dem Zytoskelett nicht um ein starres Gebilde, sondern um ein in ständigem Auf- und Abbau befindliches Proteinnetzwerk. Der Begriff wurde 1931 durch den Embryologen Paul Wintrebert geprägt. Zusätzlich zu den Filamenten gibt es zahlreiche Begleitproteine, wie beispielsweise Motorproteine, die für die Funktionen des Zytoskeletts unerlässlich sind (Lüllmann-Rauch, 2015).

1.4.1 Aktinfilamente und deren Begleitproteine

1.4.1.1 Aktin

Die Aktinfilamente sind mit etwa 7 nm Durchmesser die kleinsten Filamente des Zytoskeletts und werden daher auch als Mikrofilamente bezeichnet. Das fibrilläre F-Aktin entsteht dadurch, dass globuläres G-Aktin unter ATP-Verbrauch polymerisiert. Dabei besteht F-Aktin aus zwei polymerisierten G-Aktin-Ketten, welche sich umeinanderwinden. F-Aktin ist ein helikales Protein. Die Aktinfilamente sind polar, sie weisen also ein Plus- und ein Minus-Ende auf. Nach der Polymerisation werden die F-Aktin-Filamente teilweise posttranslational modifiziert, wodurch insbesondere die Stabilität erhöht werden kann (Lichti, Anders & Yuspa, 2008). Die Hauptaufgabe der Aktinfilamente ist die Stabilisierung der Zelle; so geben sie zum Beispiel auch den Mikrovilli, oberflächenvergrößernden Ausstülpungen der Zellmembran, die Form. Sie inserieren an bestimmten Adhäsionskontakten, den Adhärensjunktionen (AJ). Das Aktinzytoskelett ist mit dem Motorprotein Myosin assoziiert. Durch Interaktion dieser beiden Proteine wird einerseits Kurzstreckentransport beispielsweise von Vesikeln innerhalb der Zelle, andererseits auch die Kontraktion der Muskulatur ermöglicht (Lüllmann-Rauch, 2015). Das Aktinskelett verfügt über zahlreiche Begleitproteine, die unter anderem den Auf- und

Abbau regulieren oder die Filamente untereinander oder mit anderen Proteinen vernetzen (Lichti et al., 2008). Diese Proteine werden als aktinbindende Proteine bezeichnet. Hierzu zählen beispielsweise Actinin und Cortactin.

1.4.1.2 Das aktinbindende Protein Cortactin

Eines der aktinbindenden Proteine mit besonderer Bedeutung für die vorliegende Arbeit ist Cortactin (Cttn). Bei Cortactin handelt es sich um ein zytosolisches Protein, das teilweise mit dem Aktin-Zytoskelett assoziiert ist und dessen Assemblierung modifiziert. Seine Hauptaufgabe besteht dabei in der Rekrutierung des Arp2/3-Komplexes (Actin related protein 2/3 complex), und es leitet somit den initialen Schritt der Aktinpolymerisation ein (Daly, 2004).

Zudem spielt Cortactin eine wichtige Rolle für zahlreiche Zellfunktionen wie Zellmigration, Regulation von Proteinen in der extrazellulären Matrix sowie Zellkontraktilität. Cortactin kann auf verschiedene Arten interkonvertiert werden, wie durch Phosphorylierung oder Acetylierung (Schnoor, Stradal & Rottner, 2018). Durch die Phosphorylierung kommt es zur Aktivierung von Cortactin und damit zu einer Rekrutierung des oben genannten Arp2/3-Komplexes. Diese Aktivierung kann durch verschiedene Kinasen erreicht werden, ein Hauptaktivator von Cortactin ist die Tyrosinkinase Src, welche Cortactin an den Stellen Tyr421, Tyr466 und Tyr482 phosphoryliert. Die Phosphorylierungsstelle Tyr421 ist diejenige, welche unter physiologischer Ca^{2+} -Konzentration nachweisbar ist, also in dem Zustand, in welchem auch eine Kolo-kalisation und Interaktion von Cortactin und Dsg3 nachweisbar ist (Kugelman et al., 2019b).

1.4.2 Intermediärfilamente

Die Bezeichnung Intermediärfilament leitet sich davon ab, dass diese Proteinfilamentgruppe bezüglich ihres Durchmessers mit etwa 10 nm zwischen den Aktinfilamenten und den Mikrotubuli liegt. Je nach Art des Gewebes unterscheiden sich die vorkommenden Intermediärfilamente. Typische Zuordnungen von Gewebe und entsprechend vorkommendem Intermediärfilament sind: Epidermis-Zytokeratin; Muskulatur-Desmin, Binde- und Stützgewebe-Vimentin. Die Intermediärfilamente sind die Bestandteile des Zytoskeletts, die in die Desmosomen inserieren (Lüllmann-Rauch, 2015).

1.5 Pemphigus

Bei der Hautkrankheit Pemphigus handelt es sich um eine potentiell lebensbedrohliche Autoimmunkrankheit, deren Pathomechanismus auf der Behinderung der Zellhaftung durch die Desmosomen beruht. Es kommt dabei zur Bildung von intraepidermalen Blasen und zu Hauterosionen, welche die Integrität der Haut und damit ihre für den Menschen lebenswichtigen Funktionen stören. Daher kommt auch der Name der Erkrankung, denn

Pemphigus leitet sich vom griechischen Wort für Blase pemphix ab (Kasperkiewicz et al., 2017). Die Inzidenz beträgt im Mittel 0,68 pro 100 000 Personenjahre im Vereinigten Königreich (England) (Beckman, Waern, Gustafson & Skoog, 2008). Die Krankheit scheint Frauen häufiger zu treffen als Männer (Kridin & Schmidt, 2021). In den letzten Jahren konnte tendenziell ein vermehrtes Auftreten von Pemphigus festgestellt werden. Auch wenn keine klare Altersprävalenz zu erkennen ist, kann gesagt werden, dass Pemphigus vermehrt in der zweiten Lebenshälfte auftritt (Beckman et al., 2008). Für Pemphigus vulgaris (zu dieser Unterform s. 1.5.1) wird eine genetische Prädisposition beschrieben (Costan, Popa, Hâncu, Porumb-Andrese & Toader, 2021).

1.5.1 Klinik und Unterformen

Die beim Pemphigus gebildeten Autoantikörper richten sich gegen Bestandteile der Desmosomen und dabei vorwiegend gegen desmosomale Cadherine. Auch wenn zahlreiche Varianten der Antikörperprofile bei Patienten bekannt sind, spielen Antikörper gegen Dsg1 und 3 die größte Rolle. Die Bedeutung vieler anderer Autoantikörper ist bis heute nicht vollständig verstanden. Anhand der vorkommenden Antikörper lässt sich der Pemphigus in zwei Unterformen unterteilen.

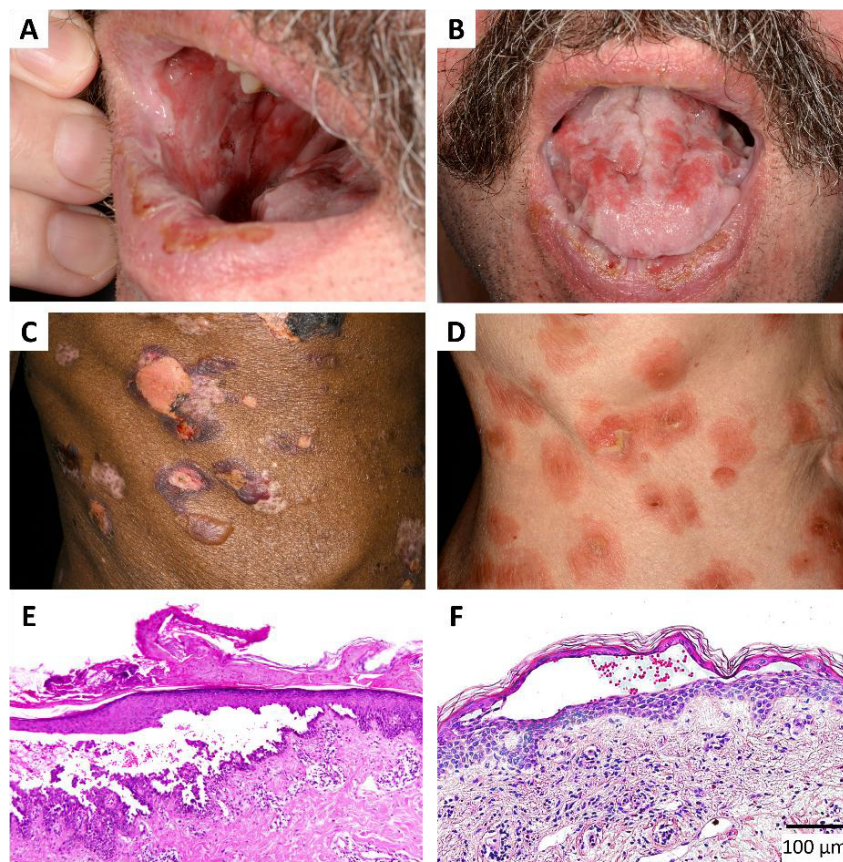


Abb. 3: Klinische und histologische Bilder der unterschiedlichen Pemphigusformen (Egu et al., 2022).

Bei auf die Schleimhaut beschränktem Pemphigus vulgaris (mucosaler Pemphigus vulgaris, mPV) treten schmerzhafte Erosionen der Schleimhaut häufig vor allem im Bereich der Mundhöhle auf (**A, B**). Bei mucocutanem Pemphigus vulgaris (mcPV) finden sich die Erosionen zudem auf der Epidermis (**C**). Auch beim Pemphigus foliaceus kommt es zur Bildung von Erosionen der Epidermis, häufig vor allem des Körperstammes; allerdings treten hier keine Schleimhautläsionen auf (**D**). Bei dem mucocutanem Pemphigus vulgaris erfolgt die Blasenbildung in der Epidermis suprabasal (**E**). Bei Pemphigus foliaceus dagegen kommt es in weiter oberflächlich gelegenen Schichten der Epidermis zur Spaltbildung (**F**); (Maßstabsleiste 100 µm).

Bei dem häufigeren Pemphigus vulgaris treten Antikörper sowohl gegen Dsg3 als auch gegen Dsg1 auf. Meist manifestiert sich diese Erkrankung zunächst im Bereich der oralen Mucosa, in dieser Phase dominieren Antikörper gegen Dsg3 (s. Abb. 3A, B). Auch in der meist später folgenden Phase, in der die gesamte Epidermis betroffen ist (s. Abb. 3C), bilden sich die typischen Blasen sehr tief in der Epidermis, knapp über dem *stratum basale* (s. Abb. 3E). Da Dsg1 und 3 in der Epidermis eine spezifische Verteilung aufweisen und dabei Dsg1 vor allem superfizial, Dsg3 dagegen vor allem basal exprimiert ist, kann davon ausgegangen werden, dass bei PV die Antikörper gegen Dsg3 und Dsg1 das Krankheitsbild verursachen (Kasperkiewicz et al., 2017).

Bei der zweiten Unterform, Pemphigus foliaceus (PF), dagegen kommen keine Antikörper gegen Dsg3 vor, hier sind die Dsg1-Antikörper entscheidend (Kasperkiewicz et al., 2017). Entsprechend weist diese Erscheinungsform auch keine Schleimhautbeteiligung auf, denn in der Schleimhaut kommt Dsg1 nur in sehr geringem Maße vor. Zudem liegen die in der Epidermis entstehenden Blasen typischerweise im sehr oberflächlichen Bereich, meistens im *stratum granulosum* oder *spinosum* (Spindler & Waschke, 2018) (s. Abb. 3D, F). Neben dieser sogenannten monopathogenen Theorie, bei der allein durch die anti-Desmoglein-Antikörper-Bindung die Lokalisation der Blasenbildung erklärt wird, gibt es auch die multipathogene Theorie. Diese geht davon aus, dass die suprabasale Blasenbildung bei PV durch das Zusammenspiel auch der Nicht-Desmoglein-Antikörper entsteht und es somit je nach Antikörperprofil des Patienten unterschiedliche klinische Bilder gibt (Ivars, España, Alzuguren, Pelacho, Lasarte & López-Zabalza, 2020).

Ultrastrukturell ist das eindeutigste und früheste Zeichen bei beiden Pemphigus-Unterformen eine Retraktion der am Desmosom inserierenden Keratin-Filamente. Zudem zeigt sich bei beiden Pemphigus-Unterformen eine Reduktion der Desmosomenzahl; die Desmosomengröße dagegen ist nur verändert, wenn Antikörper gegen Dsg1 vorliegen (Spindler & Waschke, 2018).

Bis heute gibt es für diese bedrohliche Autoimmunkrankheit keine kausale Therapie. Meist erfolgt eine teilweise Unterdrückung des Immunsystems mit Glukokortikoiden, welche

allerdings mit zahlreichen Nebenwirkungen assoziiert ist. Alternativ besteht die Möglichkeit einer Antikörpertherapie. Als Präparat kann hier Rituximab angewendet werden. Das ist ein monoklonaler Antikörper, der gegen CD20 von Prä-B-Lymphozyten gerichtet ist und auf diese Weise den Autoantikörperspiegel absenken kann (Hertl et al., 2008; Shimanovich, Nitschke, Rose, Grabbe & Zillikens, 2008).

1.5.2 Pathophysiologie des Pemphigus

Auch heute noch ist der genaue Pathomechanismus des Pemphigus nicht vollständig verstanden. Es gibt allerdings verschiedene Theorien und Erklärungsansätze für den Zelladhäsionsverlust, der durch die von Pemphiguspatienten produzierten Autoantikörper verursacht wird.

Zum einen ist hier die Hypothese der sterischen Inhibition zu nennen. Diese Theorie führt den Haftungsverlust der Zellen darauf zurück, dass Antikörper an die desmosomalen Cadherine binden und so direkt eine Interaktion dieser verhindern, wobei sowohl homophile Bindungen (zwischen gleichen Typen von desmosomalen Cadherinen), als auch heterophile Bindungen (zwischen unterschiedlichen Typen von desmosomalen Cadherinen) von Bedeutung sind. Als ultrastrukturelle Entsprechung für diese gestörten Proteininteraktionen können Split-Desmosomen verstanden werden (Ishii, Yoshida, Stanley, Yamagami, Amagai & Ishiko, 2020; Spindler & Waschke, 2018).

Mit der Theorie der sterischen Inhibition allein lässt sich allerdings das Krankheitsbild des Pemphigus nicht vollständig erklären (Spindler & Waschke, 2018). Beispielsweise lässt sich durch die direkte Inhibition der Desmoglein-Interaktionen allein nicht verstehen, warum es zu einer verringerten Anzahl von Desmosomen kommt und teilweise eine Reduktion der Desmosomengröße festzustellen ist. Dementsprechend wird heute davon ausgegangen, dass durch die Antikörperbindung Signaltransduktionsmechanismen in Gang gesetzt werden, welche die Reduktion der desmosomalen Komponenten durch behinderte Assemblierung sowie durch geförderte Dissemblierung von Desmosomen bewirken (Egu et al., 2022). Für die Signaltransduktions-Mechanismen scheinen vor allem extradesmosomale Dsg1- und Dsg3-Moleküle eine große Rolle zu spielen (Egu et al., 2022; Waschke & Spindler, 2014).

1.5.3 Zu untersuchende Signalwege

Im Rahmen der Forschung der letzten Jahre sind bereits zahlreiche für die Pathogenese des Pemphigus bedeutende Signalwege gefunden und näher charakterisiert worden. Hierzu zählt beispielsweise p38MAP-Kinase (p38 Mitogen-activated-protein-kinase) (Berkowitz et al., 2005). Wird p38MAP-Kinase aktiviert, zum Beispiel induziert durch Autoantikörper wie bei PV, kommt es zu einer Internalisierung von Dsg3 und zu einer Retraktion der Keratinfilamente. Dies ist ein typisches ultrastrukturelles Kennzeichen von PV (Spindler & Waschke, 2018).

Dennoch ist die Gesamtheit der Signalwege, welche bei Pemphigus-Erkrankungen eine Rolle spielt, so mannigfaltig, dass bei Weitem noch nicht alle vollständig entschlüsselt sind. Diese Signalwege sind Gegenstand vieler Forschungen, denn ihr Verständnis ist von großer Bedeutung für die Etablierung gezielter Behandlungsansätze.

Im Folgenden werden nun einige Signalproteine, fokussiert auf ihre Bedeutung für die vorliegende Arbeit, näher erläutert. Bei diesen handelt es sich um Enzyme oder deren Substrate, Rezeptoren oder deren Liganden wie auch um Haftproteine, die im Zusammenspiel miteinander die Integrität von Haftkontakten gezielt steuern und diese auch auflösen können.

1.5.3.1 Sheddasen ADAM10 und ADAM17

Bedeutende Destabilisatoren für die Zelladhäsion sind die Enzyme ADAM10 und ADAM17. Die Abkürzung *ADAM* steht dabei für A Disintegrin And Metalloproteinase. Bei diesen Enzymen handelt es sich um integrale Membranproteine, deren C-Terminus auf der intrazellulären Seite der Plasmamembran liegt. Die ADAMs werden aktiviert, indem eine extrazellulär am N-Terminus liegende Prodomäne abgespalten wird. Für die Funktion der ADAMs ist als Cofaktor ein Zink-Ion nötig. Bisher sind über 30 Varianten der ADAMs bekannt geworden (Edwards, Handsley & Pennington, 2008).

Die ADAMs spielen eine zentrale Rolle in vielen zellbiologischen Vorgängen, wie beispielsweise Zellmigration und Zelladhäsion. Bei einigen der Untertypen handelt es sich um sogenannte Sheddasen, also Enzyme, die andere Proteine gezielt spalten, gewissermaßen zuschneiden, und so der korrekten Funktion zuordnen (Edwards et al., 2008). Beispiele für solche Proteine sind Liganden des Epidermalen-Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR), wie der Epidermale-Wachstumsfaktor (EGF), oder auch Betacellulin, aber auch Zelladhäsionsproteine wie Desmogleine (Cirillo & Prime, 2021; Ivars et al., 2020).

Die Rolle der ADAMs für die Pathogenese der Autoimmunerkrankung Pemphigus ist jedoch noch nicht vollständig verstanden. Besonders bedeutsam ist dabei die Unterform ADAM10 als der dominierende Vertreter der ADAM-Proteinfamilie in der Haut (Green & Simpson, 2007). Außerdem scheint auch ADAM17 von Bedeutung zu sein, da dieses Enzym essentiell für die Entwicklung von Epithelien und maßgeblich an der Spaltung von EGFR-Liganden beteiligt ist (Edwards et al., 2008). ADAM10 und ADAM17 haben sogar teilweise die gleichen Liganden, ein Beispiel hierfür ist das Zelladhäsionsprotein Dsg 2 (Edwards et al., 2008; Reiss & Saftig, 2009). Es konnte nachgewiesen werden, dass ADAM10 durch Patientenseren, die Antikörper gegen Dsg1 und 3 enthalten, aktiviert wird, und es ebenfalls zu einem Anstieg der Konzentration der EGFR-Liganden und einer EGFR-Aktivierung kommt (s. Abb. 4). Antikörper gegen Dsc3 aktivieren ADAM10 dagegen nicht. Dabei ist die Aktivierung von ADAM10 abhängig von der Kinase Src (sarcoma associated kinase) (Ivars et al., 2020). Zudem konnte festgestellt werden, dass die Aktivierung von ADAM10 nötig war, um eine Blaseninduktion zu erreichen. Die Ursache hierfür kann einerseits die Spaltung von Dsg-Molekülen, andererseits aber auch die Aktivierung von EGFR sein. Umgekehrt konnte im Tierexperiment die durch PV-

Injektion hervorgerufene Blasenbildung verhindert werden, wenn ADAM10-Inhibitoren verwendet wurden (Cirillo & Prime, 2021; Ivars et al., 2020).

1.5.3.2 EGFR und seine Liganden

Bei dem epithelialen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) handelt es sich um einen Transmembranrezeptor, der zur ErbB-Familie gehört, einer Familie strukturell eng verwandter Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (Sigismund, Avanzato & Lanzetti, 2018). EGFR ist einer der zuerst entdeckten Wachstumsfaktoren (Voldborg, Damstrup, Spang-Thomsen & Poulsen, 1997). Der Rezeptor liegt mit einer Domäne in der Zellmembran und weist intrazellulär eine ATP-Bindungsstelle auf. Die Aktivierung von EGFR erfolgt durch extrazelluläre Bindung von Liganden wie EGF und resultiert in einer Rezeptordimerisierung mit entsprechender Signalkaskade im Zellinneren (Arteaga, Ramsey, Shawver & Guyer, 1997). Zudem ist es auch möglich, dass EGFR ohne Bindung von Liganden zum Beispiel über die Phosphorylierung an Tyrosin 845 durch das Enzym Src aktiviert wird (Schmitt, Hudemann, Moztaizadeh, Hertl, Tikkanen & Waschke, 2023; Walter et al., 2019).

Die Funktionen von EGFR im Allgemeinen und speziell in der Haut sind zahlreich und umfassen unter anderem die Gewebsproliferation sowie die Regulation des Zellzyklus. Zudem ist als Reaktion auf eine EGFR-Aktivierung auch die Regulation von Haftkontakten in der Epidermis möglich, denn EGFR ist beispielsweise für eine Phosphorylierung von β -Catenin verantwortlich (Miravet et al., 2003) und interagiert mit Dsg1 (Green, Niessen, Rübsam, Perez White & Broussard, 2022). Es wurde gezeigt, dass eine Inhibition von EGFR zu einer verbesserten Keratinozyten-Adhäsion führt (Bektas, Jolly, Berkowitz, Amagai & Rubenstein, 2013; Egu et al., 2024; Walter et al., 2019).

Durch die bei Pemphigus vorliegenden Autoantikörper kann es zu einer Aktivierung von EGFR und damit zu einem Adhäsionsverlust kommen (Chernyavsky, Arredondo, Kitajima, Sato-Nagai & Grando, 2007; Walter et al., 2019). Diese EGFR-Aktivierung ist dabei abhängig von der vorherigen Aktivierung der oben erwähnten p38MAP-Kinase (Bektas et al., 2013). An der Modulation der EGFR-Aktivität sind zudem die eben beschriebenen ADAMs entscheidend beteiligt (Ivars et al., 2020).

1.5.3.3 Erk1/2

Bei der Proteinfamilie der Erks (Extracellular-signal Regulated Kinase) handelt es sich um eine Proteinfamilie der Serin-Threonin-Proteinkinase, die zu den MAP-Kinasen gehören. Zu den Signalwegen, die durch diese Proteinkinasen kontrolliert werden, zählen unter anderem Proliferation und Differenzierung sowie Modulation von Transkription und Translation (Lake, Corrêa & Müller, 2016). Die „Erks“ sind aber auch in Prozesse der Zelladhäsion und der Organisation des Zytoskeletts, vor allem des Aktin-Skeletts, eingebunden (Barros & Marshall,

2005). Erwähnenswert ist, dass die „Erks“ sehr viele verschiedene Substrate adressieren, die für Enzyme typische Substratspezifität also gering ausgeprägt ist (Roskoski, 2012).

Besonders die Subtypen 1 und 2 der Erk-Familie (Erk1/2) scheinen für die Pathogenese von PV und auch PF eine Rolle zu spielen, denn es wurde eine Aktivierung dieser Kinasen durch von Pemphigus-Patienten gewonnene Antikörper beobachtet. Diese Aktivierung war allerdings vom Antikörperprofil der Patienten abhängig und ließ sich nur beobachten, wenn Antikörper gegen Dsg1 vorhanden waren (Walter et al., 2019). Wie genau Erk1/2 mit Dsg1 interagieren ist allerdings bis heute noch nicht vollständig verstanden (Abb.4). Allerdings scheint eine Interaktion vorzuliegen, wie mit Bio-ID nachgewiesen wurde (Hegazy et al., 2022).

2 Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die vorstehende Beschreibung des Zusammenwirkens der untersuchten Signalwege zeigt, dass die Wirkung und das Zusammenspiel der verschiedenen Signalproteine noch nicht vollständig verstanden sind. Das Ziel dieser Doktorarbeit ist es, einen Teil dieser Mechanismen näher zu betrachten, vor allem bezüglich der Bedeutung der beschriebenen Signalproteine für eine integrale Zellhaftung. So soll ein Beitrag zu einem besseren Verständnis der Pathogenese des Pemphigus geleistet werden, damit zukünftig spezifischere Therapien möglich werden.

Es ist zwar bereits bekannt, dass es durch PV-IgG zu einer Aktivierung von ADAM10, also dem für die Haut besonders bedeutsamen ADAM-Subtyp, kommt. Umgekehrt weiß man, dass eine Inhibition von ADAM10 im Tierexperiment eine PV-IgG-induzierte Blasenbildung verhindern kann (Ivars et al., 2020). Ebenfalls wurde festgestellt, dass gleichzeitig mit der ADAM10-Aktivierung auch ein Anstieg von EGFR-Liganden und eine EGFR-Aktivierung auftreten (Ivars et al., 2020). Welche weiteren durch ADAM10 aktivierten Signalwege für diesen Zellhaftungsverlust verantwortlich sind und welche Beteiligung EGFR hieran hat, ist allerdings noch nicht vollständig geklärt; die vorliegende Arbeit soll diesbezüglich einen kleinen Beitrag zur Klärung leisten.

Um die Bedeutung der ADAMs für PV besser zu verstehen, ist es hilfreich, zunächst zu klären, welche Effekte eine ADAM-Inhibition unter basalen Bedingungen hat. Dafür wurden sowohl ADAM10 als auch ADAM17 inhibiert. ADAM17 wurde gewählt, weil dieser Subtyp bedeutsam für die Entwicklung von Epithelien wie der Haut ist (Edwards et al., 2008). Folglich war zu untersuchen, ob es zu vermehrter oder verminderter Aktivierung von EGFR und zu Veränderungen in Menge und Verteilung der desmosomalen Cadherine Dsg1 und Dsg3 kommt. Dabei wurden drei verschiedene Keratinozyten-Linien, sowohl murine als auch humane, verwendet. Da die HaCaT-Linie allerdings die Konditionen in der Epidermis des Menschen aufgrund der Immortalisation nur bedingt widerspiegeln kann, wurden zudem primäre NHEK-Zellen (NHEK=normale epidermale Keratinozyten) verwendet. Die murine MEK-Zelllinie (MEK=murine epidermale Keratinozyten) war immortalisiert.

Des Weiteren ist es für das exaktere Verständnis der Pathogenese von PV in Zusammenhang mit den ADAMs von Bedeutung, durch welche Autoantikörper genau eine ADAM-Aktivierung hervorgerufen wird. Deshalb war es Gegenstand dieser Arbeit, zu untersuchen, ob eine Aktivierung der ADAMs durch das mir zur Verfügung stehende Pemphigus-Patienten-Serum erfolgt und ob ein Zusammenhang zu bestimmten Antikörpern feststellbar ist. Daher lag die Frage nahe, ob auch monoklonale Antikörper wie der Dsg3-spezifische Antikörper AK23 eine ADAM-Aktivierung hervorrufen können.

