

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

„cAMP-abhängige Signalkomplexe bei Pemphigus vulgaris“

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

vorgelegt von
Markus Winkler

aus
München

Jahr
2026

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Jens Waschke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Kathrin Giehl

PD Dr. Carl Georg Schirren

PD Dr. René Pierre Chatelain

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. Franziska Vielmuth

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 15.01.2026

Für meine Familie, Freundinnen und Freunde

1. ZUSAMMENFASSUNG	8
2. EINLEITUNG	10
3. DIE EPIDERMIS	10
3.1. Zell-Zell-Kontakte	11
3.1.1. Haftkontakte, Adhäsionskontakte.....	12
3.1.1. Desmosomen	13
3.1.2. Zelladhäsionsmoleküle.....	14
3.1.3. Plaqueproteine.....	16
3.1.4. Keratinfilamente	17
3.1.5. Desmosomaler Molekülumsatz.....	18
3.1.6. An der Regulation von desmosomaler Adhäsion beteiligte Signalwege	19
3.2. Regulation der Zelladhäsion durch cAMP	20
3.3. Blasenbildende Autoimmundermatosen	22
3.4. Pemphigus	22
3.4.1. Epidemiologie.....	23
3.4.2. Ätiologie	23
3.4.1. Klinik.....	24
3.4.2. Diagnostik.....	24
3.4.3. Therapie und Prognose	25
3.4.4. Pathomechanismus.....	26
4. FRAGESTELLUNG	33
5. MATERIAL	34
5.1. Zelllinien und Bakterienstämme	34
5.2. Konstrukte	34
5.3. Zellkulturmedien	34
5.4. Primärantikörper.....	35
5.5. Sekundärantikörper	35

5.6.	Mediatoren	36
5.7.	PV-IgG-Spiegel.....	36
5.8.	Chemikalien	36
5.9.	Puffer und Lösungen	38
5.10.	Geräte, Software, etc.	40
6.	METHODEN.....	43
6.1.	Zellkultur.....	43
6.2.	Transformation in prokaryotischen Zellen	44
6.3.	Plasmid-DNS Isolierung aus Bakterien	44
6.4.	Sequenzierung der Plasmid-DNS.....	45
6.5.	Transfektion in eukaryontischen Zellen	45
6.6.	DNS-Isolierung aus eukaryotischen Zellen	46
6.7.	Polymerasekettenreaktion	46
6.8.	Aufreinigung von Patienten- und Kontrollantikörpern mittels Affinitätschromatographie	46
6.9.	<i>Ex vivo</i> -Pemphigus-Hautmodell	47
6.10.	Keratinozytendissoziationsversuche	48
6.11.	Proteinbiochemische Methoden.....	49
6.11.1.	Proteinextraktion im SDS-Lysepuffer	49
6.11.2.	Triton-X-100-vermittelte Proteinextraktion	49
6.11.3.	Gesamtproteinkonzentrationsbestimmung	50
6.11.4.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	50
6.11.5.	Western Blot-Analyse.....	51
6.11.6.	Färbung und Aufnahme.....	51
6.11.7.	Enzyme Immunoassay Kit.....	52
6.12.	Indirekte Immunfluoreszenz.....	53
6.13.	Hämatoxilin-Eosin-Färbung	54

6.14. Rasterkraftmikroskopie	55
6.14.1. Proteinaufreinigung.....	57
6.14.2. Funktionalisierung der Messspitze	58
6.14.3. Messung und Auswertung.....	58
6.15. Migrationsversuche.....	59
6.16. Aufnahme und Auswertung von Bild- und Datenmaterial	60
Keratinocyten-Dissoziationsversuche	60
Western-Blot-Analyse.....	60
Immunfluoreszenzmikroskopie	60
Rasterkraftmikroskopie	61
Statistik und Graphische Darstellung.....	61
7. ERGEBNISSE	63
7.1. Apremilast induziert eine cAMP-Spiegelerhöhung in humanen Keratinozyten.....	63
7.2. Apremilast stärkt die Zelladhäsion humaner Keratinozyten dosisabhängig.....	64
7.3. Apremilast wirkt protektiv gegen den AK23-vermittelten Haftungsverlust in humanen Keratinozyten.	65
7.4. Apremilast wirkt protektiv gegen PV-IgG-vermittelten Haftungsverlust in humanen Keratinozyten.	67
7.5. Apremilast hat keinen Einfluss auf die durch PV-IgG induzierte-Dsg3 Depletion.	70
7.6. Die Einzelmolekülbindungseigenschaften von Dsg3 werden durch Apremilast nicht beeinflusst.	72
7.7. Die Lokalisation von Dsg2, Dsc3 sowie E-Cadherin werden durch Apremilast und nach PV-IgG Inkubation nicht beeinflusst.	73
7.8. Apremilast hemmt die durch PV-IgG-induzierte Keratinfilamentretraktion in vitro.....	77
7.9. Plakoglobin wird durch eine cAMP-Spiegelerhöhung an Ser665 phosphoryliert.....	82
7.10. Rekonstruktion Plakoglobin-defizienter Zellen mit Plakoglobin-Wt und Plakoglobin-Mutante Ser665A	83
7.11. Apremilast hemmt die PV-IgG-induzierte intraepidermale Spaltbildung im <i>ex vivo</i> Pemphigus-Hautmodell.....	86
7.12. Ein erhöhter cAMP-Spiegel hemmt die Zellmigration in humanen Keratinozyten.	90