Der Zusammenhang von ADAM10 und Src wurde bereits untersucht, und es zeigte sich dabei, dass die ADAM10-Aktivierung abhängig von Src ist (Ivars et al., 2020). Src ist, wie bereits festgestellt, an der Pathogenese von Pemphigus beteiligt, wobei das aktinbindende Protein Cortactin, ein Substrat von Src, eine Rolle spielt (Kugelman et al., 2019b). So konnte insbesondere festgestellt werden, dass in Abwesenheit von Cortactin nicht nur die basale Zelladhäsion herabgesetzt ist, sondern auch eine durch AK23 hervorgerufene Zellverbund-Fragmentierung durch Src-Inhibition nicht signifikant verringert wird, wohingegen das bei Vorhandensein von Cortactin der Fall ist (Kugelman et al., 2019b).

Im Hinblick darauf war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die Rolle von Cortactin genauer zu untersuchen und einerseits herauszufinden, warum es beim Fehlen von Cortactin zu einer deutlich herabgesetzten Zelladhäsion kommt. Andererseits sollte untersucht werden, inwieweit Cortactin speziell Dsg3 beeinflusst, ein Protein, das entscheidend für die Integrität von Desmosomen ist und mit dem Cortactin an den Zellgrenzen kolokalisiert ist (Kugelman et al., 2019b). Als Modell wurden hierfür murine Zellen verwendet, die vollständig Cortactin-depletiert waren, als Kontrolle dienten entsprechende Wildtyp-Zellen.

Für eine Zusammenfassung und Visualisierung der in der vorliegenden Arbeit zu klärenden Fragen wird auf Abb. 4 verwiesen

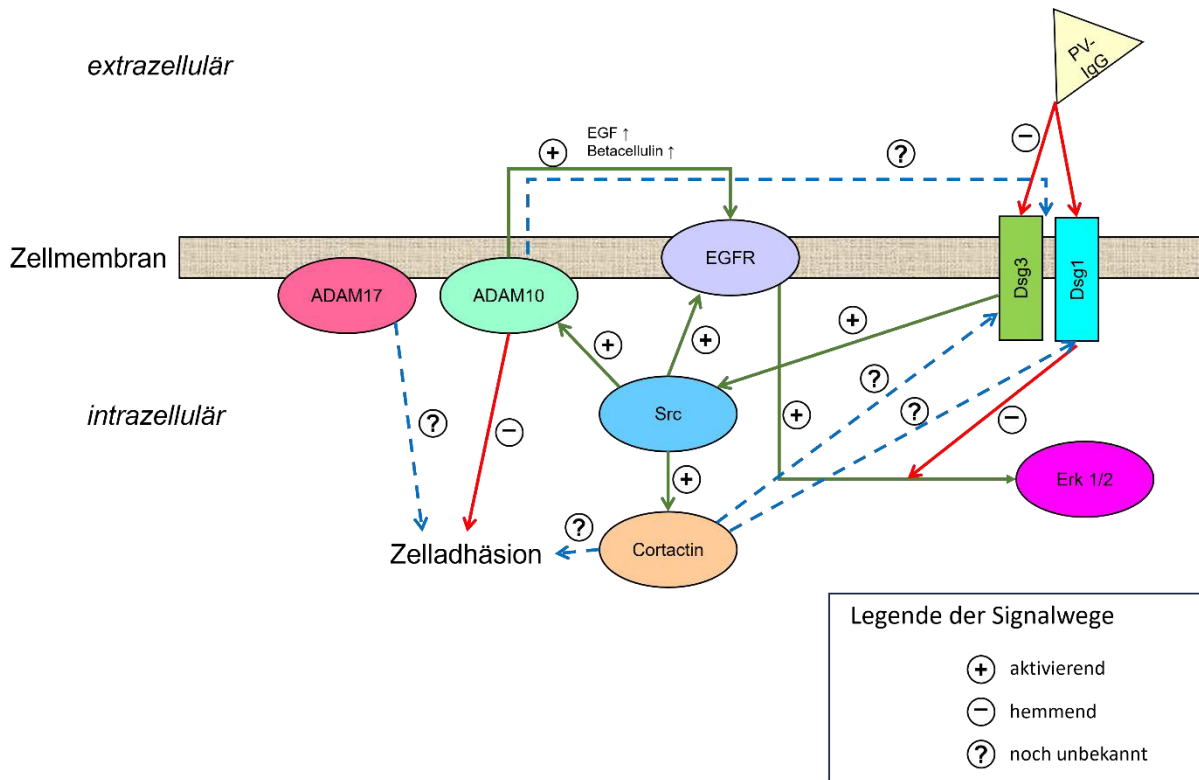


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Signalwege, die zum Verständnis dieser Arbeit von Bedeutung sind.

Durch das Vorhandensein von Autoantikörpern bei PV (z.B. anti-Dsg1 oder nur anti-Dsg3) kommt es zu Interaktionen mit diversen Proteinen: Die Antikörper binden an die in der Zellmembran befindlichen desmosomalen Cadherine, wodurch einerseits die direkte Interaktion mit desmosomalen Cadherinen benachbarter Zellen gestört wird. Andererseits führen die Antikörper auch zur Aktivierung oder Deaktivierung verschiedener Signalproteine, die wiederum direkt oder indirekt die Zellhaftung beeinflussen: So kommt es bei PV zu einer Aktivierung von ADAM10 mit daraus resultierendem Zellhaftungsverlust. Welche Rolle ADAM17 dabei spielt, ist noch unklar. ADAM10 und Cortactin werden beide von Src aktiviert. Ebenfalls ist noch zu untersuchen, wie Cortactin mit den desmosomalen Cadherinen zusammenwirkt und welche Auswirkungen dieses Aktin-bindende Protein auf die Zellhaftung hat. Ein zentrales Signalprotein ist zudem EGFR, welcher durch Ligandenbindung oder enzymatische Reaktionen aktiviert werden kann. Eine EGFR-Aktivierung kann unter anderem als Folge einer vermehrten ADAM10-Aktivität auftreten, sodass hier wiederum eine indirekte Verbindung zu den desmosomalen Caderinen bestehen könnte.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien

Für die durchgeführten Experimente wurden verschiedene Zelllinien, sowohl murine, als auch humane kultiviert.

Zelllinie	Hersteller
MEK: <u>M</u> urine <u>E</u> pithelial <u>K</u> eratinocytes	Anatomische Anstalt München
HaCaT: <u>H</u> uman <u>a</u> ddult low <u>C</u> alcium high <u>T</u> emperature	Leibniz Institut DSMZ German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH (Braunschweig)
NHEK: <u>N</u> ormal <u>H</u> uman <u>E</u> pithelial <u>K</u> eratinocytes	Universitätsklinikum Tübingen

Tabelle 1: Zelllinien

3.1.2 Chemikalien, Puffer und Lösungen

Chemikalie	Hersteller
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Acrylamid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Protein-AG-Agarose	Santa Cruz, Dallas, USA
Protein-G-Agarose	Santa Cruz, Dallas, USA
Aprotinin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	VWR, Darmstadt, Deutschland
cOmplete Proteasehemmer-Cocktail	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DAPI	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dispase II	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Epithelien-Wachstumsmedium CnT-07	CellnTEC (Bern, Schweiz)
Ethanol 100%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-tetraessigsäure (EGTA)	VWR, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Hank's balancierte Salzlösung (HbSS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Keratinocytenmedium	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Kollagen I (Rattenschwanz)	BD Bioscience, New Jersey, USA
Kollagenase I	Gibco (Life Technologies), Carlsbad, USA
Leupeptin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Luminol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Magermilchpulver	Millipore, Darmstadt Deutschland
MgCl ₂	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
MTT	Alfa Aesar (Thermo Fisher) Waltham, USA
NaCl	VWR, Darmstadt, Deutschland
NaF	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Normales Ziegenserum (NGS)	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
n-Propylgallat (NPG)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NP-40-Alternative (NP-40)	Millipore, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Para-Cumar-Säure (PCA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Pepstatin A	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Phenylmethansulfonyl-Fluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phosphatasen-Inhibitormischung (PhosStop)	Roche, Basel, Schweiz
PageRuler Prestained (Proteinmarker)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Proteaseninhibitormischung (cOmplete)	Roche, Basel, Schweiz
Rotiblock	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Streptomycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Triton-X-100	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Trypsin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Tween 20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 2: Chemikalien

Puffer/Lösung	Verwendung	Zusammensetzung
Blotpuffer (5fach)	WB	25 mM Tris/HCl 195 mM Glycin 250 ml Methanol 3,5 mM SDS in H ₂ O

BSA/NGS	IF	0,1% BSA 10% NGS in PBS
BSA/TBST	WB	5% BSA in TBST
cOmplete-Lösung	WB	1 Tablette in 10 ml destilliertem Wasser (1mM Stock-Lösung)
Dispase II-Lösung	Zelldissoziationsversuche	100 mg in 20 ml HbSS
Einbettmedium	IF	1% n-Propylgallat mit 60% Glycerin in PBS
Einfriermedium	Zellkultur	10% DMSO in Ca ²⁺ -freiem FCS
Elektrophorese-Puffer (10fach)	WB	1 M Glycin 124 mM Tris/HCl 17,3 mM SDS in H ₂ O
Entwicklerlösung (ECL I und ECL II im Verhältnis 1:1)	WB	ECL I: 500 µl Luminol-Lösung, 220 µl PCA-Lösung, 5 ml 1 mol/l Tris-HCl ad 50 ml H ₂ O ECL II: 32 µl H ₂ O ₂ , 5 ml 1 mol/l Tris-HCl ad 50 ml H ₂ O
Fixierlösung	IF HaCaT	2% PFA in PBS
HbSS	Zelldissoziationsversuche	130 mM HbSS-Pulver 4 mM NaHCO ₃ in H ₂ O
Lämmli-Puffer	WB	0,19 M Tris/HCl 0,2 M SDS 4,1 M Glycerin 0,3 mM Bromphenolblau in H ₂ O, pH 6,9
Luminol	WB	250 mM Luminol in DMSO
Blocking Solution	WB	5% Magermilch in TBST
Phosphat-gepufferte- Salzlösung (PBS) (5fach)	allgemein	0,68 M NaCl 13,4 mM KCl 48 mM Na ₂ HPO ₄ 7,3 mM KH ₂ PO ₄ in H ₂ O pH 7,4
PhosStop-Lösung	WB	1 Tablette PhosStop in 1 ml destilliertem Wasser (10fache Stocklösung)
PCA	WB	90mM PCA in DMSO

Ripa-Lyse-Puffer (2fach)	Immunpräzipitation	20 ml Tris-HCl (0,5 M) pH 8.0 20 ml NaCl (1,5 M) 2 ml SDS (10%) 2 ml NP-40 (NP-40-Alternative) 400 µl EDTA (0,5M) pH 8 Ad 100 ml H ₂ O
Ripa-Waschpuffer	Immunpräzipitation	10 ml Tris-HCl (0,5 M) pH 8.0 10 ml NaCl (1,5 M) 1 ml SDS (10%) 0,1 ml NP-40 Ad 100 ml H ₂ O
SDS-Lysepuffer (2fach)	WB	25 mM HEPES 2 mM EDTA 25 mM NaF 1% SDS in H ₂ O pH 7,6
Stripping-Puffer	WB	25 mM Glycin 1% SDS pH 2,0
Tris-gepufferte-Salzlösung (TBS)	WB	20 mM Tris/HCl 137 mM NaCl in H ₂ O pH 7,6
TBST	WB	0,05% Tween 20 in TBS
Trypsin	Zellkultur	0,05% Trypsin, 0,02% EDTA in PBS pH 7,2
Triton-X-Lösung	IF HaCaT	0,1% Triton X-100 in PBS
Triton-X-Puffer	Triton-Assay	0,5% Triton X-100 50mM MES 25mM EGTA 5mM MgCl ₂ in H ₂ O pH 6,8

Tabelle 3: Puffer und Lösungen

3.1.3 Antikörper und Mediatoren

Primär-Antikörper	Hersteller	Spezies/Typ	Konzentration	
			Western Blot	IF
Anti-Dsg3	Biozol, Eching, Deutschland	Kaninchen/polyklonal	1:1000 BSA/TBST	1:100 PBS

Anti-Dsg3 Lot AK18	MBL (bezogen über Biozol, Eching, Deutschland)	Maus/monoklonal	1:1000 BSA/TBST	-
Anti-Cttn 4F11	Millipore, Darmstadt, Deutschland	Maus/monoklonal	1:200 BSA/TBST	1:100 PBS
Anti-E-Cadherin SHE78-7	BD-Transduction, Heidelberg, Deutschland	Maus/monoklonal	1:1000 BSA/TBST	1:100 PBS
Anti-Occludin	Invitrogen, Waltham, USA	Kaninchen/polyklonal	1:500 BSA/TBST	1:100 PBS
Anti- α -Tubulin	Abcam, Milton, UK	Maus/monoklonal	1:5000 BSA/TBST	-
Anti-Dsg1	ABclonal, Woburn, USA	Kaninchen/polyklonal	1:1000 BSA/TBST	1:100 PBS
Anti-Dsg1	Santa Cruz, Dallas, USA	Maus/monoklonal	1:1000 BSA/TBST	1:100 PBS
Anti-GAPDH	Avivasysbio, San Diego, USA	Maus/monoklonal	1:4000 BSA/TBST	-
Alexa phalloidin 488	Molecular Probes\Life technologies, Waltham, USA	Phalloidin: bizyklisches, fluoreszenz-markiertes Peptid zur selektiven Erkennung von F-Aktin	-	1:100 PBS
Anti-EGFR	Abcam, Milton, UK	Kaninchen/monoklonal	1:1000 BSA/TBST	-
Anti-pEGFR Y1068	Cell signaling, Danvers, USA	Kaninchen/polyklonal	1:1000 BSA/TBST	-
Anti-pEGFR Y845	Cell signaling, Danvers, USA	Kaninchen/polyklonal	1:1000 BSA/TBST	-
Anti-Pg	Progen, Heidelberg, Deutschland	Maus/monoklonal	1:1000 BSA/TBST	1:100 PBS
Anti-DP1/2	Progen, Heidelberg, Deutschland	Maus/monoklonal	1:250 BSA/TBST	1:100 PBS
Anti-Claudin1	Invitrogen, Waltham, USA	Kaninchen/polyklonal	-	1:100 PBS
Anti-Claudin4	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Kaninchen/polyklonal	-	1:100 PBS
Anti-Zytokeratin 14	Abcam, Milton, UK	Maus/monoklonal	-	1:100 PBS

Anti-Dsc3	LS-Bio, Seattle, USA	Maus/polyklonal	1:1000 BSA/TBST	1:100 PBS
Anti-ERK1/2 (p44/42 MAPK)	Cell signaling, Danvers, USA	Kaninchen/monoklonal	1:1000 BSA/TBST	-
Anti-p-ERK 1/2 p-p44/42 MAPK (T202/Y204)	Cell signaling, Danvers, USA	Kaninchen/monoklonal	1:1000 BSA/TBST	-

Tabelle 4: Primär-Antikörper

Sekundär-Antikörper	Hersteller	Kopplung	Endkonzentration	
			Western Blot	IF
Ziege-Anti-Kaninchen	Dianova, Hamburg, Deutschland	Cy3	-	1:600 in PBS
Ziege-Anti-Kaninchen	Dianova, Hamburg, Deutschland	Cy2	-	1:600 in PBS
Ziege-Anti-Kaninchen	Dianova, Hamburg, Deutschland	Pox	1:10000 in TBST	-
Ziege-Anti-Kaninchen low cross	Dianova, Hamburg, Deutschland	Pox	1:10000 in TBST	-
Ziege-Anti-Maus	Dianova, Hamburg, Deutschland	Cy3	-	1:600 in PBS
Ziege-Anti-Maus	Dianova, Hamburg, Deutschland	Cy2	-	1:600 in PBS
Ziege-Anti-Maus	Dianova, Hamburg, Deutschland	Pox	1:10000 in TBST	-

Tabelle 5: Sekundär-Antikörper

Mediator	Hersteller	Funktion	Endkonzentration	Lösungsmittel
Erlotinib	Santa Cruz, Dallas, USA	EGFR- Inhibitor	2,5 µM	DMSO
TAPI1	Cayman Chemicals/Biomol, Ann Arbor, USA	ADAM17- Inhibitor	10 µM	DMSO
GI254023X	Sigma Aldrich, St. Luis, USA	ADAM10- Inhibitor	20 µM	DMSO

Tabelle 6: Mediatoren

PV-IgG/AK23	Hersteller/Gewinnung	ELISA-Wert (vor Aufreinigung)	End-Konzentration	Lösungs- mittel
PV-IgG	Universität Marburg, Aufreinigung Anatomische Anstalt München	Dsg1: 59 (+) U/ml; Dsg3: > 200 (+) U/ml	1:50	PBS (2 ml Serum auf 1 ml PBS)
AK23	MBL (bezogen über Biozol, Eching, Deutschland)	-	75 µg/ml	PBS

Tabelle 7: PV-IgG und AK23

3.1.4 Verbrauchsmaterial und Geräte

Verbrauchsmaterial/Gerät	Verwendung	Hersteller
Reaktionsgefäße	Allgemein	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Einfrier-Röhrchen	Zellkultur	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	WB	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Pipetten	Allgemein	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
SFX 550 Digitaler Sonifier (Sonifizierungsgerät)	WB	Branson, Danbury, USA
Zellkulturplatten und Flaschen	Zellkultur	Greiner BioOne, Kremsmünster, Österreich
Infinite Pro 200 Plate Reader	WB	TECAN, Männedorf, Schweiz
Gel-Elektrophorese/Blotting-Kammer-System	WB	Biorad, München, Deutschland
Nitrocellulose-Membran	WB	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ProteinSimple FluorChem E System	WB	Protein Simple über Bio-Techne, Minneapolis, USA
iBright CL1500 Imaging System	WB	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sterile Kanüle	Immunpräzipitation	Braun, Melsungen, Deutschland
Elektrische Pipette (Finnpipette™ Novus 1 ml)	Zelldissoziationsassay	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Falcons	allgemein	Greiner BioOne, Kremsmünster, Österreich

Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien und Geräte

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Die Cortactin-defiziente murine Zelllinie MEK (Murine Epitheliale Keratinozyten) Cctn^{-/-} (Ko) sowie die Kontrollzelllinie Cctn^{+/+} (Wt) wurden durch Isolation und Immortalisation aus der Epidermis von neonatalen Mäusen in Anlehnung an das Protokoll zur Gewinnung von Maus-Keratinozyten gewonnen (Kröger, Loschke, Schwarz, Windoffer, Leube & Magin, 2013; Kumar et al., 2015; Lichti et al., 2008) und bis zur Verwendung in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Die Zellen wurden bei 35 °C in einer befeuchteten Atmosphäre bei 5% CO₂ gehalten. Als Medium wurde das Keratinozytenmedium DMEM/Ham's F12 verwendet unter Zugabe von 10% Ca²⁺-freiem FCS, 5 ml N-Glutamin, 2,5 ml Penicillin/Streptomycin, 5 ml Na-Pyruvat, 2 ml Adenin, 500 µl EGF, 250 µl Hydrocortison, 500 µl Insulin und 5 µl Cholera toxin. Die Zellen wurden in einer Ca²⁺-armen Atmosphäre (0,05 mM) gehalten. Alle Kultivierungsgefäße wurden mit Kollagen I beschichtet. Für die Passagierung wurden die Zellen nach einmaligem Waschen mit zimmerwarmem PBS durch Zugabe von steril filtriertem Trypsin und EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure 0,05%) vom Flaschenboden gelöst. Anschließend erfolgte die Neutralisierung des Trypsins durch Resuspension der Zellen in neuem Medium. Diese Resuspension wurde anschließend bei 230 rpm für drei Minuten zentrifugiert und danach das noch Trypsin-EDTA enthaltende überstehende Medium abgesaugt. Schließlich erfolgte die Resuspension in neuem Medium und die Aussaat in die zuvor kollagenisierten T75 Flaschen zur Weiterzucht oder in den für die jeweiligen Versuche benötigten Zellkulturgefäßen. Um die Desmosomendifferenzierung zu induzieren, wurden zum Zeitpunkt der Konfluenz ein Mediumwechsel sowie eine Ca²⁺-Zugabe durchgeführt, um eine Konzentration von 1,8 mM Ca²⁺ zu erreichen. 48h nach dieser Behandlung wurde das Experiment durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt von einer vollständigen Differenzierung der Desmosomen ausgegangen werden konnte. Die Zellen wurden maximal bis Passage 40 verwendet.

Von den niedrigen Zellpassagen wurden Zellen zur späteren Weiterzucht eingefroren. Dafür wurden die Zellen einer T75 Flasche wie bei der Passagierung abgelöst und abzentrifugiert, die Resuspension erfolgte anschließend in 1 ml des Einfriermediums und wurde in ein spezielles Sicherheitsröhrchen eingebracht. Diese Röhrchen wurden nun in einen Styroporblock gestellt, durch welchen gewährleistet war, dass die Zellen im Gefrierschrank langsam und gleichmäßig auf eine Temperatur von -80 °C heruntergekühlt wurden. Sieben bis 14 Tage nach dem Herunterfrieren wurden die Zellen in Tanks mit flüssigem Stickstoff überführt, wo sie bis zum erneuten Bedarf verblieben.

Zum Auftauen wurden die Röhrchen aus dem Stickstofftank entnommen. Auf das gefrorene Einfriermedium-Zell-Gemisch wurde zimmerwarmes Keratinozytenmedium gegeben. Durch Resuspension wurden die Zellen aufgetaut und in ein Falcon überführt. Anschließend wurden die Zellen für drei Minuten bei 230 rpm zentrifugiert, und der Mediumsüberstand wurde entfernt, damit das enthaltene DMSO nicht auf den Zellen verblieb. Nach erneuter

Resuspension in frischem Medium erfolgte die Aussaat in Zellkulturflaschen und ein Mediumswechsel am nächsten Tag.

Die humane Keratinozytenzelllinie HaCaT ist eine spontan immortalisierte Keratinozytenzelllinie. Die Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) kultiviert mit Zugabe von 10% FCS, 50 U/ml Penicillin und 50 g/ml Streptomycin. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C in befeuchteter Atmosphäre und mit 5% CO₂. Zum Zeitpunkt der Konfluenz wurden die Zellen für die Passagierung gesplittet. Dafür erfolgte nach Entfernen des Mediums das Ablösen der Zellen vom Flaschenboden durch eine 20-minütige Inkubation mit PBS/EDTA sowie die Zugabe von 3ml Trypsin pro T75 Flasche für drei bis fünf Minuten (beide Lösungen waren steril filtriert und wurden vor Verwendung auf Raumtemperatur (PBS/EDTA) bzw. 37°C (Trypsin) aufgewärmt). Nach Ablösen des Zellrasens wurde das Trypsin durch Zugabe von Zellkulturmedium inhibiert. Anschließend erfolgten analog zu den MEKs die Zentrifugation der Zellen (230 rpm für drei Minuten) sowie die Resuspension des Zellpellets und die Aufteilung der Zellen auf die Flaschen zur Weiterzucht oder verschiedene Kulturgefäße für die Versuche.

Bei den NHEKs handelt es sich um primäre humane Keratinozyten, isoliert in der Hautklinik der Universität Tübingen (Ethikvotum 547/2011BO2). Als Kulturmedium wurde das Epithelien-Wachstumsmedium CnT-07 der Firma CellnTEC mit firmenspezifischen Zusätzen verwendet. Um bei Erreichen der Konfluenz eine Ausdifferenzierung der Desmosomen zu erreichen, erfolgte ein Mediumwechsel mit einem Medium mit 1,8 mM Ca²⁺. 24 h nach der Ca²⁺-Zugabe konnte eine Ausdifferenzierung der Desmosomen angenommen werden, sodass die Versuchsdurchführung erfolgte. Die Passagierung der NHEKs erfolgt analog zu der der HaCaTs, wobei vor der Inkubation mit PBS/EDTA mit zimmerwarmem PBS gespült wurde, um etwaige Mediumreste vollständig zu entfernen.

Bei allen Inkubationen der Zellen für Versuche wurde darauf geachtet, dass 24h vor der Inkubation ein Mediumwechsel durchgeführt wurde, sodass für die Inkubation das bereits auf den Zellen befindliche Medium verwendet werden konnte. Auf diese Weise wurde ausgeschlossen, dass die Ergebnisse durch zellbiologische Vorgänge verfälscht wurden, die auf die Zugabe von neuem Medium zurückzuführen sind.

3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.2.1 Herstellung von SDS-Zelllysaten

Für die quantitative Bestimmung der Gesamtheit der Proteine von Zellen wurden SDS-Zelllysate hergestellt. Das SDS bewirkt dabei, dass die Proteine denaturiert werden, und zudem überdeckt es die Ladungen der Proteine, sodass eine Auftrennung während der Elektrophorese rein nach deren Molekulargewicht erfolgt, denn die Sekundär-, Tertiär- und Quartär-Struktur der Proteine gehen auf diese Weise verloren. Für diese Methode wurden die Zellen wie unter 3.2.1 beschrieben kultiviert und den jeweiligen Inkubationen und Versuchsbedingungen entsprechend vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen auf Eis

gestellt und zweimal mit 4 °C kaltem PBS gewaschen. Verwendet wurde SDS-Lysepuffer im Verhältnis 1:1 gemischt mit cOmplete Proteaseinhibitor-Lösung. Wenn an den zu untersuchenden Proteinen Phosphorylierungsstellen von Interesse waren, wurde dem SDS-Lysepuffer ein PhosphoStop zugefügt. Dann wurden die lysierten Zellen vom Boden des Kulturgefäßes abgeschabt, in gekühlte Reaktionsgefäße überführt und anschließend 15mal mit dem Sonifizierungsgerät behandelt (Puls-Modus: 15 s pro Puls, 25% Amplitude).

3.2.2.2 Triton-X-100-vermittelte Proteinextraktion

Bei dieser Art der Lysatherstellung, dem Triton-Assay, erfolgt eine Auftrennung der Proteine mittels Triton-X-100 in zwei Phasen, eine unlösliche Fraktion (Pellet) und eine lösliche Fraktion (Überstand). Im Pellet befinden sich alle fest mit dem Zytoskelett assoziierten Proteine, also auch alle desmosomalen Proteine; der Überstand enthält die übrigen Proteine. Für diesen Assay erfolgte die Kultur der Zellen ebenfalls wie unter 3.2.1 beschrieben. Die Zellen wurden wie bei den SDS-Lysaten erläutert behandelt, bevor der Triton-Lysepuffer zugegeben wurde. Dieser wurde für jeden Versuch frisch mit Protease-Inhibitoren angereichert: 1% PMSF, je 0,1% Pepstatin A, Leupeptin und Aprotinin. Bei Interesse an Phosphorylierungsstellen wurde wiederum PhosphoStop verwendet. Der Lysepuffer wurde für 20 min unter Schwenken auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte das Abschaben der Zellen und die Überführung in vorgekühlte Reaktionsgefäße. Durch Zentrifugation (fünf Minuten bei 14 000 rpm bei 4°C) erfolgte eine Separation in Pellet und Überstand. Der Überstand wurde abgenommen und wiederum in vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt. Das Zell-Pellet wurde mit Triton-Puffer gewaschen, nochmals abzentrifugiert (s. oben), schließlich in SDS-Lysepuffer resuspendiert und 15mal sonifiziert.

3.2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Bei allen Zelllysaten wurde die Proteinkonzentration bestimmt, damit für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese jeweils die gleiche Proteinmenge aufgetragen werden konnte. Für die Konzentrationsbestimmung der Zelllysate wurde das Pierce BCA-Protein-Assay-Kit den Herstellerangaben folgend verwendet. Bei der ablaufenden Reaktion handelt es sich um die Biuret-Reaktion. Die Konzentrationsbestimmung beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ , wobei letzteres mit der zugegebenen Chemikalie BCA (Bichinoninsäure) einen farbigen Komplex bildet. Als Reduktionsmittel fungieren dabei die Peptide, sodass von den umgesetzten Kupferionen auf die Peptidmenge geschlossen werden kann. Entsprechend dem BCA-Protokoll wurde ein Standard mit BSA in absteigenden Konzentrationen von 2000-25 µg/ml hergestellt. Der Standard und die Proben wurden jeweils in Doppelbestimmung auf eine 96-Well-Platte aufgetragen und für 30 min bei 37 °C, sowie anschließend für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Proteinkonzentration photometrisch mit dem Tecan-Gerät bestimmt (i-control 2.0 for infinite reader).

3.2.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei dieser Methode werden die zuvor aus den lysierten Zellen gewonnenen Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Es wurden 7,5% Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gele verwendet, da diese eine besonders genaue Auftrennung der Proteine mit Molekulargewicht über 100 kDa ermöglichen, also in dem Bereich, in welchem sich der Großteil der für diese Arbeit relevanten Proteine befindet. Für die Herstellung der Gele wurde zwischen zwei Glasplatten zunächst Trenngel und nach dessen Polymerisation Sammelgel gegossen. In das Sammelgel wurden Kämme eingebracht, sodass sich Taschen ergaben, in welche später die Proteinproben in gleichmäßigen Abständen eingebracht werden konnten. Als Polymerisationsinitiator wurde APS verwendet, als Katalysator diente TEMED. Die Gele wurden vor der Verwendung für maximal eine Woche bei 4°C in feuchter Atmosphäre aufbewahrt. Unter Berücksichtigung der Proteinkonzentrationsbestimmung wurde von allen Proben die gleiche Menge Protein aufgetragen und zusätzlich dreifach-Lämmli mit 50 mM DTT zur Beschwerung der Proteine verwendet. Das DTT dient dabei dazu, die Di-Sulfidbrücken zu zerstören, welche mit am Aufbau der Tertiär-Struktur beteiligt sind. Um einen gleichmäßigen Lauf der Proteine im Gel zu gewährleisten, wurden die Proben so mit dem entsprechenden Puffer aufgefüllt, dass alle das gleiche Volumen hatten. Die Lämmli-Proben-Gemische wurden vor dem Auftrag auf das Gel für 5 min auf 95 °C erhitzt, um eine vollständige Denaturierung der Proteine zu gewährleisten. Die Gele wurden in eine vertikale Gel-Elektrophorese-Kammer eingebracht, welche mit Elektrophorese-Puffer gefüllt war. Nach dem Auftrag der Proben wurden diese einer konstanten Spannung von 80 V im Sammelgel und anschließend 120 V im Trenngel ausgesetzt. Zusätzlich zu den Proben lief ein Marker im Gel, welcher Proteine bekannter Größe enthielt und so die Größenbestimmung der aufgetragenen Proteine ermöglichte.

3.2.2.5 Western Blot-Analyse

Nachdem die Proteine in dem Gel ihrer Größe nach aufgetrennt worden waren, erfolgte der Transfer auf eine Nitrocellulosemembran. Dafür wurde die Technik des Wet Blottings angewendet. Das Gel wurde direkt auf die Nitrocellulosemembran gelegt, wobei zu beiden Seiten Filterpapiere und Schwämme aufgelegt wurden. Dieses Paket wurde zwischen zwei Graphitelektroden geklemmt, und anschließend erfolgte das Blotten, also der Proteintransfer in einer mit Blotpuffer aufgefüllten Kammer bei einer konstanten Stromstärke von 350 mA für 90 Minuten.

Nachdem der Blotvorgang abgeschlossen war, wurden die Nitrocellulosemembranen einmal in TBST gewaschen. Danach erfolgte eine Blockade der eventuell auf der Membran vorhandenen unspezifischen hydrophoben Bindungsstellen durch Schwenken in BSA/TBST. War der Nachweis von phosphorylierten Enzymen geplant, erfolgte dieses sogenannte Blocken für 60 min in fettarmem Milchpulver gelöst in TBST.

Die Erstantikörper wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert. Als Lösungsmittel diente dabei BSA/TBST. Nach dreimaligem Waschen der Membranen mit TBST erfolgte anschließend die Inkubation mit dem der Spezies des Erstantikörpers entsprechenden Zweitantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Der Zweitantikörper wurde dabei wiederum entweder in TBST oder in Milch gelöst.

3.2.2.6 Immundetektion der transferierten Proteine

Die Immundetektion der übertragenen Proteine erfolgte mittels des Verfahrens der Elektrochemilumineszenz (ECL)-Proteindetektion. Der verwendete Zweitantikörper war dabei gekoppelt an das Enzym Peroxidase. Durch Zugabe einer ECL-Lösung (Gemisch aus ECL I und II zu gleichen Teilen) wurde der Peroxidase ihr Substrat, Luminol, zugeführt. Das Luminol wurde von der Peroxidase umgesetzt, sodass eine ortspezifische Detektion der oxidierten Form des Luminols und damit auch des gebundenen Zweitantikörpers im Entwickler möglich ist.

Sollten auf derselben Membran Proteine mit sehr ähnlichem Molekulargewicht nachgewiesen werden, so wurde die Membran für 20 bis 45 min bei 70°C in Strippingpuffer inkubiert und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur in Rotiblock inkubiert, um unspezifische Proteinbindungen zu verhindern. Die Strippingzeit wurde an die verwendeten Antikörper und deren Bindungsverhalten angepasst: Zur Festlegung der Zeit erfolgte nach Strippen eine erneute Immundetektion des entfernten Antikörpers, sodass ausgeschlossen werden konnte, dass noch Reste des Antikörpers verblieben waren und die Detektion des anschließend inkubierten Antikörpers verfälschten.

3.2.3 Immunfluoreszenzuntersuchungen

Die Immunfluoreszenzmikroskopie ermöglicht es, spezifisch durch Antigen-Antikörper-Reaktionen detektierte Proteine in fixierten Zellen, also an ihrer Lokalisation in der Zelle, sichtbar zu machen. Das gelingt, indem die Primärantikörper mit einem Sekundärantikörper verknüpft werden, der mit Cyanin-Farbstoffen, den Fluorophoren Cy3 oder Cy2, verbunden ist, welche durch diskrete Laserspektren angeregt werden.

Alle Zelllinien wurden für die Probengewinnung auf Deckgläschen (Durchmesser 12mm) kultiviert. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert.

Die MEKs sowie die NHEKs wurden mit Ethanol-Aceton ausdifferenziert und fixiert. Dabei wurden die Zellen nach Entfernen des Mediums auf Eis gestellt und für 30 Minuten mit eiskaltem 100%igen unvergälltem Ethanol fixiert. Nach Entfernung des Ethanols wurde Aceton für drei Minuten zugegeben, welches sowohl der Fixierung als auch der Permeabilisierung der Zellen dient. Auf die Entfernung des Acetons folgten drei Waschungen mit PBS.

Die HaCaTs wurden mit PFA (Paraformaldehyd) fixiert. Dabei wurden die Zellen nach Entfernung des Mediums zunächst mit PBS gewaschen und dann für zehn Minuten mit 2%igem PFA fixiert. Nach wiederum drei Waschschritten mit PBS erfolgte für zehn Minuten die Permeabilisierung der Zellen mit 0,1%iger Triton-X-Lösung (Lösungsmittel PBS). Im Anschluss wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen.

Die nun folgenden Schritte wurden analog für alle verwendeten Zelllinien durchgeführt.

Mittels Pinzette wurden die Deckgläschen, ohne den darauf befindlichen Zellrasen zu beschädigen, aus den Kulturplatten entnommen und auf Objektträger aufgebracht. Um unspezifische Proteinbindungen abzufangen wurden pro 12 mm- Deckgläschen 30 µl BSA/NGS für eine Stunde in einer Kammer mit erhöhter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach der Entfernung von BSA/NGS erfolgte die Inkubation der Primärantikörpers gelöst in BSA/NGS über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Der Sekundärantikörper wurde nach dreimaligem Waschen mit PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zehn Minuten vor Ende der Inkubationszeit wurde pro Deckgläschen 10 µl DAPI (1mg/ml 1:1000 verdünnt in PBS für 30µl Zweitantikörper) zur Färbung der Zellkerne zugegeben. Nach der Sekundärantikörper-Inkubation wurde erneut dreimal gewaschen. Bei Doppelfärbungen wurde nun der nächste Primärantikörper wiederum über Nacht bei 4°C auf die Deckgläschen gegeben. Um zu verhindern, dass sich PBS-Kristalle bilden und es somit zu Artefakten kommt, wurden alle Deckgläschen in destilliertem Wasser gewaschen. Nun erfolgte das Eindecken der Deckgläschen mit NPG, wodurch ein schnelles Ausbleichen der Proben vermieden wurde.

Die bildliche Darstellung der Proben erfolgte mit dem Leica „SP5 confocal microscope“ mit einem 63 x NA 1,4 Ölobjectiv und Zoom-Funktion. Die zum Betrieb verwendete Software war die LAS-AF-Software (Leica). Durch Anregung der Cyanin-Farbstoffe mit Licht einer spezifischen Wellenlänge kommt es zu einer für jeden Farbstoff charakteristischen Lichtemission (bei Cy2: Absorptionsmaximum bei 492 nm, Emissionsmaximum bei 510 nm; bei Cy3: Absorptionsmaximum bei 550 nm, Emissionsmaximum bei 570 nm). Diese Emissionseffekte können nun auf verschiedene Arten sichtbar gemacht werden: Für direkte Bildbetrachtung mittels einer Fluoreszenzlampe, in höherer Auflösung für die Bildaufnahme mithilfe von Lasern unter Verwendung der entsprechenden Software (Confocal software.Ink).

3.2.4 Zelldissoziationsversuche

Ein Zelldissoziationsversuch (Dispase-Assay) ermöglicht eine Aussage über die interzelluläre Haftung und deren Beeinflussung durch Zugabe verschiedener Mediatoren. Indem ein einheitlicher Zellrasen (Zellmonolayer) definiertem Scherstress ausgesetzt wird, kommt es zum Zerfall dieses Monolayers in Fragmente. Über die Anzahl der entstandenen Fragmente kann auf die Zelladhäsion rückgeschlossen werden.

Für die Zelldissoziationsversuche wurden die Zellen in 24-Loch-Platten bis zur Konfluenz und Ausdifferenzierung gehalten; bei MEKs und NHEKs wurde protokollkonform (s. Abschnitt 3.2.1) die Ca²⁺-Zugabe durchgeführt. Da die Zellen für den Versuch vital bleiben müssen,

wurde darauf geachtet, dass alle Reagenzien Zimmertemperatur hatten. Zunächst wurde das Kulturmedium durch Absaugen und anschließendes Waschen mit steril gefiltertem HbSS gründlich entfernt. Bei HbSS handelt es sich um eine Salzlösung, welche dem für die Zellen physiologischen pH-Wert von 7,4 entspricht und das osmotische Gleichgewicht aufrechterhält, sodass die Zellen sowohl mit Wasser als auch mit dem für die Integrität der adhäsionsvermittelnden Kontakte nötigen Ca^{2+} versorgt werden. Mediumreste würden das später im nächsten Schritt zugegebene Enzym inhibieren, daher dürfen sie keinesfalls vorhanden sein. Nach den Waschschritten wurde das Enzym Dispase II (4,9mg/ml) zugegeben, welches die Zellen vom Plattenboden ablöst, die Haftung der Zellen aneinander aber nicht beeinflusst. Pro Zellrasen wurden 200 μl des Enzyms zugegeben. Da bei den MEKs die verwendeten Kulturgefäße kollagenisiert waren, wurde hier nicht nur die Dispase II, sondern zusätzlich das Enzym Kollagenase (Konzentration 100mg/ml) verwendet (Mischverhältnis Dispase zu Kollagenase 100:1). Die Inkubationszeit der Dispase beziehungsweise Kollagenase betrug je nach Zelllinie 20 bis 60 Minuten. Während dieser Zeit wurden die Zellen wieder in den Brutschrank gebracht. Zwischendurch wurde, wenn nötig, durch leichtes Klopfen gegen den Rand der Loch-Platten der Ablösungsprozess unterstützt. Nachdem die Zellmonolayer abgelöst waren, wurde die Dispase durch Zugabe von HbSS so verdünnt, dass die enzymatische Einwirkung auf die Zellen möglichst geringgehalten wurde. Zudem wurden pro Zellrasen 50 μl MTT zugegeben. Die Abkürzung MTT steht für 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid; es handelt sich dabei um einen gelben Farbstoff, welcher durch Reduktion in violette, unlösliches Formazan umgewandelt wird. Diese Reduktion ist abhängig von der Vitalität der Zellen, denn die Reduktionsmittel sind vorwiegend NADH und NADPH (Ghasemi, Turnbull, Sebastian & Kempson, 2021). Das bedeutet, die Anfärbung der Zellen mit MTT ermöglicht eine Aussage darüber, ob die Zellen vital und damit für den Versuch geeignet sind.

Im folgenden Schritt wurden die Zellmonolayer einem reproduzierbaren Scherstress ausgesetzt, indem sie mit einem gleichbleibenden Verfahren mittels einer elektrischen 1 ml-Pipette auf und ab pipettiert wurden. Die genaue Anzahl der Pipettierungen wurde dabei so gewählt, dass in den Kontrollgruppen der jeweiligen Experimente eine vergleichbare Fragmentanzahl erreicht wurde. Direkt nach dem Pipettieren wurden Fotos der Lochplatten angefertigt und im Anschluss die Fragmentanzahl bestimmt (bei kleinen Stückzahlen manuell, ansonsten computergestützt mit der Software ImageJ). Für jede Kondition erfolgte eine Doppelbestimmung.

3.2.5 Zelldissoziationsversuche bei Hyperadhäsion

Die Hyperadhäsion ist ein Zustand der Desmosomen, genauer der desmosomalen Cadherine, in welchem die Zellhaftung Ca^{2+} -unabhängig ist. Dieser Zustand kommt physiologisch während der Reifung vor und ist durch eine deutlich stärkere Adhäsion gekennzeichnet, verglichen mit der Ca^{2+} -abhängigen Haftung. Zellen sind befähigt, zwischen diesen beiden Zuständen der Desmosomen, also Ca^{2+} -abhängiger und Ca^{2+} -unabhängiger Zellhaftung, zu wechseln, wenn

die Bedingungen dies erfordern; Hyperadhäsion kann also induziert werden (Garrod, Berika, Bardsley, Holmes & Tabernero, 2005; Garrod & Kimura, 2008). Für die hier beschriebenen Versuche wurde den Zellen Ca^{2+} entzogen, sodass die Ca^{2+} -abhängige Zelladhäsion nicht mehr wirken konnte. Somit ist eine Untersuchung der Ca^{2+} -unabhängigen Zelladhäsion, der Hyperadhäsion, möglich. Zunächst wurden die Zellen wie oben beschrieben unter der Verwendung von Dispase abgelöst. Anschließend wurde durch sorgfältiges und vorsichtiges Absaugen die Dispase entfernt und durch Medium ersetzt, welches 5 mM EGTA, also einen starken Ca^{2+} -Chelator, enthielt. Mit diesem Medium verblieben die Zellen für 90 Minuten im Brutschrank, bevor, wie unter 3.2.4 „Zelldissoziationsversuche“ beschrieben, definierter Scherstress angewendet wurde.

3.2.6 Statistische Auswertung und Bildbearbeitung

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde Graphpad Prism in der Software Version 8 verwendet. Wenn zwei Datenmengen miteinander verglichen wurden, kam der ungepaarte T-Test zur Anwendung, wobei aufgrund der Versuchsorganisation angenommen werden konnte, dass die Datensätze unabhängig voneinander sind und eine Normalverteilung vorliegt. Bei mehr als zwei Vergleichsgruppen wurde eine ANOVA-Analyse durchgeführt, ebenfalls unter der Annahme von unabhängigen Datenmengen und dem Vorliegen einer Normalverteilung. Je nach Anzahl der Variablen wurde ein Ein- oder Zwei-Faktor-ANOVA durchgeführt. Zur Kompensation einer Alpha-Fehler-Kumulierung wurde die Bonferroni-Korrektur angewendet.

Ab einem Wert von $p < 0,05$ wurde von statistischer Signifikanz ausgegangen. Die in den Graphen angezeigten Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Western Blot-Banden wurden grafisch mithilfe der Software ImageJ analysiert. Dabei wurde die Bande densitometrisch gemessen und der umgebende Hintergrund direkt subtrahiert. Eine solche Analyse wurde sowohl mit dem zu untersuchenden Protein als auch mit der Ladekontrolle durchgeführt; anschließend wurden die Proteine von Interesse auf die Ladekontrolle bezogen. Auf diese Weise konnten etwaige Ungleichheiten in der tatsächlichen Proteinmenge ausgeglichen werden.

4 Ergebnisse

4.1 Bedeutung der Sheddases ADAM10 und ADAM17 für die basale Zelladhäsion

In diesem Untersuchungsabschnitt sollte die Bedeutung der Sheddases ADAM10 und ADAM17 für die basale Zelladhäsion von Keratinozyten mithilfe von Zelldissoziationsassays untersucht werden.

4.1.1 Destabilisierende Wirkung von ADAM10 auf die Zelladhäsion

Die drei Keratinozyten-Zelllinien MEKs, HaCaTs und NHEKs wurden zum Zeitpunkt ihrer Konfluenz und nach erfolgter Ausdifferenzierung anschließend für 24h mit Inhibitoren von ADAM10 beziehungsweise ADAM17 inkubiert. Da für beide Mediatoren DMSO als Trägersubstanz diente, wurde als Kontrollbedingung mit der entsprechenden Menge DMSO inkubiert.

Es zeigte sich, dass die Inhibition weder von ADAM10 noch von ADAM17 signifikante Veränderungen in der basalen, nicht durch Mediatoren beeinflussten, Zelladhäsion von MEKs und HaCaTs verursacht (Abb. 5A, B). Bei beiden Zelllinien handelt es sich um immortalisierte Zelllinien, die sich entsprechend der Eigenschaften von den Zellen, wie sie in der menschlichen Haut vorkommen, deutlich unterscheiden. Ein weiteres Modell waren daher primäre humane Keratinozyten, und so wurden die Experimente mit NHEKs wiederholt, welche aus zellbiologischer Sicht das der Haut am nächsten kommende in vitro-Modell darstellen. Es hat sich gezeigt, dass auch in den NHEKs eine ADAM17-Inhibition keine Auswirkungen auf die basale Zelladhäsion hat (Abb. 5C).

Allerdings kommt es durch die Inhibition von ADAM10 bei den NHEKs zu einer im Vergleich zur Kontrolle signifikant verringerten Fragmentanzahl im Dissoziationsassay (Abb. 5C, D). Daraus lässt sich folgern, dass ADAM10 die basale Zelladhäsion negativ beeinflusst. Im Gegensatz dazu ist dieser Einfluss von ADAM10 und ADAM17 in murinen, aber auch humanen Zellen, die durch Immortalisation verändert wurden, nicht nachweisbar.

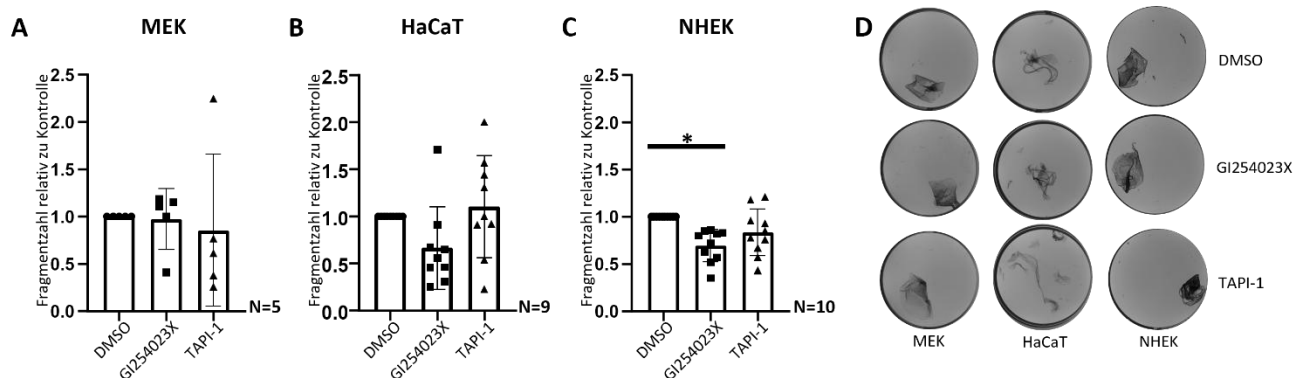


Abbildung 5: Statistische Auswertung der Zelldissoziationsassays von MEKs, HaCaTs und NHEKs unter basalen Bedingungen sowie repräsentative Fotodarstellung derselben.

MEKs (**A**) und HaCaTs (**B**) zeigen im Zelldissoziationsassay unter allen untersuchten Bedingungen ähnlich viele Zellfragmente. Die basale Zelladhäsion dieser beiden Zelllinien ist folglich nicht beeinflusst von der Aktivität von ADAM10 oder ADAM17. Bei den NHEKs (**C**) ist die ADAM17-Inhibition ohne Folge für die basale Zelladhäsion. Wird dagegen ADAM10 inhibiert, kann eine signifikante Reduktion der Fragmentanzahl nachgewiesen werden (Ordinary one-way ANOVA, $*p=0,001$) (**C**). Repräsentative Fotoaufnahmen, die direkt nach dem Scheren durchgeführt wurden, zeigen die unveränderte Fragmentanzahl bei MEKs und HaCaTs unter allen Bedingungen. Die stabilisierende Wirkung der ADAM10-Inhibition auf die Zelladhäsion in NHEKs kann ebenfalls nachvollzogen werden (**D**) (GI254023X=ADAM10-Inhibitor, TAPI-1=ADAM17-Inhibitor) (modifiziert nach (Kugelman et al., 2022)).

4.1.2 Effekt der ADAM-Inhibitoren auf Dsg1, Dsg3 sowie EGFR

Wie bereits unter 1.5.3.1 beschrieben handelt es sich bei ADAMs um Sheddasen, zu deren Substraten unter anderem Liganden von EGFR und auch desmosomale Cadherine wie Dsg2 gehören. In der Haut sind die überwiegend exprimierten desmosomalen Cadherine Dsg1 und Dsg3, weshalb der Fokus der Untersuchungen auf diesen lag. Entsprechend wurde nun untersucht, ob durch die Inhibition von ADAM10 oder ADAM17 eine Veränderung in der Aktivierung von EGFR oder in der Expression von Dsg1 oder Dsg3 auftritt. Als Hinweis auf eine Aktivierung von EGFR wurde dessen Phosphorylierung untersucht, und zwar einerseits an der Src-abhängigen Phosphorylierungsstelle am Tyrosin der Position 845 (Y845), sowie an der Phosphorylierungsstelle am Tyrosin der Position 1068 (Y1068), welche unabhängig von Src ist, aber durch die Liganden EGF und Betacellulin erhöht wird (Oda, Matsuoka, Funahashi & Kitano, 2005; Rojas, Yao & Lin, 1996). Diese beiden Phosphorylierungsstellen wurden gewählt, um gezielt zu überprüfen, ob Src für die EGFR-Aktivierung nötig ist. Dies war von Interesse, da bereits bekannt ist, dass die ADAM10-Aktivierung Src-abhängig ist (Ivars et al., 2020). Für die phosphorylierten Formen von EGFR sowie für Dsg1 und Dsg3 wurden quantitative Proteinanalysen mithilfe von Western Blot-Analysen von SDS-Lysaten durchgeführt. Dabei wurden die Proben nach 30 min-, nach 90 min- sowie nach 24h-Inkubation gewonnen. Die

Wahl der Zeitpunkte beruhte dabei auf der Kenntnis, dass eine EGFR-Aktivierung durch andere Signalwege bereits frühzeitig nach einer entsprechenden Inkubation festzustellen ist (Walter et al., 2019).

Zu keinem der Zeitpunkte und in keiner der drei verwendeten Zelllinien konnte ein Unterschied bezüglich der Aktivierung von EGFR der vorhandenen Proteinmenge von Dsg1 oder Dsg3 festgestellt werden (Abb. 6).

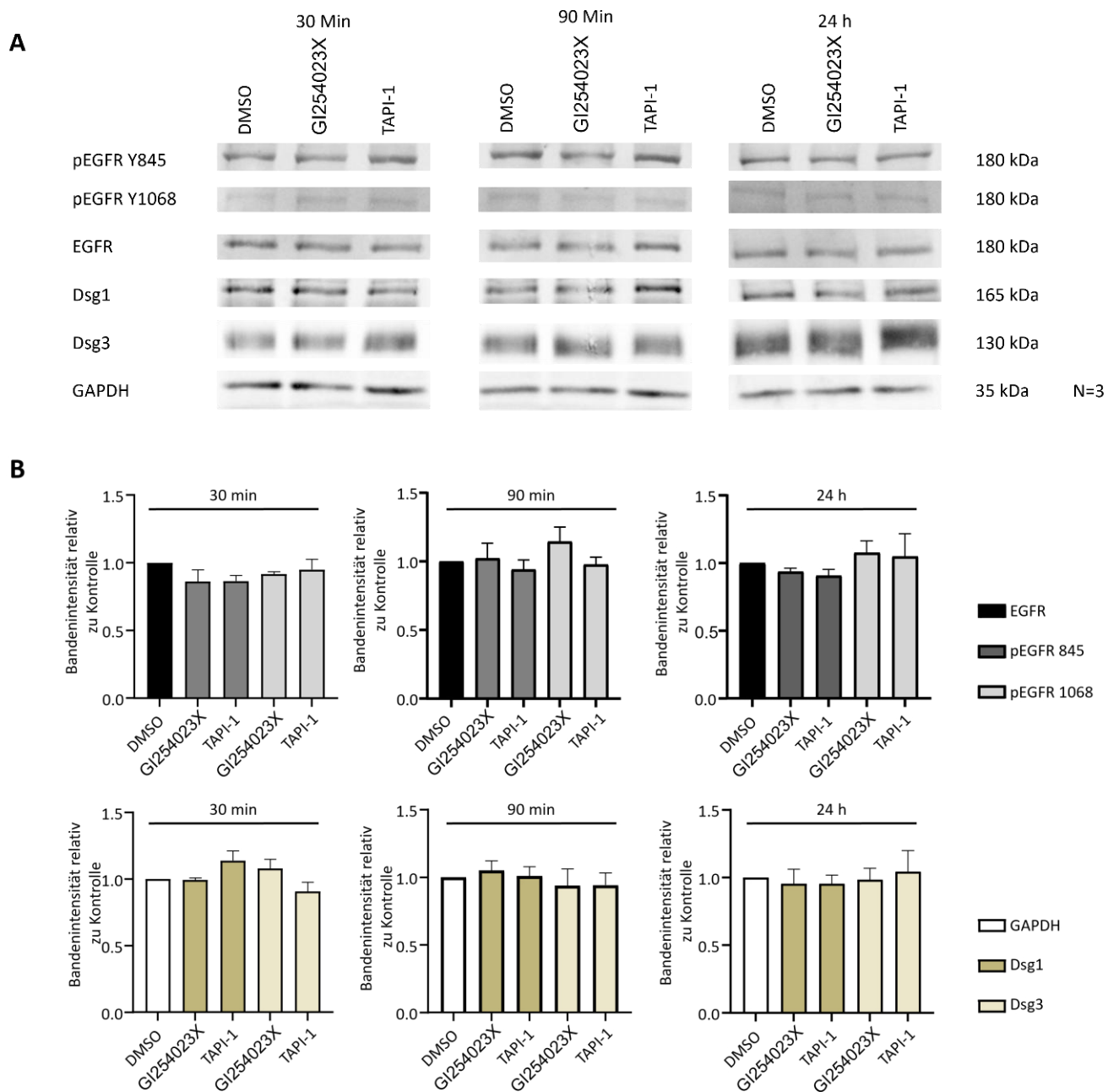


Abbildung 6: Western Blot-Analyse der gewonnenen SDS-Lysate aus NHEKs zur Beurteilung des Ausmaßes der Aktivierung von EGFR sowie der Proteinmengen von Dsg1 und Dsg3 in Abhängigkeit von der Inhibition von ADAM10 oder ADAM17 mit zugehörigen quantitativen Analysen.

Die absoluten Mengen von Dsg1 und Dsg3 zeigen sich trotz Inhibition von ADAM10 und ADAM17 in NHEKs unverändert. Zudem bleibt auch die absolute Menge von EGFR gleich, und es lassen sich keine Alterationen in der Aktivierung von EGFR an den beiden untersuchten Phosphorylierungsstellen (Y1068 und Y845) erkennen. Das gilt für drei verschiedene Zeitpunkte, nämlich nach 30 min-, nach 90 min- sowie nach 24h-ADAM-Inhibition **(A)**. Auch die statistischen Analysen nach Bandendichtemessungen der Western Blots zeigen, dass keine signifikanten Unterschiede in der Expression der untersuchten Proteine vorliegen **(B)**. (GI254023X=ADAM10-Inhibitor, TAPI-1=ADAM17-Inhibitor) (modifiziert nach (Kugelman et al., 2022).

Da sich quantitativ keine Unterschiede in der Dsg1- und Dsg3-Proteinmenge feststellen ließen, wurden Immunfärbungen durchgeführt. Hier sollte herausgefunden werden, ob durch die ADAM-Inhibition die Verteilung der desmosomalen Cadherine beeinflusst wird. Es ist bekannt, dass sich Veränderungen in der Lokalisation von desmosomalem Dsg1 und Dsg3 erst Stunden nach der Inkubation zeigen (Aoyama & Kitajima, 1999; Jennings et al., 2011). Deshalb wurden die Zellen vor den Antikörperfärbungen für 24 h mit den ADAM-Inhibitoren oder DMSO, beides in der gleichen Konzentration, inkubiert.

Erkennbar ist, dass die desmosomalen Cadherine Dsg1, Dsg2 und Dsg3 bei den HaCaTs unter allen Konditionen vor allem an den Zellgrenzen, in geringem Maß aber auch zytosolisch vorliegen. Die Anordnung an den Zellgrenzen ist kontinuierlich, es lassen sich keine Cluster ausmachen (Abb. 7A). Dsg2-Färbungen der murinen Keratinozyten ergaben nur unspezifische Signale. Dsg2 scheint in diesen Zellen also in einem in der Immunfluoreszenzmikroskopie nicht nachweisbaren Maß exprimiert zu sein. Das stimmt mit der Beobachtung überein, dass Dsg2 in der intakten Epidermis praktisch nicht vorkommt (Sigmund, Steinert, Egu, Bayerbach, Waschke & Vielmuth, 2020) und generell für die Adhäsion in Keratinozyten von untergeordneter Bedeutung ist (Hartlieb et al., 2014). Bei den MEKs zeigt sich ebenfalls eine kontinuierliche Anordnung der Dsgs an den Zellgrenzen; Dsg3 (in sehr geringem Maß) und vor allem Dsg1 sind zudem zytosolisch detektierbar (Abb. 7B). Somit kann festgehalten werden, dass weder ADAM10 noch ADAM17 unter basalen Bedingungen zu einer Veränderung der Lokalisation von Dsg1 und Dsg3 führt. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der quantitativen Proteinanalyse mittels Western Blot war auch keine Veränderung der Proteinmenge der untersuchten desmosomalen Cadherine erkennbar. Diese Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen an NHEKs überein (Abb. 10, basale Kondition=clgG). Schon aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich ableiten, dass die Ursache für die durch ADAM10-Inhibition verbesserte basale Zelladhäsion bei den primären humanen Zellen nicht in einer alternierten EGFR-Aktivierung liegt, weder an der Src-abhängigen, noch an der Src-unabhängigen Phosphorylierungsstelle, und auch nicht in einer Veränderung von Menge oder Verteilung der desmosomalen Cadherine.

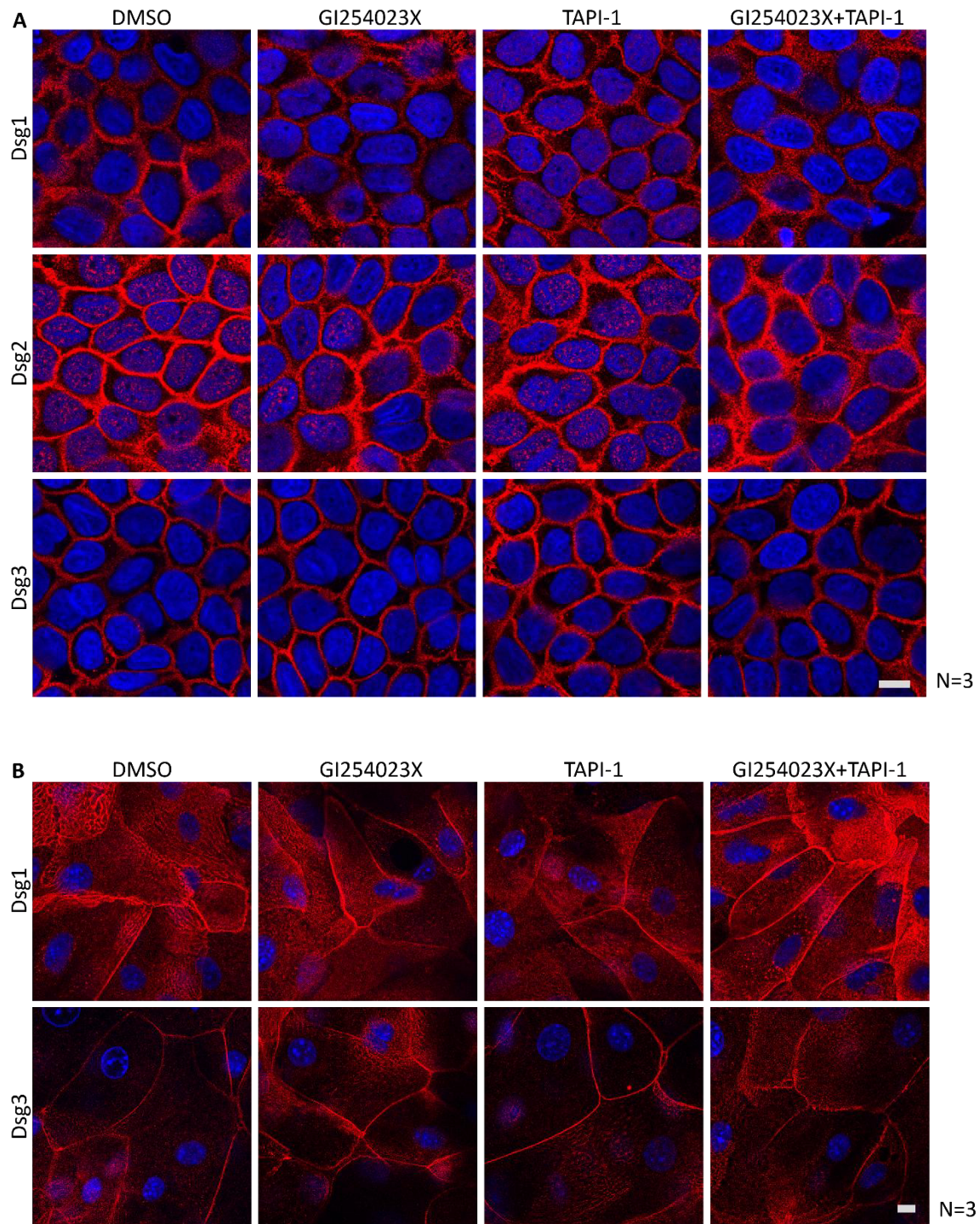


Abbildung 7: Repräsentative Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung nach ADAM-Inhibition sowie unter basalen Bedingungen.

Sowohl bei HaCaTs (**A**) als auch bei MEKs (**B**) können nach Inkubation mit ADAM10- und/oder ADAM17-Inhibitoren keine Alterationen in Menge, Verteilung oder Anordnung der typischen Vertreter der desmosomalen Cadherine Dsg1-3 festgestellt werden (Maßstab 10µm, GI254023X=ADAM10-Inhibitor, TAPI-1=ADAM17-Inhibitor, DAPI-Cofärbung).

4.1.3 Induktion von Hyperadhäsion durch ADAM10-Inhibition

Die in 4.1.1 und 4.1.2 dargestellten Versuche haben gezeigt, dass ADAM10-Inhibition die basale Zelladhäsion in NHEKs verbessert. Da die Proteinmenge und -verteilung von Dsg1 und Dsg3 sowie auch die EGFR-Aktivierung an den untersuchten Stellen allerdings unverändert blieb, stellt sich die Frage, worin die Ursache für diese Verbesserung liegt. Wie bereits unter 1.3.2.2 erläutert können Desmosomen in einen besonders adhäsiven, Ca^{2+} -unabhängigen Zustand versetzt werden, der als Hyperadhäsion bezeichnet wird. Vermehrtes Vorkommen von hyperadhäsiven Desmosomen ist eine mögliche Erklärung für eine verstärkte Keratinozytenadhäsion. Dementsprechend wurde im Folgenden untersucht, ob die ADAM10-Inhibition in der Lage ist, Hyperadhäsion zu induzieren.

MEKs und HaCaTs zeigten keine signifikante Veränderung in der Anzahl der Zellfragmente (Abb. 8A, B, D). Demnach kann davon ausgegangen werden, dass die Zelladhäsion im Vergleich zu basalen Bedingungen nicht signifikant verändert ist, also für diese Zelllinien nicht von einer Induktion der Hyperadhäsion durch ADAM10- oder ADAM17-Inhibition ausgegangen werden kann. Dies stimmt überein mit den Ergebnissen aus den Zelldissoziationsversuchen unter basalen Bedingungen (s. 4.1.1), denn auch hier zeigte sich durch die Inhibition weder von ADAM10 noch von ADAM17 eine Modifikation der Zelladhäsion bei MEKs und HaCaTs (Abb. 5A, B).

In primären Keratinozyten (NHEKs) dagegen sorgte der ADAM10-Inhibitor für eine signifikant verbesserte Zelladhäsion unter Ca^{2+} -Entzug (Abb. 8C, D). Diese durch ADAM10-Inhibition im Vergleich zur Kontrolle hervorgerufene Reduktion der entstandenen Zellverbund-Fragmentanzahl deutet darauf hin, dass die Inhibition von ADAM10 einen Ca^{2+} -unabhängigen Mechanismus der Zellhaftung, die Hyperadhäsion, verstärkt. Das lässt darauf schließen, dass ausschließlich die Inhibition von ADAM10, und auch das nur in primären, nicht in immortalisierten Zellen, in der Lage ist, eine Hyperadhäsion der vorhandenen Desmosomen zu erreichen. Damit lässt sich die durch ADAM10-Inhibition verbesserte basale Zelladhäsion der NHEKs erklären.

Auch für den ADAM17-Inhibitor wurde eine unter Ca^{2+} -Entzug im Vergleich zur Kontrolle deutlich verstärkte Zelladhäsion festgestellt (Abb. 8C, D). Dieser Effekt war sogar stärker ausgeprägt, obwohl unter basalen Bedingungen keinerlei Auswirkungen durch den ADAM17-Inhibitor nachweisbar waren.

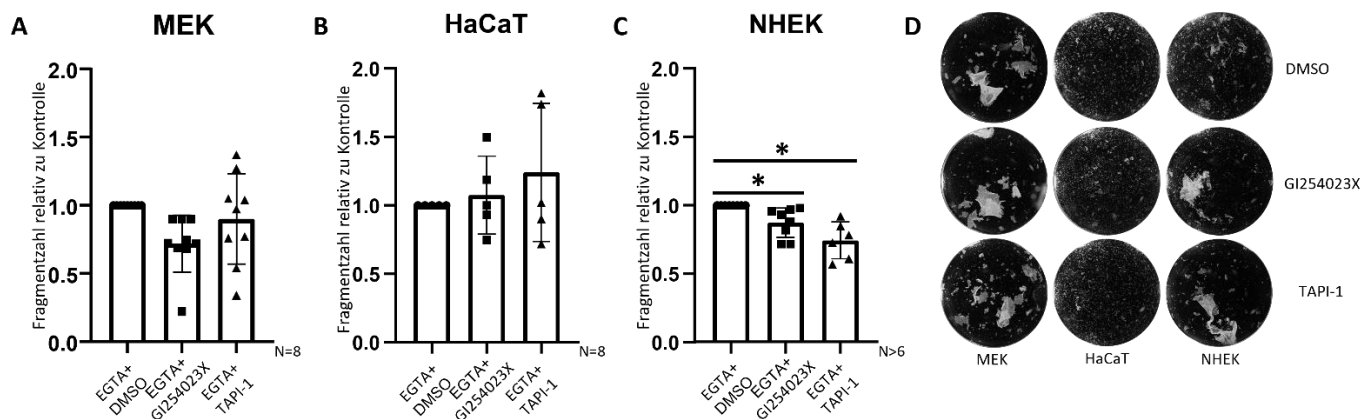


Abbildung 8: Statistische Auswertung sowie repräsentative Bilder der Zelldissoziationsassays von NHEKs, MEKs und HaCaTs unter Bedingungen der Hyperadhäsion.

Die Zelladhäsion blieb auch unter den Bedingungen des Ca^{2+} -Entzugs bei MEKs (**A**) und HaCaTs (**B**) unverändert unter der Inhibition von ADAM10 oder 17. Bei NHEKs (**C**) dagegen zeigte sich im Zelldissoziationsassay unter Ca^{2+} -Entzug durch die ADAM10-Inhibition eine signifikante Verbesserung der Zelladhäsion. Die Inhibition von ADAM17 führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der entstandenen Fragmentanzahl (Ordinary one-way ANOVA, $p=0,0454$ für DMSO vs. GI254023X und $p=0,0003$ für DMSO vs. TAPI-1). Die statistischen Ergebnisse können mithilfe repräsentativer Fotografien der gesicherten Zellmonolayer nachvollzogen werden (**D**). (GI254023X=ADAM10-Inhibitor, TAPI-1=ADAM17-Inhibitor).

4.1.4 Verringerung des PV-Antikörper-induzierten Zelladhäsionsverlustes durch ADAM10-Inhibition

Da in den Versuchen zur basalen Zelladhäsion (s. 4.1.1) festgestellt worden war, dass die ADAM-Inhibition ausschließlich bei den NHEKs Wirkungen zeigte, fanden für die folgenden Versuche ausschließlich diese Zellen Verwendung. Im Tierexperiment konnte bereits bewiesen werden, dass ADAM10-Inhibition einen protektiven Effekt auf den PV-induzierten Haftungsverlust in der Haut hat (Ivars et al., 2020). Folglich sollte mit den im folgenden beschriebenen Experimenten untersucht werden, ob eine derartige protektive Wirkung auch auf zellulärer Ebene auftritt. Der Schritt vom Tiermodell zurück in die Zellkultur war wichtig, damit für das Arbeiten ein Modellorganismus zur Verfügung steht, der in großen Mengen für Versuche unter verschiedenen Konditionen vorhanden ist und auf einfache Weise (durch Zugabe von Mediatoren) in seiner Gesamtheit beeinflusst werden kann.

Wie schon für die Zelladhäsionsversuche unter basalen Bedingungen erfolgte die Inkubation mit den ADAM-Inhibitoren für 24 h. Zeitgleich mit den ADAM-Inhibitoren wurden aus Blutseren gewonnene (Auto-)Antikörper zugegeben; dabei handelt es sich hauptsächlich um Immunglobuline vom Typ IgG. Die Blutseren der Pemphigus-Patienten enthalten Autoantikörper-Gemische, sodass Antikörper gegen diverse desmosomale wie auch nicht

desmosomale Proteine vorkommen, einschließlich der Autoantikörper gegen Dsg1 und Dsg3. Zur Induktion eines Pemphigus-Phänotyps wurde das Serum von an PV leidenden Patienten verwendet (PV-IgG). Um auszuschließen, dass allein das Vorhandensein von Immunglobulinen bereits zellbiologische Prozesse hervorruft, die als Effekt der PV-IgGs missinterpretiert werden könnten, wurde im Kontrollversuch Serum verwendet, das von mehreren gesunden Spendern gewonnen und gepoolt worden war (clgG).

Die Inkubation von Zellen mit dem IgG von einem an PV erkrankten Patienten (PV-IgG, hoher Dsg3-Titer, Dsg1-Titer dagegen sehr niedrig, Tabelle 7) diente der Induktion eines PV-vergleichbaren Phänotyps. Daher wurde die Zelladhäsion der NHEKs durch diese Inkubation im Vergleich zur Inkubation mit dem clgG der gesunden Spender signifikant reduziert. Das zeigt sich darin, dass es bei PV-IgG-Inkubation zu einem signifikanten Anstieg der nachgewiesenen Zellfragmentanzahl kam (Abb. 9). Durch die Verwendung eines ADAM10-Inhibitors zusammen mit dem PV-IgG konnte diese verminderte Adhäsion verbessert werden, die Zellfragmentzahl reduzierte sich signifikant gegenüber der alleinigen Inkubation mit PV-IgG. Aus diesen Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass es möglicherweise durch das verwendete PV-IgG zu einer Aktivierung von ADAM10 kommt. Wird ADAM10 dann inhibiert, ist es möglich, die Keratinozytenadhäsion signifikant zu verbessern. Jedoch werden die Ausgangswerte nicht erreicht. Die Erklärung hierfür liegt wohl darin, dass durch die PV-IgGs neben der ADAM10-Aktivierung noch andere Adhäsions-destabilisierende Signalwege in Gang gesetzt werden. Die Inkubation mit einem ADAM17-Inhibitor hatte dagegen keinen protektiven Effekt auf den durch PV-IgG induzierten Adhäsionsverlust.

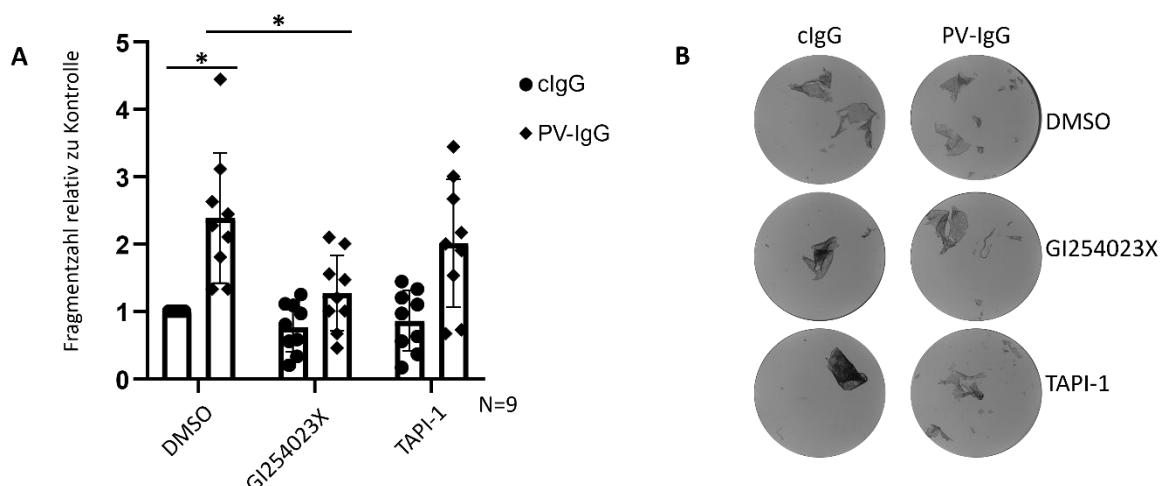


Abbildung 9: Zelldissoziationsassay mit NHEKs nach Inkubation von PV-IgG oder clgG und ADAM-Inhibitoren für 24 h.

Die Patientenantikörper (PV-IgG) verursachten eine signifikant verschlechterte Zelladhäsion gegenüber dem clgG (2way ANOVA, $p=0,0005$). Die Verwendung von ADAM10-, nicht aber von ADAM17-Inhibitoren, führte zu einer signifikanten Reduktion der PV-IgG induzierten Zellfragmentierung ($p=0,009$). GI254023X=ADAM10-Inhibitor, TAPI-1=ADAM17-Inhibitor) (modifiziert nach (Kugelmann et al., 2022)).

Nachdem nun festgestellt worden war, dass es vermutlich durch PV-IgG induzierte ADAM10-Aktivierung zum Zelladhäsionsverlust kommt, lag es nahe, im nächsten Schritt den dazu führenden Mechanismus zu untersuchen: Auf welchem Weg trägt durch PV-IgG aktiviertes ADAM10 zum Zelladhäsionsverlust bei? Welche Proteine werden durch die Inhibition von ADAM10 so verändert, dass es zu einer verbesserten Zelladhäsion kommt? Vielversprechende Kandidaten für solche Proteine waren dabei die desmosomalen Cadherine Dsg1 und Dsg3, denn diese Proteine werden, wie einschlägig bekannt, einerseits durch PV-IgG angegriffen und andererseits durch die ADAMs modifiziert.

Es wurden Immunfärbungen von Dsg1 und Dsg3 durchgeführt, entsprechend den Dissoziationsversuchen unter der Verwendung von clgG oder PV-IgG in Kombination mit den ADAM-Inhibitoren. In Abb. 10 sind die für die Induktion eines PV-Phänotyps durch Inkubation der Zellen mit PV-IgG typischen Veränderungen der desmosomalen Cadherine deutlich zu erkennen: Die Färbungen der an den Zellgrenzen lokalisierten desmosomalen Cadherine Dsg1 und Dsg3 erscheinen fragmentiert. Die lineare, signalintensive Anordnung von Dsg1 und Dsg3 entlang der gesamten Zellgrenze unter Kontrollbedingungen (clgG) ist unter PV-IgG immer wieder unterbrochen (Abb. 10). Zudem zeigt sich an der Abnahme der Intensität im Vergleich zur Färbung unter Kontrollbedingungen, dass deutlich weniger Dsg1 vorhanden ist. Fragmentierung der Dsgs und Reduktion der Dsg-Menge konnten durch die zeitgleiche Verwendung des ADAM17-Inhibitors nicht verhindert werden. Die Inkubation mit ADAM10-Inhibitor zeigte dagegen deutliche Effekte im Sinne einer Reduktion der PV-induzierten Dsg3- und Dsg1-Fragmentierung. Zudem ist erkennbar, dass es unter ADAM10-Inhibition zu einer Zunahme von Dsg3 wie auch Dsg1 gegenüber den nur mit PV-IgG inkubierten Zellen kommt (Abb. 10). Für Dsg3 ist zu sehen, dass die ADAM10-Inhibition an einigen Stellen (grüne Pfeile) beinahe eine ununterbrochene, lineare Anordnung an den Zellgrenzen verursacht, auch wenn das Kontrollniveau bei clgG- und Kontrollinkubation mit DMSO nicht vollständig erreicht werden kann. Die Dsg1-Färbung zeigt dagegen unter ADAM10-Inkubation eine vermehrte und auch weniger, immer noch aber deutlich, fragmentierte Anordnung am Rand der Zellen. Die durch ADAM10-Inhibition hervorgerufenen protektiven Effekte auf die PV-induzierte Reduktion und Fragmentierung der desmosomalen Cadherine Dsg1 und Dsg3 sind für Dsg3 markanter als für Dsg1.

Die Ergebnisse von Zelldissoziationsversuchen und Immunfluoreszenzuntersuchungen unter ADAM-Inhibition mit PV-/clgG-Inkubation legen nahe, dass der Zelladhäsionsverlust durch das verwendete PV-IgG zumindest teilweise durch ADAM10 vermittelt ist. Die ADAM10-Aktivierung scheint eine Reduktion von Dsg3 und Dsg1 zu verursachen, was in Einklang damit steht, dass es sich bei ADAM10 um eine Sheddase handelt, zu deren Substraten desmosomale Cadherine zählen (Cirillo & Prime, 2021; Edwards et al., 2008). Diese Reduktion von Dsg3 und Dsg1 könnte dann zum Adhäsionsverlust führen und durch Inhibition der Sheddase verhindert werden.

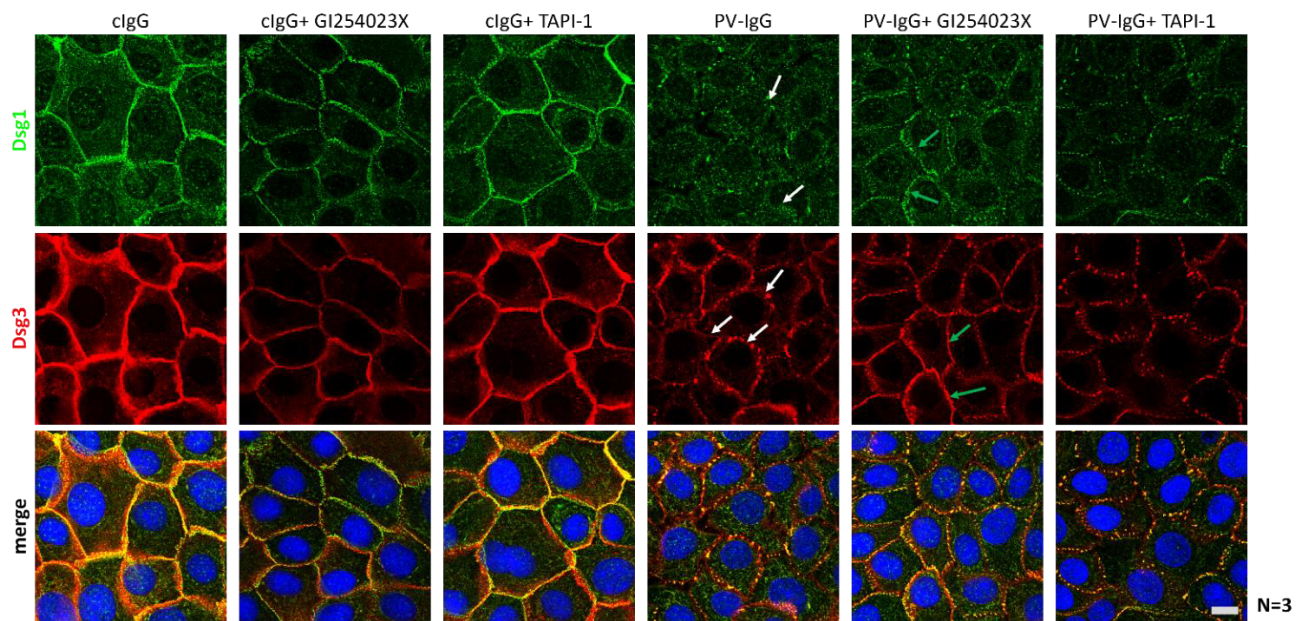


Abbildung 10: Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen von NHEKs unter ADAM-Inhibition bei gleichzeitiger Inkubation mit clgG oder PV-IgG.

Durch die Inkubation der NHEKs mit PV-IgG kam es zu einer Fragmentierung und Reduktion der desmosomalen Cadherine Dsg1 und Dsg3 (weiße Pfeile). Eine gleichzeitige Inkubation des ADAM10-Inhibitors mit dem PV-IgG, führte zu einer deutlichen Reduktion der Fragmentierung von Dsg1 und Dsg3 (grüne Pfeile). Der ADAM17-Inhibitor hatte keinen Effekt auf die PV-IgG-induzierte Dsg-Fragmentierung. Die Inkubation von ADAM-Inhibitoren unter Kontrollbedingungen ohne Einsatz von PV-IgG zeigt keinerlei Alterationen in Verteilung, Menge oder Anordnung von Dsg1 oder Dsg3 (Maßstab 10 µm). (GI254023X=ADAM10-Inhibitor, TAPI-1=ADAM17-Inhibitor, DAPI-Cofärbung). (modifiziert nach (Kugelman et al., 2022)).

4.1.5 Abhängigkeit der adhäsionsstabilisierenden Wirkung durch ADAM10-Inhibition von Dsg 3

Die vorangegangenen Versuche der ADAM-Inhibition bei gleichzeitiger Inkubation mit einem PV-IgG haben gezeigt, dass durch das PV-IgG hervorgerufene Effekte wie Zelladhäsionsverlust und Dsg1- sowie Dsg3-Reduktion und Fragmentierung durch eine Inhibition von ADAM10 zum Teil aufgehoben werden können. Ein PV-Patientenserum enthält Autoantikörper, die gegen diverse Proteine gerichtet sind, folglich lässt sich nicht genau sagen, welche Antikörper für den Mechanismus des Adhäsionsverlustes verantwortlich sind, der durch ADAM10-Inhibition teilweise kompensiert werden kann. Bei dem verwendeten Patientenserum war auffällig, dass ein hoher ELISA-Wert für aDsg3-Antikörper vorliegt (Tab. 7). Deshalb lag die Vermutung nahe, dass vor allem die aDsg3-Autoantikörper entscheidend waren. Diese These wurde überprüft, indem anstatt des PV-IgG ein monoklonaler, gegen Dsg3 gerichteter Mausantikörper (AK23) für den Zelldissoziationsassay verwendet wurde. Dabei war der Antikörper in PBS gelöst und wurde in einer Konzentration von 75 µg/ml eingesetzt. Es zeigte sich, dass AK23

erwartungsgemäß eine Zellfragmentierung verursachte (Abb. 11). Diese konnte durch die gleichzeitige Inhibition von ADAM10 reduziert werden. Auch hier konnte das Kontrollniveau nicht erreicht werden. Im Ergebnis zeigt dieser Versuch, dass die von PV-IgG verursachte ADAM10-Aktivierung Dsg3-abhängig ist. Die anti-Dsg3-Antikörper schwächen die Zelladhäsion allerdings nicht nur über die ADAM10-Aktivierung, weshalb durch deren Inhibition zwar eine Verbesserung der Adhäsion, nicht aber eine völlige Neutralisation der Wirkung weder von PV-IgG noch von AK23 erreicht werden kann.

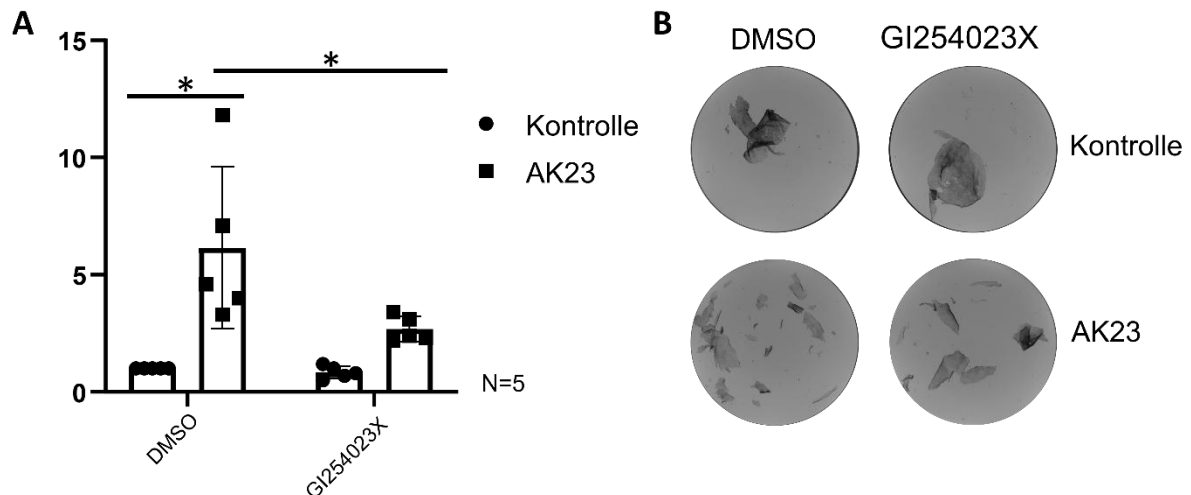


Abbildung 11: Zelldissoziationsassay von NHEKs nach Inkubation von AK23 und ADAM10-Inhibitor für 24 h.

Die von AK23 verursachte signifikante (2way ANOVA, $p=0,0016$) Abnahme der interzellulären Adhäsion wird durch die Applikation des ADAM10-Inhibitors teilweise aufgehoben, was sich in einer signifikanten Reduktion der Fragmentanzahl widerspiegelt ($p=0,0387$) (A). Diese Veränderungen sind auch auf den repräsentativen Fotoaufnahmen der Zellmonolayer zu sehen, die direkt nach Applikation des definierten Scherstressses aufgenommen wurden (B). (GI254023X=ADAM10-Inhibitor, TAPI-1=ADAM17-Inhibitor).

Die Zusammenfassung der Ergebnisse der unter 4.1 beschriebenen Versuche ergibt, dass eine ADAM10-Inhibition einerseits die basale Zelladhäsion durch Induktion von Hyperadhäsion verbessert. Andererseits ist ADAM10 für einen PV-IgG-induzierten, dabei hauptsächlich von Dsg3 abhängigen, Zelladhäsionsverlust verantwortlich. Inhibition von ADAM10 ermöglicht eine teilweise Kompensation dieses Haftungsverlustes. ADAM17 spielt dagegen eine untergeordnete Rolle.

4.2 Charakterisierung der Cortactin-defizienten Maus-Zelllinie

Im ersten, eben beschriebenen, Teil dieser Arbeit wurde ersichtlich, dass Dsg3 eine bedeutende Rolle für die Zelladhäsion spielt und dabei ein Zusammenhang mit ADAM10 besteht. Durch ADAM10-Inhibition konnten unter basalen Bedingungen keine Alterationen in Dsg1- und Dsg3-Gesamtmenge sowie -Verteilung, und auch nicht in der EGFR-Aktivität, nachgewiesen werden. Es ist aber bekannt, dass ADAM10 nicht nur in Signalwege mit Dsg3, sondern auch mit EGFR eingebunden ist (Cirillo & Prime, 2021; Ivars et al., 2020). Zudem ist davon auszugehen, dass Dsg3 und EGFR mit dem zytosolischen Aktin-bindenden Protein Cortactin interagieren (Bissinger et al., 2017; Kugelman et al., 2019b; Rötzer, 2015). Vorversuche konnten einen Zusammenhang von Cortactin (Cttn) und Src zeigen. Dabei wurde festgestellt, dass für die Kompensation von Langzeiteffekten von AK23 sowohl Cttn, als auch Src nötig sind (Kugelman et al., 2019b). Deswegen liegt im folgenden zweiten Untersuchungsabschnitt der vorliegenden Arbeit der Fokus auf Cortactin und dessen Rolle für die interzelluläre Haftung.

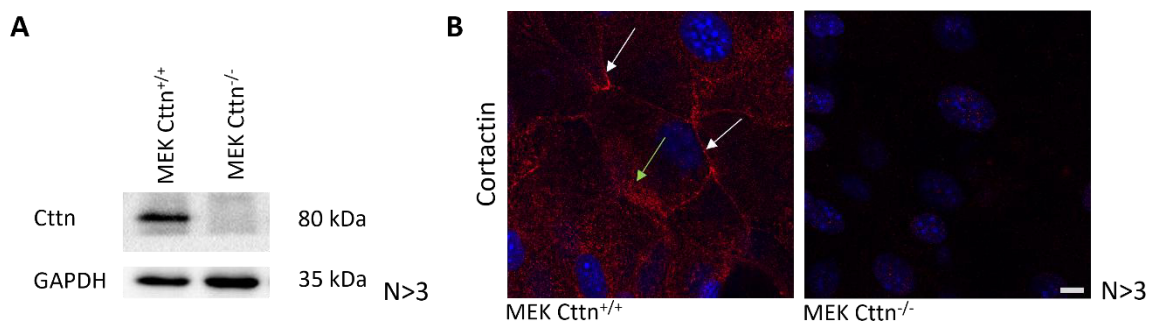


Abbildung 12: SDS-Lysate in der Western Blot-Analyse und Cttn-Immunfärbung von Cttn-Wildtyp-Zellen und -Knock-Out-Zellen im Vergleich.

Die Wildtyp-Zelllinie zeigte in der Western Blot-Analyse bei 80 kDa, der für Cttn erwarteten Molekülmasse, eine deutliche farbintensive schwarze Bande. Bei gleichzeitigem Nachweis von in etwa gleichen Proteinmengen durch die Ladekontrolle mittels GAPDH fehlt diese Bande für die Cttn Knock-Out-Zellen (A). Zudem zeigten sich bei den Wildtyp-Zellen spezifische Signale in der Immunfluoreszenzmikroskopie, wie erwartet entlang der Zellgrenzen (weiße Pfeile), aber auch zytosolisch (grüner Pfeil). Dagegen sind bei der Knock-Out-Zelllinie mit beiden Proteinnachweismethoden keine Signale erkennbar (B) (Maßstab 10 μm).

Um die Bedeutung von Cttn für die Zelladhäsion zu untersuchen, wurde eine Cttn-defiziente MEK-Zelllinie verwendet. Die Isolation der Zellen wurde bereits vor Beginn der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Der Nachweis der Cttn-Defizienz erfolgte mittels Proteinnachweis über den Western Blot von SDS-Lysaten sowie mittels Immunfluoreszenzmikroskopie. Sowohl die Antikörper-vermittelte Proteindetektion in der Western Blot-Analyse, als auch die

Immunfärbung bestätigen die Cortactin-Defizienz. In der Western Blot-Analyse war keine Proteinbande auf der für Ctn erwarteten Höhe vorhanden, die Immunfärbung zeigte im Vergleich zum WT nur unspezifische Signale. Deshalb kann von einer vollständigen Defizienz ausgegangen werden.

4.2.1 Zelladhäsionsverlust durch Cortactin-Defizienz

Die Ctn-defizienten Zellen wurden einem Zelldissoziationsversuch unterzogen. Dieser sollte zeigen, ob und in welchem Ausmaß die Zelladhäsion von Ctn-defizienten Zellen verändert ist.

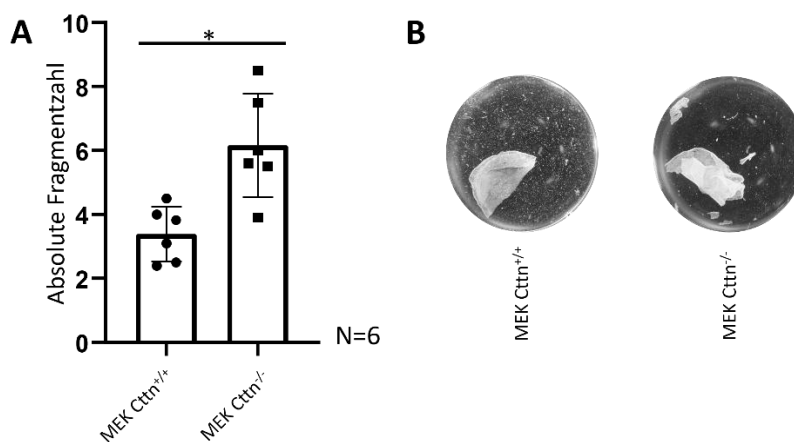


Abbildung 13: Statistische Auswertung sowie repräsentative Bilder vom Zelldissoziationsassay mit MEK-Wildtyp- und Ctn-Knock-Out-Zellen.

Die Ctn-defizienten Zellen zeigen im Zelldissoziationsassay eine deutlich reduzierte Zelladhäsion. Erkennbar ist das an der signifikant (unpaired t-test, $p=0,01861$) erhöhten Anzahl der entstandenen Zellfragmente (**A**). Die repräsentative Fotoaufnahmen (**B**) zeigen, dass bei den Wildtyp-Zellen zwar einzelne Zellen aus dem Zellverbund herausgelöst werden, was bei allen vergleichbaren Untersuchungen festgestellt werden konnte, der Zellverbund aber weitgehend intakt bleibt. Dagegen sind bei den Ctn-defizienten Zellen einige große Fragmente des Zellverbunds erkennbar, was für eine reduzierte Zelladhäsion bei den Knock-Out-Zellen spricht.

Es konnte festgestellt werden, dass der Zellverbund der Ctn-defizienten Zellen nach Applikation des definierten Scherstress in deutlich mehr größere Fragmente zerfiel, verglichen mit den Wildtyp-Zellen (Abb. 13). Folglich führt das Fehlen von Ctn zu einer signifikant herabgesetzten Zelladhäsion.

4.2.2 Einfluss der Cortactin-Defizienz auf die Zellkontakte

Im Folgenden wurde untersucht, ob es in den Ctn-defizienten Zellen zu einer Veränderung der Zellkontakte kommt. Dafür wurde eine Untersuchung der Proteinausstattung der Zellen bezüglich einiger Adhäsionsproteine durchgeführt, sowohl mittels Western Blot-Analyse als auch mittels Immunfluoreszenzmikroskopie. Dabei wurden SDS-Lysate, aber auch die Triton-Fraktionierung angewendet, um eine Unterscheidung der zytoskelettal-assoziierten (Triton-unlöslichen) sowie der zytosolischen (Triton-löslichen) Proteine zu ermöglichen. Die Ergebnisse der Versuche sind unterteilt nach den beiden Typen der Haftkontakte, Adhärensjunktionen und Desmosomen; zudem sind die Verschlusskontakte dargestellt.

4.2.2.1 Desmosomen

Für ein genaueres Verständnis der Pathogenese von PV sind weitere Erkenntnisse bezüglich der durch die vorkommenden Autoantikörper ausgelösten Signalwege von besonderer Wichtigkeit. Aus vorangegangenen Untersuchungen geht hervor, dass Cortactin mit Dsg3 an den Zellgrenzen kolokalisiert ist und für das Vorhandensein von intakten Desmosomen bedeutsam ist (Kugelman et al., 2019b). Neben Dsg3 sind das desmosomale Cadherin Dsg1 und auch der Wachstumsfaktorrezeptor EGFR und die MAP-Kinasen Erk 1/2 von zentraler Bedeutung (Walter et al., 2019). Deshalb waren die Untersuchungen zu den desmosomalen Proteinen Dsg1, Dsg3 und auch Dsc3, sowie von EGFR und Erk 1/2 bei den Ctn-defizienten Zellen verglichen mit den entsprechenden Wildtyp-Zellen von besonderem Interesse. Diese Untersuchungen sind Gegenstand des vorliegenden Abschnitts.

Im ersten Schritt wurden die desmosomalen Cadherine Dsg1 und Dsg3 bezüglich ihrer Quantität und lokalen Verteilung untersucht. Für die quantitativen Analysen wurden SDS-Lysate mittels Western Blot analysiert und Immunfärbungen angefertigt. Diese erlaubten eine erste Einschätzung der Verteilung der Proteine. Um diese exakt quantifizierbar zu erfassen, wurden zudem die Triton-X-Fraktionierung durchgeführt. Damit konnten die Proteine in eine zytoskelettal-assoziierte Fraktion (Triton-unlöslich) und eine zytosolische Fraktion (Triton-löslich) aufgeteilt werden.

Dabei zeigte sich durch die Analyse der SDS-Lysate im Western Blot, dass für Dsg3 in Wildtyp- und Knock-Out-Zellen die vorkommende Menge etwa gleich war (Abb. 14 A). Auch in der Triton-X-Fraktionierung konnten keine Alterationen bezüglich Dsg3 festgestellt werden (Abb. 14 C). Die Gesamtmenge an Dsg3 und die Menge an zytoskelettalem und auch zytosolischem Dsg3 sind bei Wildtyp und Knock-Out-Zellen unverändert. Die Lokalisation und Anordnung von Dsg3 in den murinen Keratinozyten wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht, um festzustellen, ob hier Veränderungen erkennbar sind, die die herabgesetzte Zelladhäsion der Ctn-defizienten Zellen erklären könnten. Hier konnte auch kein Unterschied zwischen Zellen mit und ohne Cortactin festgestellt werden (Abb. 16).

Die Untersuchung des desmosomalen Cadherins Dsg1 zeigte, dass in den Ctnn-defizienten Zellen Dsg1 signifikant reduziert vorkommt. In der Western-Blot-Analyse der SDS-Lysate ist diese Reduktion sehr deutlich erkennbar (Abb. 14 A). Durch die im Anschluss durchgeführten Triton-Analysen konnte nachgewiesen werden, dass auch hier Dsg1 bei der Knock-Out-Zelllinie deutlich reduziert ist. Das trifft vor allem auf Dsg1 zu, welches mit dem Zytoskelett assoziiert ist während zytoplasmisches Dsg1 kaum nachzuweisen ist (Abb. 14 C). Die Dsg1-Reduktion der Ctnn-defizienten Zellen sowohl in den SDS- als auch in den Triton-Analysen ist signifikant (Abb. 14 B, D).

Wie die quantitativen Analysen von Dsg1 bereits vermuten ließen, zeigte sich auch in der Immunfluoreszenzmikroskopie eine Verminderung von Dsg1 in den Ctnn-defizienten Zellen (Abb. 16). Zudem konnte eine in geringem Maß diffusere Verteilung von Dsg1 bei den Knock-Out-Zellen beobachtet werden. Weitere Veränderungen, wie eine Fragmentierung der Färbung von Dsg1 oder eine Cluster-Bildung, waren nicht zu erkennen (Abb. 16).

Das desmosomale Cadherin Dsc3 zeigte zwischen Wildtyp- und Knock-Out-Zellen weder in der Western Blot-Analyse von Lysaten aus SDS- und Triton-X vermittelter Proteinextraktion noch in der Immunfluoreszenzmikroskopie signifikante Veränderungen (Abb. 14, 16).

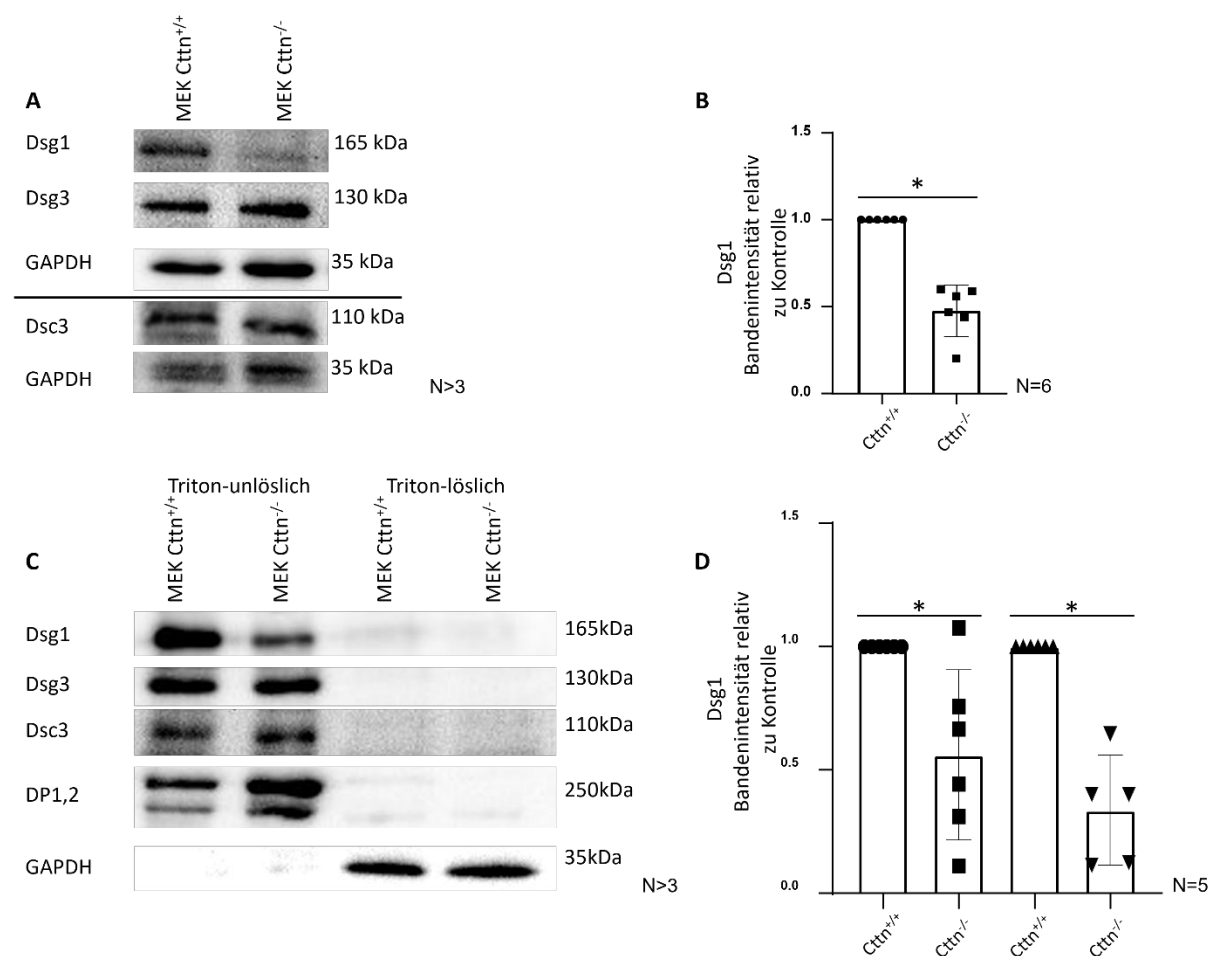


Abb. 14: Repräsentative Western-Blot-Analysen von SDS- und Triton-Lysaten einiger desmosomaler Cadherine sowie statistische Auswertung der signifikant veränderten Proteine.

Die Analyse von SDS-Lysaten zeigt, dass bezüglich der Gesamtproteinmenge von Dsg3 und Dsc3 keine Unterschiede zwischen den Zellen mit und ohne Ctnn-Defizienz vorliegen **(A)**. Dagegen ist das desmosomale Cadherin Dsg1 bei den Ctnn-defizienten Zellen bezogen auf die Ladekontrolle GAPDH signifikant reduziert (Unpaired t-test, $p < 0,0001$) **(A, B)**. Die Fraktionierung der desmosomalen Cadherine mittels Triton X zeigt, dass vor allem der zytoskelettal gebundene Teil von Dsg1 bei den Zellen ohne Ctnn reduziert ist, wohingegen die zytosolische Fraktion bereits bei den Wildtyp-Zellen kaum nachweisbar ist, aber wiederum bei den Ctnn-Knock-Out Zellen noch weiter reduziert ist **(C)**. Als Ladekontrolle für die zytosolische Fraktion diente wie für die SDS-Lysate GAPDH, für die zytoskelettal-assoziierte Fraktion wurden Desmoplakin 1/2 verwendet. Dieser Unterschied ist sowohl für die zytoskelettale als auch für die zytosolische Fraktion signifikant (Ordinary one-way ANOVA, $p = 0,0088$ für die zytoskelettal assoziierte Proteinfraction, Ordinary one-way ANOVA $p = 0,0002$ für die zytosolische Fraktion) **(D)**. Die anderen untersuchten desmosomalen Cadherine Dsg3 und Dsc3 sind wie schon bei der Analyse der SDS-Lysate bei den Ctnn-defizienten Zellen unverändert **(C)**.

Es ist bereits bekannt, dass Antikörper von Pemphigus-Patienten in der Lage sind, eine Aktivierung von Erk1/2 in HaCaTs hervorzurufen, wenn Patientenantikörper gegen Dsg1 vorhanden sind (Walter et al., 2017). Daher liegt es nahe, einen Zusammenhang zwischen Dsg1 und Erk1/2 zu vermuten. Folglich wurde hier im nächsten Schritt eine quantitative Analyse der aktivierten Form von Erk1/2 mittels Western Blot von SDS-Lysaten durchgeführt. Als Maß für die Aktivierung von Erk1/2 wurde die Phosphorylierung an den Stellen Threonin in der Position 202 für Erk1 und Tyrosin in der Position 204 für Erk2 (pErk1/2) untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass simultan zur Reduktion von Dsg1 in den Ctnn-defizienten Zellen auch die Aktivierung von Erk1/2 deutlich reduziert ist (Abb. 15A). Wie bereits bei der Dsg1-Reduktion konnte auch für die Verringerung der pErk1/2-Menge bei den Knock-Out-Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 15C, D).

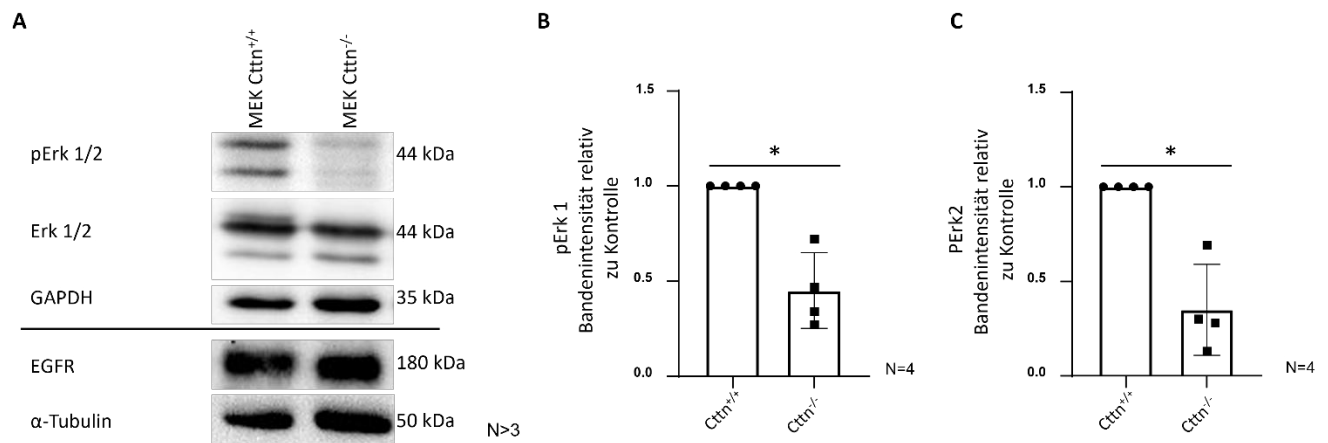


Abb. 15: Repräsentative Western-Blot-Analysen von SDS-Lysaten der desmosomalen Signalmoleküle pErk1/2 und EGFR.

Die phosphorylierten, also aktivierten Formen von Erk1/2 sind bei dem Ctn-defizienten Zellen erkennbar reduziert (**A**), dieser Unterschied ist bezüglich beider Proteine signifikant (Unpaired *t*-test, $p=0,0014$ für pErk1, Unpaired-*t* test: $p=0,0016$ für pErk2). Dabei wurden die Werte für pErk1/2 auf die jeweils nicht phosphorylierten Formen von Erk1/2 als Ladekontrolle bezogen (**B, C**).

Für EGFR, welcher ebenfalls an der Regulation der Desmosomen beteiligt ist, zeigen sich dagegen keine Veränderungen in der Expressionsmenge (**A**), als Ladekontrolle diente hier α -Tubulin.

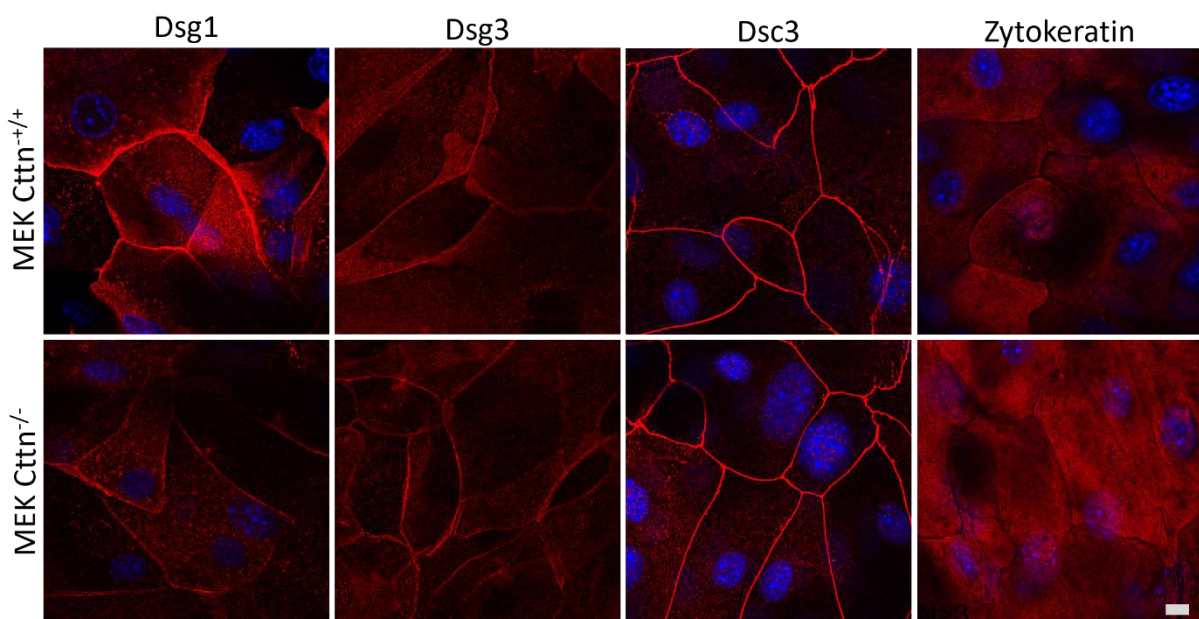


Abb. 16: Repräsentative Aufnahmen aus der Immunfluoreszenzmikroskopie für verschiedene desmosomale Cadherine sowie Zytokeratin.

Die Aufnahmen der Immunfluoreszenzmikroskopie zeigen für die desmosomalen Cadherine das den SDS-Analysen und der Triton X-Fraktionierung entsprechende Bild: Dsg3 und Dsc3 sind bei den Ctn-defizienten Zellen nahezu unverändert. Die Färbung von Dsg1 zeigt eine deutliche Reduktion dieses desmosomalen Cadherins in den Ctn-defizienten Zellen. (Maßstab 10µm).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sich die reduzierte Zelladhäsion in den Ctn-defizienten Zellen mit Veränderungen in der Ausstattung der desmosomalen Proteine erklären lässt. Die größte Bedeutung hinsichtlich dieser Veränderung kommt dem Dsg1 zu, auch die Aktivierung von Erk1/2 scheint eine Rolle zu spielen. Weitere für die desmosomale Integrität bedeutsame Proteine wie Dsg3, Dsc3 und EGFR sind dagegen in Ctn-Knock-Out-Zellen nicht verändert.

4.2.2.2 Adhärensjunktionen

Bei der Untersuchung der Adhärensjunktionen war das für die Epidermis typische Cadherin, E-Cadherin, von Interesse, da eine Veränderung in der Expression dieses Proteins eine modifizierte Zelladhäsion bedeuten könnte. Es zeigte sich in der Western Blot-Analyse, dass kein quantitativer Unterschied zwischen Wildtyp- und Knock-Out-Zellen bestand (Abb. 17A). Mittels Triton-Fraktionierung wurde ermittelt, dass auch in der Kompartimentierung von E-Cadherin keine Unterschiede zwischen beiden Zelllinien festzustellen waren (Abb. 17 B). In beiden Zelllinien war E-Cadherin in gleicher Menge ganz überwiegend in der Triton-unlöslichen Fraktion nachweisbar. Diese Erkenntnis wird dadurch gestützt, dass sich in der Immunfluoreszenzmikroskopie E-Cadherin bei den Wildtyp-Zellen und Ctn-defizienten-Zellen ohne merkliche Unterschiede darstellt (Abb. 17 C). In der Immunfluoreszenzmikroskopie wurde zusätzlich zu E-Cadherin auch noch ein Plaqueprotein der Adhärensjunktionen, Plakoglobin, untersucht. Auch bezüglich dieses Proteins zeigten sich keinerlei Veränderungen (Abb. 17 C).

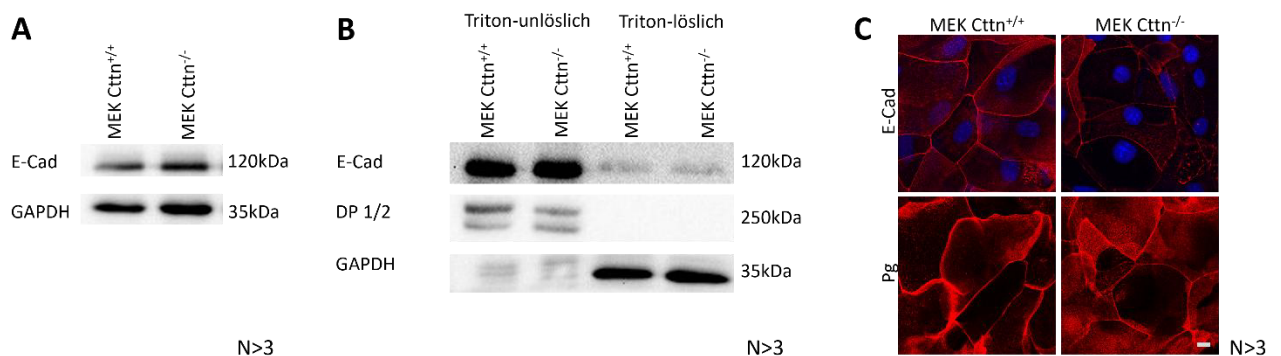


Abbildung 17: SDS- und Triton-Proteinextraktion von E-Cadherin sowie repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen von E-Cadherin und Plakoglobin.

Die Western Blot-Analysen von SDS- **(A)** und Tritonlysaten **(B)** wie auch die Immunfluoreszenzdarstellung **(C)** zeigen, dass die Menge wie auch die Verteilung von E-Cadherin sich in den Ctnn-Knock-Out-Zellen kaum vom Wildtyp unterscheiden. In der Immunfluoreszenzmikroskopie ist erkennbar, dass das auch für Plakoglobin zutrifft. (Maßstab 10µm).

4.2.2.3 Verschlusskontakte

Als Komponente der Tight Junctions wurde zunächst Occludin untersucht. Die quantitative Analyse von Occludin mittels Western Blot von SDS-Lysaten ergab, dass Occludin in den Zellen mit und ohne Cortactin in etwa gleichen Mengen vorkommt (Abb. 18A). Mittels statistischer Analysen konnte dies bestätigt werden (Abb. 18B). Ebenfalls konnte mit der Triton-X-Fraktionierung kein Unterschied in der Menge an zytoskelettal-verankertem sowie frei im Zytosol befindlichem Occludin festgestellt werden (Abb. 18C). Auch die Immunfluoreszenzmikroskopie von Occludin sowie von Claudin 1 und 4, zwei weiteren typischen Vertretern der Transmembranproteine der Tight Junctions, zeigte keine wesentliche Veränderung (Abb. 18D). Cortactin scheint daher für die Integrität der Hautbarriere nicht von zentraler Bedeutung zu sein, soweit es sich durch diese ersten Untersuchungen beurteilen lässt.

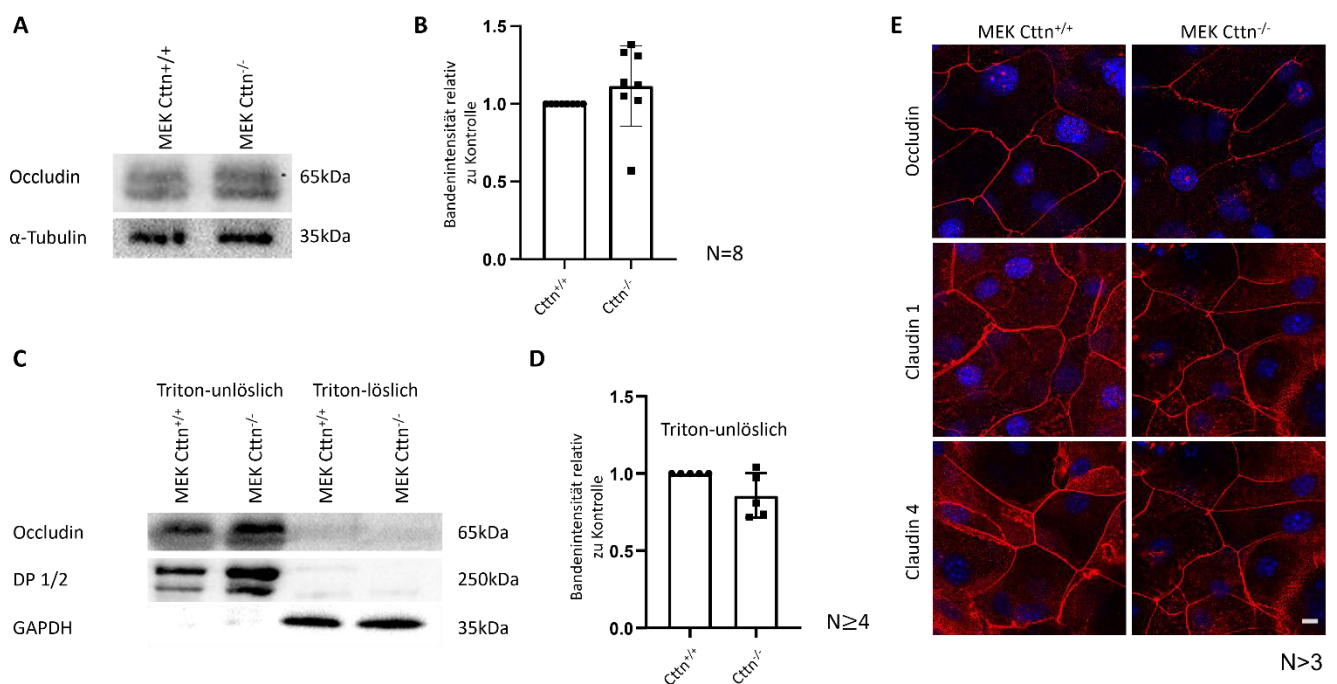


Abbildung 18: Western Blot-Analyse der SDS- sowie Triton-Lysate bezüglich des Tight-Junction-Proteins Occludin, statistische Auswertung der SDS-Lysat- und Triton-Blots sowie repräsentative Bilder aus der Immunfluoreszenzmikroskopie für Occludin, Claudin 1 und Claudin 4.

In den Western Blot-Analysen zeigt sich, dass die Gesamtmenge von Occludin bei Wildtyp- sowie Ctnn-defizienten Zellen ähnlich ist (A). Da in einigen Versuchen die Occludin-Bande bei den Ctnn-defizienten Zellen leicht verstärkt aussah (allerdings die Ladekontrolle α -Tubulin ebenfalls verstärkt schien), wurde eine statistische Analyse durchgeführt (B). Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Bandendichte festgestellt werden (Unpaired t-test). Auch die Triton-Fraktionierung zeigte keine großen Unterschiede zwischen den Wildtyp- und Ctnn-defizienten Zellen bezüglich Occludin (C). Auch hier wurde eine Bandendichtemessung durchgeführt, die ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zeigte (Ordinary one-way ANOVA) (D). Mittels Untersuchungen in der Immunfluoreszenzmikroskopie wurden neben Occludin noch Claudin 1 und Claudin 4 untersucht, welche ebenfalls bei den Wildtyp- und Knock-Out-Zellen unverändert waren (E). (Maßstab 10 μ m).

5 Diskussion

5.1 Rolle von ADAM10 und ADAM17 für die basale Haftung und die Hyperadhäsion

Der Effekt, den ADAM10 und ADAM17 auf die basale Zelladhäsion in Keratinozyten haben, war bisher noch nicht untersucht worden. In den hier durchgeführten Experimenten mit den Inhibitoren für ADAM10 und ADAM17 konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition von ADAM17 keinerlei Effekt auf die basale Zelladhäsion hat, wohingegen sich die Inhibition von ADAM10 positiv auf die basale Zelladhäsion in primären Keratinozyten (NHEKs) auswirkt. Es ist bereits bekannt, dass ADAM10 am Umsatz von Dsg2 beteiligt ist, indem es dieses Protein spaltet (Bech-Serra et al., 2006; Kamekura et al., 2015; Klessner, Desai, Amargo, Getsios & Green, 2009). Es wäre also möglich, dass durch die ADAM10-Inhibition weniger Dsg2 gespalten wird, das folglich für den Einbau in Desmosomen zur Verfügung steht und auf diese Weise eine verbesserte Zellhaftung verursacht. Tatsächlich wurde bereits festgestellt, dass Dsg2 zumindest teilweise den Zelladhäsionsverlust kompensieren kann, der in Folge einer Dsg3-Depletion, wie sie auch durch Autoantikörper bei PV verursacht wird, auftritt (Hartlieb et al., 2014; Sigmund et al., 2020). Es zeigte sich allerdings auch, dass Dsg2 zumindest in der Zellkultur mit HaCaT-Zellen und unter Bedingungen ohne Signalwegmodulation im Vergleich mit Dsg3 eine eher untergeordnete Rolle für die Zelladhäsion spielt (Hartlieb et al., 2013). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob ADAM10 in ähnlicher Weise wie Dsg2 auch Dsg1 und Dsg3 beeinflusst. Dsg1 und Dsg3 sind sowohl bedeutende Zielproteine für die Autoantikörper bei PV als auch Substrate der ADAMs (Ivars et al., 2020). Eine Alteration dieser Proteine wie auch eine Aktivierung von EGFR durch ADAM10 konnte allerdings als Ursache für diese Beobachtung ausgeschlossen werden. Vielmehr konnte als Erklärung für die verstärkte Adhäsion ermittelt werden, dass die Inhibition von ADAM10 die Desmosomen in einen hyperadhäsiven, also Ca^{2+} -unabhängigen, mechanisch besonders stabilen Zustand versetzt. Nicht nur durch die Inhibition von ADAM10, sondern auch durch Inhibition von ADAM17, und das sogar in noch größerem Ausmaß, konnte dieser Ca^{2+} -unabhängige Zustand erreicht werden.

Für PV konnte bereits festgestellt werden, dass hyperadhäsive Desmosomen weniger von der Depletion von Adhäsionsproteinen, wie beispielsweise dem für die desmosomale Zellhaftung so entscheidenden Dsg3, betroffen sind als solche, die sich in Ca^{2+} -abhängigem Adhäsionszustand befinden (Cirillo, Lanza & Prime, 2010). Da allerdings für die Hyperadhäsion eine Beteiligung von ADAM10 und ADAM17 beobachtet wurde, während nur ADAM10 die basale Haftung der Keratinozyten zu regulieren scheint, ist anzunehmen, dass die Mechanismen unterschiedlich sind. Dies unterstützt die Beobachtung, dass eine besonders hohe ADAM10-Aktivität in einer Umgebung mit hoher Ca^{2+} -Konzentration stattfindet (Maretzky, Scholz, Köten, Proksch, Saftig & Reiss, 2008; Reiss & Bhakdi, 2017).

5.2 Die ADAM10-Aktivierung durch PV-Antikörper ist vermutlich Dsg3-abhängig

Neben dem stabilisierenden Effekt der ADAM10-Inhibition auf die basale Zellhaftung konnte bestätigt werden, dass sich die Hemmung von ADAM10 protektiv auf den Zellhaftungsverlust auswirkt, der durch Antikörper von PV-Patienten ausgelöst wird. Letzterer Effekt war bereits für ein Pemphigus-Maus-Modell nachgewiesen worden (Ivars et al., 2020). Die Art und Weise, auf welche ADAM10 zu einem Adhäsionsverlust induziert durch Pemphigus-Antikörper führt, war allerdings noch ungeklärt. In den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten konnte zunächst gezeigt werden, dass unter basalen Bedingungen Dsg1, Dsg3 und eine vermehrte EGFR-Aktivierung hier wohl keine Rolle spielen.

In dieser Arbeit wurde für die Versuche neben einem PV-IgG mit einem hohen Titer von anti-Dsg3-Antikörpern auch der gegen Dsg3 gerichteter Antikörper AK23 eingesetzt. Da der durch diesen Antikörper hervorgerufene Adhäsionsverlust ebenfalls durch eine ADAM10-Inhibition signifikant reduziert werden konnte, kann man annehmen, dass die Aktivierung von ADAM10 in Bezug zum Vorhandensein von Dsg3-Antikörpern steht. Eine mögliche Erklärung für diese Abhängigkeit liefert die Kinase Src. Diese wird bei PV durch Autoantikörper gegen Dsg3 aktiviert (Man Tsang et al., 2012; Walter et al., 2017). Src wiederum sorgt unter anderem dafür, dass ADAM10 aktiviert wird (Ivars et al., 2020). Deshalb liegt die Schlussfolgerung nahe, dass es eine indirekte Abhängigkeit der Metalloproteinase ADAM10 von Dsg3-Antikörpern über Src gibt. Daneben führt Src nach Inkubation mit PV-IgG auch zu einer Aktivierung des EGFR (Walter et al., 2019). In sich dieser Arbeit anschließenden Experimenten wäre es interessant zu klären, ob jeder Dsg3-Antikörper in der Lage ist, eine ADAM10-Aktivierung auszulösen, oder ob dafür die Bindung an bestimmte Epitope des Dsg3 nötig ist. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass beispielsweise die Aktivierung von Src nicht durch jeden Dsg3-Antikörper induziert wird (Schmitt et al., 2023).

5.3 Rolle und Effekt von ADAM10 sind mit Dsg3 assoziiert

Ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit konnte weiterführend gezeigt werden, dass eine ADAM10-Inhibition bei einem durch vor allem Dsg1-Antikörper enthaltenden PV-Serum

hervorgerufenen Zelladhäsionsverlust keinen protektiven Effekt hat (Kugelman et al., 2022). Zum einen könnte das die unter 5.2 hergeleitete These stützen, dass Dsg3-Antikörper, möglicherweise über eine Aktivierung von Src, zu einer Zunahme der ADAM10-Aktivität führen, dass eine solche vermehrte ADAM10-Aktivität also nur auftritt, wenn auch Dsg3-Antikörper vorliegen. Einen anderen Erklärungsansatz lassen die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit zur Hyperadhäsion zu. Es ist bekannt, dass für die Hyperadhäsion vor allem Dsg3 relevant ist und Dsg1 hier eine eher untergeordnete Rolle spielt. Im hyperadhäsiven Zustand nimmt die Stärke der Dsg3-Interaktionen deutlich zu, wohingegen die der Dsg1-Interaktionen nahezu unverändert bleibt (Fuchs et al., 2020). Eine zunehmende Hyperadhäsion der Desmosomen, wie sie durch ADAM10-Inhibition verursacht wird, kann nur bei dem Vorhandensein von Dsg3-Antikörpern in großer Menge (hoher Dsg3-Titer im Patientenserum), welche die Hyperadhäsion schwächen, einen ausgleichenden Effekt und damit eine protektive Wirkung auf die Zellhaftung haben. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der ADAM10-Signalweg vorrangig über eine Beeinflussung des desmosomalen Cadherins Dsg3 wirkt, und auf diese Weise auch nachgeschaltete Signalwege moduliert.

5.4 ADAM10-Inhibition verbessert vor allem die PV-IgG-induzierten Effekte auf Dsg3

Die Inhibition von ADAM10 hat einen protektiven Effekt auf die PV-IgG-induzierte Blasenbildung im Mausmodell (Cirillo & Prime, 2021; Ivars et al., 2020). In der vorliegenden Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass auch die PV-IgG induzierten Effekte auf Keratinozyten in der Zellkultur durch ADAM10-Inhibition teilweise aufgehoben werden können. So sorgt beispielsweise die Inkubation mit PV-IgG für eine Reduktion und Fragmentierung von Dsg3 an den Zellgrenzen. Wird zusätzlich ein Inhibitor von ADAM10 inkubiert, ist diese Fragmentierung weniger ausgeprägt, stellenweise sogar aufgehoben. PV-IgG-Inkubation hat allerdings nicht nur eine Fragmentierung und Reduktion von Dsg3 zur Folge, sondern beeinflusst auch das desmosomale Cadherin Dsg1. Die Effekte auf dieses Protein werden durch gleichzeitige ADAM10-Inhibitor-Inkubation zwar ebenfalls verbessert, sie fallen aber deutlich schwächer aus als für Dsg3. Daher liegt der Schluss nahe, dass ADAM10 einen größeren Effekt auf den Umsatz von Dsg3 hat, als das für Dsg1 der Fall ist. Bisher wurde vor allem Dsg2 als Substrat von ADAM10 nachgewiesen (Bech-Serra et al., 2006). Inwieweit ADAM10 in den Umsatz von den desmosomalen Cadherinen Dsg1 und Dsg3 beteiligt ist, wurde noch nicht abschließend geklärt. Des Weiteren ist bekannt, dass unterschiedliche desmosomale Cadherine spezifische Funktionen und unterschiedliche Relevanz bezüglich der Zelladhäsion haben (Hartlieb et al., 2013). Daraus kann abgeleitet werden, dass möglicherweise ADAM10 nicht nur am Umsatz von Dsg2 beteiligt ist, sondern auch andere desmosomale Cadherine reguliert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass dabei vor allem eine Regulation von Dsg3 stattfindet und Dsg1 durch ADAM10 nur in geringem Maß reguliert wird. Dsg3 wiederum ist in erheblich höherem Maß als Dsg1 für die Hyperadhäsion von Desmosomen verantwortlich (Fuchs et al., 2020). Demnach könnte ein möglicher Signalweg ausgehend von Dsg3-Antikörpern zu einer übermäßigen Aktivierung von ADAM10 führen,

welche wiederum in einem vermehrten Umsatz von Dsg3 als potentielltem ADAM10-Substrat resultiert. Dadurch könnte es dann zur Abnahme der Desmosomen im hyperadhäsiven Zustand und damit zum Zellhaftungsverlust kommen.

5.5 Abhängigkeit der Zelladhäsion in Cortactin-defizienten Zellen von Dsg1

Durch Beeinflussung des desmosomalen Cadherins Dsg3, vielleicht in Kombination mit einer Modulation der Kinase Src, sorgt die Aktivierung von ADAM10 für eine reduzierte Keratinozytenadhäsion. Diese vermutete Interaktion von ADAM10 sowohl mit Dsg3 als auch mit Src führt zu einem weiteren, ebenfalls für die Keratinozytenadhäsion bedeutenden Protein, dem Aktin-bindenden Protein Cortactin. Dieses wird ebenfalls von Src phosphoryliert. Besonders interessant für diese Arbeit ist Cortactin deswegen, weil es bekanntermaßen mit Dsg3 an den Zellgrenzen kolokalisiert ist und mit diesem sogar Interaktionen eingeht (Kugelman et al., 2019b). Der Vergleich der Adhäsion von Cortactin-defizienten Zellen und solchen mit regelrechter Ctn-Expression im Zell-Dissoziationsversuch zeigte, dass der Ctn-Verlust mit einer Reduktion der Zelladhäsion einhergeht. Aufgrund der Kolokalisation und Interaktion mit Dsg3, war dieses desmosomale Cadherin ein vielversprechender Ansatzpunkt zur Klärung der Frage, worin diese verminderte Zellhaftung begründet ist. Der Vergleich der Dsg3-Mengen und -Verteilung der Ctn-defizienten Zellen mit Wildtyp-Zellen legt allerdings nahe, dass hier Dsg3 nicht Ursache für die in Ctn-Knock-Out-Zellen reduzierte Zelladhäsion ist. Vielmehr wurde beobachtet, dass dieser Adhäsionsverlust mit einer signifikant geringeren Proteinmenge von Desmoglein 1 einhergeht. Tatsächlich konnte für NHEKs eine Interaktion von Cortactin mit Dsg1, das an den Zellgrenzen lokalisiert ist, nachgewiesen werden. Wurde Dsg1 in den Zellen herunterreguliert, kam es gleichzeitig zu einer Reduktion von Ctn an den Zellgrenzen (Nekrasova et al., 2018). Diese Beobachtungen sind im Einklang mit dem Ergebnis dieser Arbeit, dass ein Ctn-Knock-Out mit einer Reduktion von Dsg1 einhergeht. Die Rolle der Dsg1-Verminderung für den Adhäsionsverlust in Ctn-defizienten Zellen bleibt allerdings ungeklärt

5.6 Dsg1 als essenzielles Molekül für die Zelladhäsion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Ctn-defizienten Zellen eine verminderte Zelladhäsion aufweisen. Zudem konnte festgestellt werden, dass in den Ctn-defizienten Zellen Dsg1 signifikant reduziert ist. Daraus kann abgeleitet werden, dass der Mangel an Dsg1 für den Haftungsverlust in den Ctn-defizienten Zellen verantwortlich sein kann, und dies lässt wiederum den Schluss zu, dass Dsg1 für die Stabilisierung der Zelladhäsion von zentraler Bedeutung ist. Es wurde bereits beschrieben, dass neben Dsg1 auch Dsg3 für die Integrität der Zelladhäsion essentiell ist und Autoantikörper gegen diese beiden Cadherine für einen großen Teil des Zellhaftungsverlustes bei Pemphigus verantwortlich sind (Lim, Bohelay, Hanakawa, Musette & Janela, 2021). Für Dsg3 konnten die Wichtigkeit für die hohe Zelladhäsion und auch

mögliche Kompensationsmechanismen bei reduzierter Dsg3-Menge oder dessen Fehlen bereits dadurch festgestellt werden, dass eine Dsg3-defiziente Zelllinie aus neonatalen Mäusen generiert wurde. Diese Zellen zeigten ähnlich wie die für diese Arbeit verwendeten Ctnn-defizienten Zellen im Dissoziationsassay eine stark herabgesetzte Zelladhäsion (Sigmund et al., 2020). Dass Dsg1 möglicherweise für die Zelladhäsion von noch größerer Bedeutung ist als Dsg3 lässt sich daran erkennen, dass ein Fehlen von Dsg1 nicht mit dem Leben vereinbar ist. So scheiterten alle Versuche, ähnlich der Dsg3-defizienten Zelllinie, eine Zelllinie zu generieren, die kein Dsg1 aufweist. Bei den Versuchen hierfür wurde nach dem gleichen Protokoll gearbeitet, das für die Isolation der Ctnn- beziehungsweise Dsg3-Knock-Out-Zellen verwendet wurde. Allerdings kam es in der Haut der Mäuse zu einer Blasenbildung, sodass die für die Proliferation entscheidenden Zellen nicht mit der Epidermis entfernt werden konnten. Es konnte darüber hinaus beobachtet werden, dass keine Maus, welche eine vollständige Dsg1-Defizienz aufwies, langfristig überlebensfähig war (Godsel et al., 2022; Kugelman, Radeva, Spindler & Waschke, 2019a). Dsg3-defiziente Mäuse dagegen sind überlebensfähig, was die besondere Wichtigkeit von Dsg1 für die Zellhaftung zeigt. Die Dsg3-defizienten Mäuse zeigen einen veränderten Phänotyp verglichen mit den Wildtyp-Zellen, der sich beispielsweise durch einen zarteren Körperbau und Alterationen in der Wundheilung von dem der Wildtyp-Tiere unterscheidet. Die Veränderungen in der Wundheilung sind dergestalt, dass es zur Ausbildung von PV-entsprechenden Läsionen kommt, die dann spontan heilen (Rötzer et al., 2016). Dieser Spontanheilung könnte ein Kompensationsmechanismus, möglicherweise durch andere desmosomale Cadherine wie Dsg1 oder Dsg2, zugrunde liegen. Es lässt sich folglich ableiten, dass die Rolle von Dsg1 für die Zelladhäsion von größerer Bedeutung als die von Dsg3 ist, und sogar, dass ein Fehlen von Dsg1 nicht mit dem Leben vereinbar ist.

5.7 Regulation der Zelladhäsion durch Erk1/2

In den Cortactin-defizienten Zellen konnte in dieser Arbeit neben einer Reduktion der Zelladhäsion, die durch eine Depletion von Dsg1 erklärbar sein könnte, auch eine signifikant herabgesetzte Phosphorylierung von Erk1/2 festgestellt werden. Die Enzyme, welche für die Erk1/2-Aktivierung verantwortlich sind, sind die Subtypen 1 und 2 der Mitogen-aktivierten Protein-Kinase-Kinase (MEK1/2). Die Aktivierung kann durch EGFR über den Ras-Raf-Signalweg erfolgen (Schmitt & Waschke, 2021). Dabei handelt es sich um einen sehr bedeutenden Signalweg in menschlichen Zellen, der für die Steuerung von zentralen Funktionen wie Proliferation und Differenzierung verantwortlich ist (Schmitt & Waschke, 2021). Es ist bekannt, dass Dsg1 in diesem Signalweg eine antagonistische Rolle zu EGFR einnimmt, indem Dsg1 unter anderem mit Erbin komplexiert und so verhindert, dass EGFR MEK1/2 aktivieren kann (Getsios et al., 2009). Dsg1-Expression und Erk1/2-Aktivierung sind also entgegengesetzt reguliert. Diesem Signalweg folgend, wäre bei einer reduzierten Dsg1-Menge mit einer verstärkten Erk1/2-Aktivität, also einer vermehrten Phosphorylierung der Enzyme, zu rechnen. Erwartbar wäre zudem eine Verringerung der Zelladhäsion. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich eine verringerte Zelladhäsion, allerdings deuteten die

Untersuchungen auf eine gleichgerichtete Veränderung von Dsg1-Menge und Aktivierung von Erk1/2 hin, da in den Dsg1-reduzierten Ctnn-defizienten Zellen die Menge an phosphoryliertem Erk1/2 ebenfalls reduziert war.

Erk1/2 ist nach dem eben beschriebenen Signalweg ein Enzym, das destabilisierend auf die Zelladhäsion wirkt und beispielsweise auch durch Pemphigus-Antikörper aktiviert werden kann (Walter et al., 2019). Nach den Ergebnissen dieser Arbeit geht dagegen in den Ctnn-defizienten Zellen die reduzierte Erk1/2-Aktivierung mit einer verminderten Zelladhäsion und verringerter Dsg1-Menge einher. Die Ergebnisse dieser Arbeit scheinen also darauf hinzuweisen, dass Ctnn nicht nur für die Regulation der Dsg1-Menge, sondern auch für dessen Hemmung der Erk1/2-Aktivierung nötig ist. Für ein anderes Gewebe, welches ähnlich der Epidermis einer großen mechanischen Beanspruchung ausgesetzt ist, das Myokard, wurde allerdings nachgewiesen, dass sich Erk1/2-Aktivierung auch positiv auf die Zelladhäsion auswirken kann. Als Auslöser für eine Erk1/2-Aktivierung konnten dort cAMP und die Aktivierung von PKC festgestellt werden (Shoykhet et al., 2020). Diese Tatsache zusammen mit den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit zeigt, dass die Rolle von Erk1/2 für die Integrität der Zelladhäsion in der Epidermis noch nicht abschließend untersucht ist.

Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz für die in dieser Arbeit beobachtete gleichsinnige Verringerung von Dsg1-Menge und Erk1/2-Aktivität könnte eine Art negative Rückkopplung sein: Wenn die Erk1/2-Aktivität im Vergleich zum Normniveau der Wildtyp-Zellen in den Ctnn-defizienten Zellen reduziert ist, ist eine Erk-Inaktivierung durch Dsg1 weniger nötig, und daher könnte es als Folge zu einer Herabregulation von Dsg1 kommen. Daraus würde dann Haftungsverlust resultieren, weil Dsg1 als desmosomales Cadherin für die Haftung stabilisierende Effekte hat. Des Weiteren ist denkbar, dass noch andere Effekte durch eine Erk1/2-Aktivierung ausgelöst werden, wie beispielsweise eine Rekrutierung anderer desmosomaler Cadherine, die ebenfalls stabilisierend auf die Zelladhäsion wirken, möglicherweise als Kompensationsmechanismus bei Überaktivierung. Durch die herabgesetzte Aktivität von Erk1/2 würden diese Mechanismen wegfallen und damit wäre eine Schwächung der Zelladhäsion erklärbar. In anderen Geweben wie dem Myokard konnten derartige stabilisierend wirkende Mechanismen in Kombination mit einer Erk1/2-Aktivierung bereits beobachtet werden. Beispielsweise geht die verbesserte Adhäsion in Folge des cAMP-Signalweges in der Herzmuskulatur nicht nur mit einer Erk1/2-Aktivierung, sondern auch mit einer Verlagerung von Dsg2 an die Zellkontakte einher. Dort konnte zudem beobachtet werden, dass die Erk1/2-Aktivierung nötig war, um eine Reduktion der p38 MAP-Kinasen Aktivität sowie eine PKC-Aktivierung auszulösen. Letztere beiden Effekte sind dabei typisch für eine verbesserte Adhäsion in Herzmuskelzellen (Shoykhet et al., 2020). Diesem Erklärungsansatz folgend würde sich noch die Frage stellen, warum die Erk1/2-Aktivität in den Ctnn-defizienten Zellen reduziert ist. Es scheint also ein Zusammenwirken zwischen diesem Aktin-bindenden Protein und Erk1/2 zu geben.

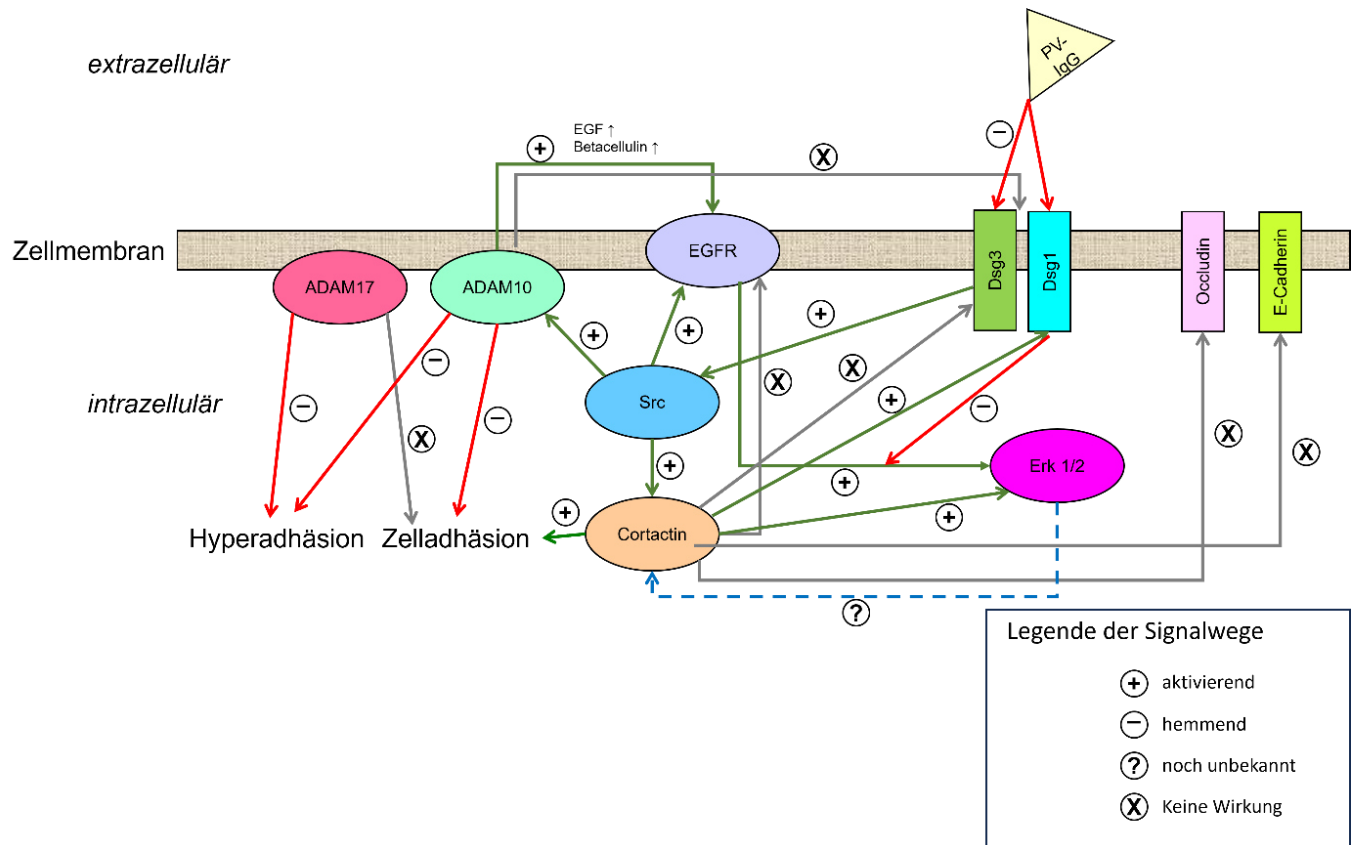


Abbildung 19: Schematische Darstellung der bereits bekannten, durch die vorliegende Arbeit entschlüsselten sowie noch weiter zu untersuchenden Signalwege mit potentieller Bedeutung für die Pathogenese des Pemphigus.

In Anschluss an Abbildung 4 visualisiert Abbildung 19 den Erkenntnisfortschritt durch die vorliegende Arbeit. ADAM17 beeinflusst die Zellhaftung im Gegensatz zu ADAM10 nicht, allerdings hemmen beide Sheddasen die Hyperadhäsion. Zudem scheint ADAM10 auch an dem durch PV-IgG induzierten Verlust der Zelladhäsion beteiligt sein, wobei besonders die durch α Dsg3-Antikörper vermittelte Aktivität die Dsg3-Lokalisation zu bewirken scheint. Cortactin wirkt sich positiv auf die Zellhaftung aus, wobei ein Wirken über EGFR und Dsg3 nicht nachgewiesen werden konnte. Dagegen scheint ein Signalweg über Erk1/2 und Dsg1 wahrscheinlich. Zudem scheint ADAM10 auch an dem durch PV-IgG induzierten Verlust der Zelladhäsion beteiligt zu sein, wobei es besonders die durch α Dsg3-Antikörper vermittelte Alteration der Dsg3-Lokalisation zu bewirken scheint.

6 Zusammenfassung

Pemphigus ist eine schwere Autoimmundermatose, bei der es durch Antikörper vor allem gegen desmosomale Cadherine wie Dsg1 und Dsg3 zu einem Angriff der Desmosomen, einer besonders stabilen Art der Haftkontakte, kommt. In der Pathogenese des Pemphigus spielt allerdings nicht nur die direkte Inhibition der desmosomalen Cadherine eine Rolle. Vielmehr werden durch die Autoantikörper Signaltransduktionsmechanismen moduliert, die in ihrer

veränderten Wirkungsweise dann einen Zelladhäsionsverlust zur Folge haben. Neben anderen Signalproteinen sind die ADAMs in Umbau und Regulation von Desmosomen eingebunden.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte eine protektive Wirkung der ADAM10-Inhibition in vitro bestätigt werden. Darauf aufbauend ergaben sich Hinweise auf eine Dsg3-Abhängigkeit der ADAM10-Aktivierung und ein enges Zusammenwirken von ADAM10 und Dsg3, da ein durch α -Dsg3-Antikörper induzierter Zelladhäsionsverlust durch ADAM10-Inhibition deutlich abgemildert werden konnte und dabei besonders die Lokalisation von Dsg3 an den Zellgrenzen aufrechterhalten werden konnte.

Es konnte zudem gezeigt werden, dass ADAM10 nicht nur unter pathologischen Bedingungen die Zelladhäsion reguliert. Vielmehr beeinflusst ADAM10 bereits basal die Haftung und schwächt zusammen mit ADAM17 die Hyperadhäsion der Desmosomen.

Vorversuche zu dieser Arbeit legten nahe, dass auch Cortactin eine zentrale Rolle für die Zelladhäsion spielt, und konnten eine Interaktion von Cortactin und Dsg3 zeigen. Nach den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen ist davon auszugehen, dass zudem ein Zusammenhang zwischen Cortactin und Dsg1, besteht. Cortactin wirkt dabei offensichtlich stabilisierend auf Dsg1. Fehlt dagegen Cortactin, kommt es zu einer Dsg1-Abnahme, die zur reduzierten Zelladhäsion beitragen könnte. Zudem wurde beobachtet, dass Cortactin für die Erk1/2-Aktivierung nötig ist, wozu die zugrunde liegenden Mechanismen allerdings noch unklar sind und einer weiteren Klärung bedürfen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können also dazu beitragen, die Regulation der beiden für die Pathogenese des Pemphigus zentralen Proteine Dsg1 und Dsg3 genauer zu verstehen und damit nützlich sein, um in der Zukunft eine zielgerichtete Therapie von Pemphigus zu ermöglichen.

7 Summary

Pemphigus is a severe autoimmune dermatosis in which antibodies, primarily targeting desmosomal cadherins such as Dsg1 and Dsg3, lead to an attack on desmosomes, a particularly stable type of cell-cell adhesion. However, in the pathogenesis of Pemphigus, not only the direct inhibition of desmosomal cadherins plays a role. Rather, the autoimmune antibodies modulate signaling mechanisms that, through their altered functionality, ultimately lead to a loss of cell adhesion. In addition to other signaling proteins, ADAMs are involved in the remodeling and regulation of desmosomes.

The present study confirmed a protective effect of ADAM10 inhibition in vitro. Based on these findings, there are indications of a Dsg3-dependent activation of ADAM10 and a close interaction between ADAM10 and Dsg3. This is supported by the fact that a loss of cell adhesion induced by anti-Dsg3 antibodies was significantly mitigated by ADAM10 inhibition, which notably helped maintain the localization of Dsg3 at the cell boundaries.

It was also demonstrated that ADAM10 regulates cell adhesion not only under pathological conditions. Moreover ADAM10 takes already part in regulating basal cell adhesion. Together with ADAM17, ADAM10 weakens the hyperadhesion of desmosomes.

Preliminary experiments for this work suggested that Cortactin as well plays a central role in cell adhesion and demonstrated an interaction between Cortactin and Dsg3. Based on the results obtained in this study, it can be assumed that there is also a relationship between Cortactin and Dsg1. Cortactin appears to stabilize Dsg1. In the absence of Cortactin, a decrease in Dsg1 was observed, which could contribute to reduced cell adhesion.

Furthermore, it was observed that Cortactin is required for Erk1/2 activation, although the underlying mechanisms remain unclear and require further investigation.

The findings of this work may thus contribute to a better understanding of the regulation of the two proteins, Dsg1 and Dsg3, which are central to the pathogenesis of Pemphigus, and could prove useful for the development of targeted therapies for Pemphigus in the future.

8 Ausblick

Die gravierenden Auswirkungen der Hauterkrankung Pemphigus zeigen, wie wichtig ein genaues Verständnis der Regulation von Zell-Zell-Kontakten und hier im Besonderen von Desmosomen ist. Immer noch sind viele der an der Pathogenese des Pemphigus beteiligten Signalwege nur unzureichend verstanden. Deshalb werden sich auch in Zukunft Untersuchungen mit diesem Thema auseinanderzusetzen haben. Mithilfe der für diese Arbeit durchgeführten Experimente scheinen folgende Forschungsansätze vielversprechend für zukünftige Untersuchungen zu sein.

Zunächst wäre es von Bedeutung, dem Zusammenhang zwischen der Sheddase ADAM10 und der Induktion von Hyperadhäsion noch genauer nachzugehen. Die Hyperadhäsion spielt vor allem in Geweben, die extremen mechanischen Belastungen ausgesetzt sind, wie der Epidermis (Kimura et al., 2007) und möglicherweise dem Herzmuskelgewebe (Shoykhet et al., 2020) eine bedeutsame Rolle. Entsprechend könnte in der Forschung zu Krankheitsbildern mit reduzierter Zellhaftung, beispielsweise Pemphigus oder der chronisch entzündlichen Darmerkrankung Morbus Chron, die Regulation der Hyperadhäsion ein Forschungsschwerpunkt sein, vor allem mit Fokus auf eine Involvierung der ADAMs. Als Sheddasen desmosomaler Cadherine könnte ihnen hier eine besondere Bedeutung zukommen. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine herabgesetzte Hyperadhäsion durch Expression der Keratin-Isoform K17 mit einer signifikanten Reduktion unter anderem der desmosomalen Cadherinen Dsg1 und Dsg3 einhergeht. Kommt es zu einer induzierten Überexpression von Dsg3, so bilden sich die für die Hyperadhäsion typischen Dsg3-Oligomere, und stabile Desmosomen kommen zustande (Büchau, Vielmuth, Waschke & Magin, 2022). Hier könnten also die ADAMs bedeutend werden, da eine Inhibition der ADAMs zu einer

verminderten Spaltung von Dsg3 und Dsg1 und damit zu einer gesteigerten Verfügbarkeit der beiden Haftproteine führen könnte, sodass die Zellhaftung verbessert wird.

Die vorliegende Arbeit gibt Hinweise auf ein Zusammenwirken von Dsg1 und Cortactin, sodass sich ein neuer Einblick in die Bedeutung von Dsg1 für die Zelladhäsion ergibt. Neben seiner Rolle als Adhäsionsprotein hat Dsg1 auch eine Funktion als Signalmolekül, weshalb postuliert wird, dass durch Dsg1 noch weitere Zellkontakte beeinflusst werden (Green et al., 2022). Über die Zusammenwirkung mit Cortactin wäre beispielsweise eine Interaktion mit den Adhärensjunktionen vorstellbar. Auch eine gegenseitige Beeinflussung von Dsg1 und den Verschlusskontakten ist bereits zunehmend Gegenstand der Forschung (Igawa et al., 2011; Kugelman et al., 2019a). Ein Zusammenhang von Dsg1 und dem Protein Occludin, welches ein Transmembranprotein der Verschlusskontakte ist, konnte bereits bei den Corneo-Desmosomen nachgewiesen werden (Igawa et al., 2011). Dabei handelt es sich um Desmosomen in der obersten Schicht der Epidermis, dem stratum corneum. In dieser Form der Desmosomen ist Dsg1 eines der häufigsten Cadherine. Um eine gezielte Abschilferung dieser Hautschicht bei gleichzeitig intakter Barriere zu gewährleisten, müssen die Corneo-Desmosomen gezielt gelöst werden, und zwar in Interaktion mit den Verschlusskontakten. In diesem Zusammenhang konnte bereits festgestellt werden, dass wohl die Tight Junctions im stratum corneum verhindern, dass die Corneo-Desmosomen frühzeitig von Proteasen abgebaut werden (Igawa et al., 2011). Es stellt sich aber die Frage, ob auch eine in die umgekehrte Richtung gehende Beeinflussung vorliegen könnte, sodass beispielsweise Dsg1-Depletion auch mit einem Zusammenbruch der Barrierefunktion der Haut in Zusammenhang gebracht werden kann, wie durch die Beobachtung angedeutet wird, dass in heterozygoten, Dsg1-defizienten Mäusen Occludin in der Epidermis vermindert war (Kugelman et al., 2019a).

Für die Therapie von Pemphigus Vulgaris könnte sich hier ein vielversprechender Therapieansatz ableiten lassen. Für weiterführende Untersuchungen zu den Tight Junctions in der Haut könnten die MEKs mit einer Expression von Occludin, Claudin1 und Claudin4 in gut nachweisbarer Menge ein geeignetes Modell darstellen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivität der Kinasen Erk1/2 für die Integrität der Tight Junctions nötig ist (Samak, Aggarwal & Rao, 2011). Da, wie eben erläutert, die Tight Junctions wiederum einen schützenden Effekt auf Desmosomen haben können (Igawa et al., 2011), wäre es interessant, diesem Ansatz folgend zu überprüfen, ob es einen ähnlichen direkten Zusammenhang zwischen Erk1/2 und der desmosomalen Integrität gibt. Die vorliegende Arbeit wirft nicht nur einen neuen Blick auf den Zusammenhang von Zelladhäsion und Erk1/2, sondern auch speziell auf die Interaktion von Dsg1 und Erk1/2 und die damit verbundenen Auswirkungen auf die Zelladhäsion in der Haut. Bezüglich dieses Zusammenhangs könnten also zukünftig genauere Untersuchungen erfolgen. Zudem ist noch unklar, welche Rolle Cortactin im Zusammenspiel mit Dsg1 und pErk1/2 zukommt.

Schließlich drängt sich auf, herauszufinden, worin die Ursache für die essenzielle Bedeutung von Dsg1 für Zelladhäsion, ja sogar das Überleben des ganzen Organismus liegt. Denn obwohl das Fehlen von Dsg1 die Zelladhäsion drastischer beeinflusst als eine Dsg3-Defizienz, kommt

es durch Antikörper ausschließlich gegen Dsg1 zur schwächeren Ausprägungsform von Pemphigus, Pemphigus Foliaceus (Spindler & Waschke, 2018). Eine mögliche Erklärung wäre, dass das vollständige Fehlen von Dsg1 nicht nur Effekte auf die desmosomale Haftung, sondern auch auf andere Haftkomplexe hat, beispielsweise die Adhärensjunktionen (Nekrasova et al., 2018). Es wurde auch bereits gezeigt, dass das Fehlen von Dsg1 neben dem Zusammenbruch der Hautbarriere (Kugelmann et al., 2019a) zur Ausbildung eines Entzündungsphänotyps führt, der Übereinstimmungen mit Psoriasis aufweist (Godsel et al., 2022). Die weit über die Rolle als Haftprotein in Desmosomen hinausreichende Wirkung von Dsg1 zeigt sich auch darin, dass dieses Protein dazu in der Lage ist, die gesamte Schichtung der Epidermis zu modulieren: Eine Depletion von Dsg1 führt zu einer signifikant verringerten Hautschichtung. Für zukünftige Untersuchungen zur Zelladhäsion bietet es sich daher an, Dsg1 in den Fokus zu nehmen.

Ein weiteres Forschungsgebiet könnte die Frage sein, wie Desmosomen andere Zellkontakte regulieren.

9 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
AK23	Monoklonaler Antikörper gegen Dsg3, gewonnen aus einem Pemphigus-Maus-Modell
ÄMP	Äußere Membranplaque
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bichinonsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
Cttn	Cortactin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dsg	Desmoglein
Dsc	Desmocollin
DP	Desmoplakin
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epithelial Growth Factor
EGFR	Epithelial Growth Factor Receptor
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-tetraessigsäure
Erk	Extracellular-signal Regulated Kinase
F-Aktin	Filamentäres Aktin
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HaCaT	Human low calcium elevated temperature cell
HbSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCL	Salzsäure
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer
IF	Immunfluoreszenzmikroskopie
IgG	Immunglobulin vom Typ G
IMP	Innere Membranplaque

kDa	Kilodalton
MAPK	Mitogen-activated-protein-kinase
MEK	Murine Epithelial Keratinocytes
MES	4-Morpholineethansulfonic acid
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NGS	Normal goat serum
NHEK	Normal Human Epithelial Keratinocytes
nm	Nanometer
NPG	N-Propygalat
PBS	Phosphate buffered saline
PCA	Para-Cumar-Acid
PF	Pemphigus Foliaceus
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethansulfonyl-Fluorid
PV	Pemphigus Vulgaris
PV-IgG	Aufgereinigte Immunglobuline vom Typ IgG isoliert aus Seren von Patienten mit PV
s	Sekunde
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
Src	Sarcoma related kinase
TBS	Tris buffered saline
TEMED	Tetramethylethyldiamin
WB	Western Blot

10 Literaturverzeichnis

- Aoyama, Y. & Kitajima, Y. 1999. Pemphigus vulgaris-IgG causes a rapid depletion of desmoglein 3 (Dsg3) from the Triton X-100 soluble pools, leading to the formation of Dsg3-depleted desmosomes in a human squamous carcinoma cell line, DJM-1 cells. *The Journal of investigative dermatology*, 112(1): 67–71.
- Arteaga, C. L., Ramsey, T. T., Shawver, L. K. & Guyer, C. A. 1997. Unliganded epidermal growth factor receptor dimerization induced by direct interaction of quinazolines with the ATP binding site. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(37): 23247–23254.
- Barros, J. C. & Marshall, C. J. 2005. Activation of either ERK1/2 or ERK5 MAP kinase pathways can lead to disruption of the actin cytoskeleton. *Journal of cell science*, 118(Pt 8): 1663–1671.
- Bech-Serra, J. J., Santiago-Josefat, B., Esselens, C., Saftig, P., Baselga, J., Arribas, J. & Canals, F. 2006. Proteomic identification of desmoglein 2 and activated leukocyte cell adhesion molecule as substrates of ADAM17 and ADAM10 by difference gel electrophoresis. *Molecular and cellular biology*, 26(13): 5086–5095.
- Beckman, N., Waern, M., Gustafson, D. & Skoog, I. 2008. Secular trends in self reported sexual activity and satisfaction in Swedish 70 year olds: cross sectional survey of four populations, 1971-2001. *BMJ (Clinical research ed.)*, 337(7662): a279.
- Bektas, M., Jolly, P. S., Berkowitz, P., Amagai, M. & Rubenstein, D. S. 2013. A pathophysiologic role for epidermal growth factor receptor in pemphigus acantholysis. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(13): 9447–9456.
- Berkowitz, P., Hu, P., Liu, Z., Diaz, L. A., Enghild, J. J., Chua, M. P. & Rubenstein, D. S. 2005. Desmosome signaling. Inhibition of p38MAPK prevents pemphigus vulgaris IgG-induced cytoskeleton reorganization. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(25): 23778–23784.
- Bissinger, O., Kolk, A., Drecoll, E., Straub, M., Lutz, C., Wolff, K.-D. & Götz, C. 2017. EGFR and Cortactin: Markers for potential double target therapy in oral squamous cell carcinoma. *Experimental and therapeutic medicine*, 14(5): 4620–4626.
- Brooke, M. A., Nitoiu, D. & Kelsell, D. P. 2012. Cell-cell connectivity: desmosomes and disease. *The Journal of pathology*, 226(2): 158–171.
- Büchau, F., Vielmuth, F., Waschke, J. & Magin, T. M. 2022. Bidirectional regulation of desmosome hyperadhesion by keratin isotypes and desmosomal components. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 79(5): 223.
- Chernyavsky, A. I., Arredondo, J., Kitajima, Y., Sato-Nagai, M. & Grando, S. A. 2007. Desmoglein versus non-desmoglein signaling in pemphigus acantholysis: characterization of novel signaling pathways downstream of pemphigus vulgaris antigens. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(18): 13804–13812.
- Cirillo, N., Lanza, A. & Prime, S. S. 2010. Induction of hyper-adhesion attenuates autoimmune-induced keratinocyte cell-cell detachment and processing of adhesion molecules via mechanisms that involve PKC. *Experimental cell research*, 316(4): 580–592.

- Cirillo, N. & Prime, S. S. 2021. A Scoping Review of the Role of Metalloproteinases in the Pathogenesis of Autoimmune Pemphigus and Pemphigoid. *Biomolecules*, 11(10).
- Costan, V.-V., Popa, C., Hâncu, M. F., Porumb-Andrese, E. & Toader, M. P. 2021. Comprehensive review on the pathophysiology, clinical variants and management of pemphigus (Review). *Experimental and therapeutic medicine*, 22(5): 1335.
- Daly, R. J. 2004. Cortactin signalling and dynamic actin networks. *The Biochemical journal*, 382(Pt 1): 13–25.
- Deller, T. 2018. *Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie: das Lehrbuch* (5. Aufl.). München, Deutschland: Elsevier.
- Delva, E., Tucker, D. K. & Kowalczyk, A. P. 2009. The desmosome. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(2): a002543.
- Edwards, D. R., Handsley, M. M. & Pennington, C. J. 2008. The ADAM metalloproteinases. *Molecular aspects of medicine*, 29(5): 258–289.
- Egu, D. T., Schmitt, T., Ernst, N., Ludwig, R. J., Fuchs, M., Hiermaier, M., Moztarzadeh, S., Morón, C. S., Schmidt, E., Beyersdorfer, V., Spindler, V., Steinert, L. S., Vielmuth, F., Sigmund, A. M. & Waschke, J. 2024. EGFR Inhibition by Erlotinib Rescues Desmosome Ultrastructure and Keratin Anchorage and Protects Against Pemphigus Vulgaris IgG-Induced Acantholysis in Human Epidermis. *The Journal of investigative dermatology*.
- Egu, D. T., Schmitt, T. & Waschke, J. 2022. Mechanisms Causing Acantholysis in Pemphigus-Lessons from Human Skin. *Frontiers in Immunology*, 13: 884067.
- Fuchs, M., Sigmund, A. M., Waschke, J. & Vielmuth, F. 2020. Desmosomal Hyperadhesion Is Accompanied with Enhanced Binding Strength of Desmoglein 3 Molecules. *Biophysical journal*, 119(8): 1489–1500.
- Garrod, D. & Kimura, T. E. 2008. Hyper-adhesion: a new concept in cell-cell adhesion. *Biochemical Society transactions*, 36(Pt 2): 195–201.
- Garrod, D. R., Berika, M. Y., Bardsley, W. F., Holmes, D. & Taberner, L. 2005. Hyper-adhesion in desmosomes: its regulation in wound healing and possible relationship to cadherin crystal structure. *Journal of cell science*, 118(Pt 24): 5743–5754.
- Getsios, S., Simpson, C. L., Kojima, S., Harmon, R., Sheu, L. J., Dusek, R. L., Cornwell, M. & Green, K. J. 2009. Desmoglein 1-dependent suppression of EGFR signaling promotes epidermal differentiation and morphogenesis. *The Journal of cell biology*, 185(7): 1243–1258.
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S. & Kempson, I. 2021. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *International journal of molecular sciences*, 22(23).
- Godsel, L. M., Roth-Carter, Q. R., Koetsier, J. L., Tsoi, L. C., Huffine, A. L., Broussard, J. A., Fitz, G. N., Lloyd, S. M., Kweon, J., Burks, H. E., Hegazy, M., Amagai, S., Harms, P. W., Xing, X., Kirma, J., Johnson, J. L., Urciuoli, G., Doglio, L. T., Swindell, W. R., Awatramani, R., Sprecher, E., Bao, X., Cohen-Barak, E., Missero, C., Gudjonsson, J. E. & Green, K. J. 2022. Translational implications of Th17-skewed inflammation due to genetic deficiency of a cadherin stress sensor. *The Journal of clinical investigation*, 132(3).

- Green, K. J., Niessen, C. M., Rübsam, M., Perez White, B. E. & Broussard, J. A. 2022. The Desmosome-Keratin Scaffold Integrates ErbB Family and Mechanical Signaling to Polarize Epidermal Structure and Function. **Frontiers in cell and developmental biology**, 10: 903696.
- Green, K. J. & Simpson, C. L. 2007. Desmosomes: new perspectives on a classic. **Journal of Investigative Dermatology**, 127(11): 2499–2515.
- Griffiths, C. E. M., Barker, J., Bleiker, T., Chalmers, R. J. G., & Creamer, D. (Eds.) 2016. **Rook's textbook of dermatology**. Chichester, West Sussex, Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc.
- Gumbiner, B. M. 2005. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. **Nature reviews. Molecular cell biology**, 6(8): 622–634.
- Hartlieb, E., Kempf, B., Partilla, M., Vigh, B., Spindler, V. & Waschke, J. 2013. Desmoglein 2 is less important than desmoglein 3 for keratinocyte cohesion. **PloS one**, 8(1): e53739.
- Hartlieb, E., Rötzer, V., Radeva, M., Spindler, V. & Waschke, J. 2014. Desmoglein 2 compensates for desmoglein 3 but does not control cell adhesion via regulation of p38 mitogen-activated protein kinase in keratinocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, 289(24): 17043–17053.
- Hegazy, M., Koetsier, J. L., Huffine, A. L., Broussard, J. A., Godsel, B. M., Cohen-Barak, E., Sprecher, E., Wolfgeher, D. J., Kron, S. J., Godsel, L. M. & Green, K. J. 2022. Epidermal Stratification Requires Retromer-Mediated Desmoglein-1 Recycling. **Developmental Cell**, 57(24): 2683-2698.e8.
- Hertl, M., Zillikens, D., Borradori, L., Bruckner-Tuderman, L., Burckhard, H., Eming, R., Engert, A., Goebeler, M., Hofmann, S., Hunzelmann, N., Karhofer, F., Kautz, O., Lippert, U., Niedermeier, A., Nitschke, M., Pfütze, M., Reiser, M., Rose, C., Schmidt, E., Shimanovich, I., Sticherling, M. & Wolff-Franke, S. 2008. Recommendations for the use of rituximab (anti-CD20 antibody) in the treatment of autoimmune bullous skin diseases. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG**, 6(5): 366–373.
- Igawa, S., Kishibe, M., Murakami, M., Honma, M., Takahashi, H., Iizuka, H. & Ishida-Yamamoto, A. 2011. Tight junctions in the stratum corneum explain spatial differences in corneodesmosome degradation. **Experimental dermatology**, 20(1): 53–57.
- Ishii, K., Yoshida, K., Stanley, J. R., Yamagami, J., Amagai, M. & Ishiko, A. 2020. Pemphigus Vulgaris and Follicular IgG Autoantibodies Directly Block Heterophilic Transinteraction between Desmoglein and Desmocollin. **Journal of Investigative Dermatology**, 140(10): 1919-1926.e7.
- Ivars, M., España, A., Alzuguren, P., Pelacho, B., Lasarte, J. J. & López-Zabalza, M. J. 2020. The involvement of ADAM10 in acantholysis in mucocutaneous pemphigus vulgaris depends on the autoantibody profile of each patient. **The British journal of dermatology**, 182(5): 1194–1204.
- Jennings, J. M., Tucker, D. K., Kottke, M. D., Saito, M., Delva, E., Hanakawa, Y., Amagai, M. & Kowalczyk, A. P. 2011. Desmosome disassembly in response to pemphigus vulgaris IgG occurs in distinct phases and can be reversed by expression of exogenous Dsg3. **Journal of Investigative Dermatology**, 131(3): 706–718.
- Kamekura, R., Nava, P., Feng, M., Quiros, M., Nishio, H., Weber, D. A., Parkos, C. A. & Nusrat, A. 2015. Inflammation-induced desmoglein-2 ectodomain shedding compromises the mucosal barrier. **Molecular biology of the cell**, 26(18): 3165–3177.
- Kasperkiewicz, M., Ellebrecht, C. T., Takahashi, H., Yamagami, J., Zillikens, D., Payne, A. S. & Amagai, M. 2017. Pemphigus. **Nature reviews. Disease primers**, 3: 17026.

- Kimura, T. E., Merritt, A. J. & Garrod, D. R. 2007. Calcium-independent desmosomes of keratinocytes are hyper-adhesive. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(4): 775–781.
- Klessner, J. L., Desai, B. V., Amargo, E. V., Getsios, S. & Green, K. J. 2009. EGFR and ADAMs cooperate to regulate shedding and endocytic trafficking of the desmosomal cadherin desmoglein 2. *Molecular biology of the cell*, 20(1): 328–337.
- Kowalczyk, A. P., Stappenbeck, T. S., Parry, D. A., Palka, H. L., Virata, M. L., Bornslaeger, E. A., Nilles, L. A. & Green, K. J. 1994. Structure and function of desmosomal transmembrane core and plaque molecules. *Biophysical chemistry*, 50(1-2): 97–112.
- Kridin, K. & Schmidt, E. 2021. Epidemiology of Pemphigus. *JID Innovations*, 1(1).
- Kröger, C., Loschke, F., Schwarz, N., Windoffer, R., Leube, R. E. & Magin, T. M. 2013. Keratins control intercellular adhesion involving PKC- α -mediated desmoplakin phosphorylation. *The Journal of cell biology*, 201(5): 681–692.
- Kugelmann, D., Anders, M., Sigmund, A. M., Egu, D. T., Eichkorn, R. A., Yazdi, A. S., Sárdy, M., Hertl, M., Didona, D., Hashimoto, T. & Waschke, J. 2022. Role of ADAM10 and ADAM17 in the Regulation of Keratinocyte Adhesion in Pemphigus Vulgaris. *Frontiers in Immunology*, 13: 84248.
- Kugelmann, D., Radeva, M. Y., Spindler, V. & Waschke, J. 2019a. Desmoglein 1 Deficiency Causes Lethal Skin Blistering. *Journal of Investigative Dermatology*, 139(7): 1596-1599.e2.
- Kugelmann, D., Rötzer, V., Walter, E., Egu, D. T., Fuchs, M. T., Vielmuth, F., Vargas-Robles, H., Schnoor, M., Hertl, M., Eming, R., Rottner, K., Schmidt, A., Spindler, V. & Waschke, J. 2019b. Role of Src and Cortactin in Pemphigus Skin Blistering. *Frontiers in Immunology*, 10: 626.
- Kumar, V., Bouameur, J.-E., Bär, J., Rice, R. H., Hornig-Do, H.-T., Roop, D. R., Schwarz, N., Brodesser, S., Thiering, S., Leube, R. E., Wiesner, R. J., Vijayaraj, P., Brazel, C. B., Heller, S., Binder, H., Löffler-Wirth, H., Seibel, P. & Magin, T. M. 2015. A keratin scaffold regulates epidermal barrier formation, mitochondrial lipid composition, and activity. *The Journal of cell biology*, 211(5): 1057–1075.
- Lake, D., Corrêa, S. A. L. & Müller, J. 2016. Negative feedback regulation of the ERK1/2 MAPK pathway. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 73(23): 4397–4413.
- Lichti, U., Anders, J. & Yuspa, S. H. 2008. Isolation and short-term culture of primary keratinocytes, hair follicle populations and dermal cells from newborn mice and keratinocytes from adult mice for in vitro analysis and for grafting to immunodeficient mice. *Nature protocols*, 3(5): 799–810.
- Lim, Y. L., Bohelay, G., Hanakawa, S., Musette, P. & Janela, B. 2021. Autoimmune Pemphigus: Latest Advances and Emerging Therapies. *Frontiers in molecular biosciences*, 8: 808536.
- Lüllmann-Rauch, R. 2015. *Taschenlehrbuch Histologie* (5. Aufl.). Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Man Tsang, S., Brown, L., Gadmor, H., Gammon, L., Fortune, F., Wheeler, A. & Wan, H. 2012. Desmoglein 3 acting as an upstream regulator of Rho GTPases, Rac-1/Cdc42 in the regulation of actin organisation and dynamics. *Experimental cell research*, 318(18): 2269–2283.
- Maretzky, T., Scholz, F., Köten, B., Proksch, E., Saftig, P. & Reiss, K. 2008. ADAM10-mediated E-cadherin release is regulated by proinflammatory cytokines and modulates keratinocyte cohesion in eczematous dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(7): 1737–1746.

- Miravet, S., Piedra, J., Castaño, J., Raurell, I., Francí, C., Duñach, M. & García de Herreros, A. 2003. Tyrosine phosphorylation of plakoglobin causes contrary effects on its association with desmosomes and adherens junction components and modulates beta-catenin-mediated transcription. ***Molecular and cellular biology***, 23(20): 7391–7402.
- Nekrasova, O. & Green, K. J. 2013. Desmosome assembly and dynamics. ***Trends in cell biology***, 23(11): 537–546.
- Nekrasova, O., Harmon, R. M., Broussard, J. A., Koetsier, J. L., Godsel, L. M., Fitz, G. N., Gardel, M. L. & Green, K. J. 2018. Desmosomal cadherin association with Tctex-1 and cortactin-Arp2/3 drives perijunctional actin polymerization to promote keratinocyte delamination. ***Nature Communications***, 9(1): 1053.
- Niessen, C. M. 2007. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. ***The Journal of investigative dermatology***, 127(11): 2525–2532.
- Oda, K., Matsuoka, Y., Funahashi, A. & Kitano, H. 2005. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. ***Molecular Systems Biology***, 1: 2005.0010.
- Reiss, K. & Bhakdi, S. 2017. The plasma membrane: Penultimate regulator of ADAM sheddase function. ***Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research***, 1864(11 Pt B): 2082–2087.
- Reiss, K. & Saftig, P. 2009. The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. ***Seminars in cell & developmental biology***, 20(2): 126–137.
- Rojas, M., Yao, S. & Lin, Y. Z. 1996. Controlling epidermal growth factor (EGF)-stimulated Ras activation in intact cells by a cell-permeable peptide mimicking phosphorylated EGF receptor. ***The Journal of Biological Chemistry***, 271(44): 27456–27461.
- Roskoski, R. 2012. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. ***Pharmacological research***, 66(2): 105–143.
- Rötzer, V. 2015. ***Untersuchungen zu den Mechanismen der Assemblierung und Disassemblierung von Desmosomen am Beispiel des Pemphigus***. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität. München.
- Rötzer, V., Hartlieb, E., Winkler, J., Walter, E., Schlipp, A., Sardy, M., Spindler, V. & Waschke, J. 2016. Desmoglein 3-Dependent Signaling Regulates Keratinocyte Migration and Wound Healing. ***Journal of Investigative Dermatology***, 136(1): 301–310.
- Samak, G., Aggarwal, S. & Rao, R. K. 2011. ERK is involved in EGF-mediated protection of tight junctions, but not adherens junctions, in acetaldehyde-treated Caco-2 cell monolayers. ***American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology***, 301(1): G50-9.
- Schmitt, T., Hudemann, C., Moztarzadeh, S., Hertl, M., Tikkanen, R. & Waschke, J. 2023. Dsg3 epitope-specific signalling in pemphigus. ***Frontiers in Immunology***, 14: 1163066.
- Schmitt, T. & Waschke, J. 2021. Autoantibody-Specific Signalling in Pemphigus. ***Frontiers in medicine***, 8: 701809.
- Schnoor, M., Stradal, T. E. & Rottner, K. 2018. Cortactin: Cell Functions of A Multifaceted Actin-Binding Protein. ***Trends in cell biology***, 28(2): 79–98.

- Shimanovich, I., Nitschke, M., Rose, C., Grabbe, J. & Zillikens, D. 2008. Treatment of severe pemphigus with protein A immunoabsorption, rituximab and intravenous immunoglobulins. ***The British journal of dermatology***, 158(2): 382–388.
- Shoykhet, M., Trenz, S., Kempf, E., Williams, T., Gerull, B., Schinner, C., Yeruva, S. & Waschke, J. 2020. Cardiomyocyte adhesion and hyperadhesion differentially require ERK1/2 and plakoglobin. ***JCI insight***, 5(18).
- Sigismund, S., Avanzato, D. & Lanzetti, L. 2018. Emerging functions of the EGFR in cancer. ***Molecular oncology***, 12(1): 3–20.
- Sigmund, A. M., Steinert, L. S., Egu, D. T., Bayerbach, F. C., Waschke, J. & Vielmuth, F. 2020. Dsg2 Upregulation as a Rescue Mechanism in Pemphigus. ***Frontiers in Immunology***, 11: 581370.
- Spindler, V. & Waschke, J. 2018. Pemphigus-A Disease of Desmosome Dysfunction Caused by Multiple Mechanisms. ***Frontiers in Immunology***, 9: 136.
- Thomason, H. A., Scothern, A., McHarg, S. & Garrod, D. R. 2010. Desmosomes: adhesive strength and signalling in health and disease. ***The Biochemical journal***, 429(3): 419–433.
- Voldborg, B. R., Damstrup, L., Spang-Thomsen, M. & Poulsen, H. S. 1997. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. ***Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology***, 8(12): 1197–1206.
- Walter, E., Vielmuth, F., Rotkopf, L., Sárdy, M., Horváth, O. N., Goebeler, M., Schmidt, E., Eming, R., Hertl, M., Spindler, V. & Waschke, J. 2017. Different signaling patterns contribute to loss of keratinocyte cohesion dependent on autoantibody profile in pemphigus. ***Scientific reports***, 7(1): 3579.
- Walter, E., Vielmuth, F., Wanuske, M.-T., Seifert, M., Pollmann, R., Eming, R. & Waschke, J. 2019. Role of Dsg1- and Dsg3-Mediated Signaling in Pemphigus Autoantibody-Induced Loss of Keratinocyte Cohesion. ***Frontiers in Immunology***, 10: 1128.
- Waschke, J. 2008. The desmosome and pemphigus. ***Histochemistry and cell biology***, 130(1): 21–54.
- Waschke, J. & Spindler, V. 2014. Desmosomes and extradesmosomal adhesive signaling contacts in pemphigus. ***Medicinal research reviews***, 34(6): 1127–1145.

11 Abbildungsverzeichnis

Abbildungsnummer	Kurzbeschreibung
1	Schematische und elektronenmikroskopische Darstellung eines Desmosoms
2	Schematische Darstellung der Verteilung der desmosomalen Cadherine in der Epidermis
3	Klinische und histologische Bilder der unterschiedlichen Pemphigusformen
4	Schematische Darstellung der Signalwege, die zum Verständnis dieser Arbeit von Bedeutung sind
5	Statistische Auswertung der Zelldissoziationsassays von MEKs, HaCaTs und NHEKs unter basalen Bedingungen sowie repräsentative Fotodarstellung derselben
6	Western Blot-Analyse der gewonnenen SDS-Lysate aus NHEKs zur Beurteilung des Ausmaßes der Aktivierung von EGFR sowie der Proteinmengen von Dsg1 und Dsg3 in Abhängigkeit von der Inhibition von ADAM10 oder ADAM17 mit zugehörigen quantitativen Analysen
7	Repräsentative Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung nach ADAM-Inhibition sowie unter basalen Bedingungen
8	Statistische Auswertung sowie repräsentative Bilder der Zelldissoziationsassays von NHEKs, MEKs und HaCaTs unter Bedingungen der Hyperadhäsion
9	Zelldissoziationsassay mit NHEKs nach Inkubation von PV-IgG oder clgG und ADAM-Inhibitoren für 24 h
10	Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen von NHEKs unter ADAM-Inhibition bei gleichzeitiger Inkubation mit clgG oder PV-IgG
11	Zelldissoziationsassay von NHEKs nach Inkubation von AK23 und ADAM10-Inhibitor für 24 h
12	SDS-Lysate in der Western Blot-Analyse und Ctnn-Immunfärbung von Ctnn-Wildtyp-Zellen und -Knock-Out-Zellen im Vergleich
13	Statistische Auswertung sowie repräsentative Bilder vom Zelldissoziationsassay mit MEK-Wildtyp- und Ctnn-Knock-Out-Zellen
14	Repräsentative Western-Blot-Analysen von SDS- und Triton-Lysaten einiger desmosomaler Cadherine sowie statistische Auswertung der signifikant veränderten Proteine
15	Repräsentative Western-Blot-Analysen von SDS-Lysaten der desmosomalen Signalmoleküle pErk1/2 und EGFR
16	Repräsentative Aufnahmen aus der Immunfluoreszenzmikroskopie für verschiedene desmosomale Cadherine sowie Zytokeratin
17	SDS- und Triton-Proteinextraktion von E-Cadherin sowie repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen von E-Cadherin und Plakoglobin
18	Western Blot-Analyse der SDS- sowie Triton-Lysate bezüglich des Tight-Junction-Proteins Occludin, statistische Auswertung der SDS-

	Lysat- und Triton-Blots sowie repräsentative Bilder aus der Immunfluoreszenzmikroskopie für Occludin, Claudin 1 und Claudin 4
19	Schematische Darstellung der bereits bekannten, durch die vorliegende Arbeit entschlüsselten sowie noch weiter zu untersuchenden Signalwege mit potentieller Bedeutung für die Pathogenese des Pemphigus

12 Tabellenverzeichnis

Tabelle	Inhalt
1	Zelllinien
2	Chemikalien
3	Puffer und Lösungen
4	Primär-Antikörper
5	Sekundär-Antikörper
6	Mediatoren
7	PV-IgG und AK23
8	Verbrauchsmaterialien und Geräte

13 Publikation

Daniela Kugelman, Maresa Anders, Anna M. Sigmund, Desalegn T. Egu, Ramona A. Eichkorn, Amir S. Yazdi, Miklós Sárdy, Michael Hertl, Dario Didona, Takashi Hashimoto and Jens Waschke (2022). Role of ADAM10 and ADAM17 in the Regulation of Keratinocyte Adhesion in Pemphigus Vulgaris. *Frontiers in Immunology* 13, 1-8

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all den Personen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Zunächst gilt großer Dank Herrn Professor Jens Waschke. Er hat nicht nur das Thema für diese Arbeit zur Verfügung gestellt, sondern hatte auch während der Durchführung immer ein offenes Ohr, um mich bei der Planung und Interpretation der Experimente zu unterstützen und neue Ansätze für das weitere Vorgehen zu entwickeln. Darüber hinaus bin ich Herrn Professor Waschke überaus dankbar dafür, dass er mein Interesse an der Anatomie, vor allem an der Lehre, geweckt und gefördert hat.

Zudem danke ich meiner Betreuerin Frau Dr. Daniela Kugelman. Sie stand mir stets auch zu unüblichen Zeiten mit Rat und Tat zur Seite, hatte bei Schwierigkeiten ein offenes Ohr. Zudem war Sie immer zur Stelle, wenn ich Ermutigung, Hilfe oder andere Unterstützung benötigt habe.

Für die geduldige Einarbeitung und unermüdliches Erklären danke ich vor allem Frau Martina Hitzenbichler und außerdem Frau Sabine Mühlhimer und Frau Silke Gotschy. Ohne die praktische Unterstützung dieser hilfsbereiten technischen Assistentinnen wäre die vorliegende Arbeit wohl nicht möglich gewesen. Hervorzuheben ist an dieser Stelle auch Dr. Thomas Schmitt, der immer da war, wenn ich Fragen oder technische Probleme hatte. Durch so manche fachliche Diskussion half er mir, diese Arbeit voranzutreiben.

Dem ganzen Laborteam der Arbeitsgemeinschaft Waschke gilt nicht nur großer Dank für die fachliche Unterstützung, sondern auch für die wunderbare Arbeitsatmosphäre im Labor, die mit dafür gesorgt hat, dass ich gerne zur Arbeit gekommen bin. Gerade zu meiner Anfangszeit, die auf den Start der Coronapandemie fiel, war der Zusammenhalt im Labor besonders spürbar. Besonders bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei meinen Doktoranden-Kolleginnen Frau Julia Pircher und Frau Jessica Neubauer für ersprießlichen fachlichen Austausch und weit über die Arbeit hinaus bestehende Freundschaft.

Last but not least: Ein herzliches „Vergelts Gott“ an meine Familie. Ihr habt mich emotional unterstützt, immer wieder ermutigt und motiviert, wenn es mal nicht so lief, wie geplant, mich aufgebaut und bekocht, wenn ich wieder mal sehr lange im Labor war und erschöpft nach Hause kam. Während des Schreibens dieser Arbeit stand mir vor allem mein Großvater mit seinen Korrekturhinweisen zur Seite. Ohne Euch wäre diese Arbeit vielleicht nicht zustande gekommen.

Vielen Dank

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Maresa Elisabeth Anders, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Bedeutung von ADAM10 und Cortactin für die Zelladhäsion von Keratinozyten und die Pathogenese von Pemphigus Vulgaris

selbstständig verfasst, mich außer den 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 ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ottobrunn, den 11.08.2025

Maresa Anders

Erklärung der Übereinstimmung der gebundenen und elektronischen Fassung der Dissertation

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

Bedeutung von ADAM10 und Cortactin für die Zelladhäsion von Keratinozyten und die Pathogenese von Pemphigus Vulgaris

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

Ottbrunn, den 11.08.2025

Maresa Anders