8.	DISKUSSION	91
8.1.	Der dosisabhängige Einfluss von cAMP auf die Keratinozytenadhäsion	91
8.2.	Apremilast hemmt die PV-IgG-induzierte Keratinretraktion.....	92
8.3.	Phosphorylierung an Plakoglobin-Serin 665 stärkt die Zelladhäsion von Keratinozyten	93
8.4.	Die Rolle von Plakoglobin bei Pemphigus	95
8.5.	Ursachen der cAMP-Spiegelerhöhung bei Pemphigus und ihre Auswirkungen auf die Zelladhäsion .	96
8.6.	Apremilast als Therapieoption bei Pemphigus	98
8.7.	Der Einfluss von cAMP auf den Zellzyklus und Gewebedifferenzierung.....	99
8.8.	Ausblick: Apremilast als Therapeutikum bei hyperproliferativen Erkrankungen	100
9.	LITERATURVERZEICHNIS.....	101
10.	ANHANG	115
10.1.	Abbildungsverzeichnis.....	115
10.2.	Abkürzungsverzeichnis	116
11.	DANKSAGUNG.....	118
12.	AFFIDAVIT	119
13.	LEBENS LAUF.....	120
14.	PUBLIKATIONS LISTE	123

1. Zusammenfassung

Desmosomen sind Zell-Zell-Kontakte, die in der Haut und anderen mechanisch beanspruchten Geweben für eine starke interzelluläre Haftung verantwortlich sind. Dabei handelt es sich um Multiproteinkomplexe, die sich aus verschiedenen Proteinen zusammensetzen: Cadherine sind Transmembranproteine, die im interzellulären Spalt miteinander interagieren, ihnen schließen sich intrazellulär eine Reihe von Plaqueproteinen an, die die Verankerung an das Intermediärfilamentzytoskelett vermitteln. Bei der Autoimmundermatose Pemphigus führt die Autoantikörperbildung vor allem gegen die desmosomalen Cadherine Desmoglein-1 (Dsg1) und Desmoglein-3 (Dsg3) zur Spaltbildung in der Epidermis und Blasenbildung. Der genaue Pathomechanismus der Pemphiguserkrankung ist noch nicht abschließend geklärt, jedoch finden sich nach Antikörperbindung eine Reihe von Signalwegsalterationen, die zum Zellhaftungsverlust beitragen. Ein wichtiger Teil der Pathogenese ist das als „Keratinretraktion“ beschriebene Abkoppeln der Desmosomen vom Intermediärfilamentzytoskelett. 2010 wurde erstmals der protektive Effekt einer pharmakologischen cAMP-Spiegelerhöhung auf einen durch Pemphigus-vulgaris-IgG (PV-IgG) hervorgerufenen Zellhaftungsverlust durch Hemmung der Dsg-3-Depletion beschrieben. Mit der Zulassung des Phosphodiesterasehemmers Apremilast steht mittlerweile ein klinisch zugelassenes Medikament zu Verfügung, das, neben den in der Zulassungsstudie beschriebenen Effekten auf das Immunsystem, auch den cAMP-Spiegel in Keratinozyten erhöht. Im Herzmuskel wurde von einer Stärkung der Desmoglein-2-Bindung in Abhängigkeit einer erstmalig beschriebenen cAMP-abhängigen Phosphorylierung des desmosomalen Plaqueproteins Plakoglobin an Serin 665 berichtet.

In dieser Arbeit konnte mittels *in vitro*-Experimenten der protektive Effekt von Apremilast auf PV-IgG-induziertem Zellhaftungsverlust dargelegt werden. Im *ex vivo*-Hautmodell verhinderte Apremilast die Blasenbildung durch PV-IgGs vollständig und hemmte die bei Pemphigus auftretende Keratinretraktion. Es konnte jedoch keine Hemmung der bei Pemphigus auftretenden Dsg-3-Depletion festgestellt werden und auch auf die Einzelmoleküleigenschaften von Dsg-3 hatte Apremilast keinen Einfluss. Mechanistisch führt Apremilast in Keratinozyten zu einer Phosphorylierung von Plakoglobin an Serin 665. In Zusammenschau der Daten scheint cAMP dosisabhängig verschiedene Schritte in der Pemphiguspathogenese zu beeinflussen.

Aufgrund seines direkten Einflusses auf die desmosomale Haftung von Keratinozyten und des bereits etablierten Einsatzes zur Behandlung von Psoriasis kann Apremilast somit als potenzielles Therapeutikum bei Pemphigus vulgaris vorgeschlagen werden.

2. Einleitung

3. Die Epidermis

Mit 1,6 – 2 m² ist die Hautdecke (lat. „Integumentum commune“) das nach Fläche größte Organ des Menschen. Die Hautdecke übernimmt im Körper verschiedene Funktionen: sie absorbiert Strahlung und schützt den Körper vor mechanischen und chemisch-toxischen Schäden, sowie vor dem Eindringen von Krankheitserregern. Zudem ist sie ein Ort der Immunabwehr und übernimmt Aufgaben der immunologischen Überwachung. Außerdem sorgt sie für Temperaturregulation und verhindert zu großen Wasserverlust, speichert Energie und produziert Vitamin D. Zusätzlich ist sie ein Ort der Sinneswahrnehmung, dient aber auch selbst zur Kommunikation (Welsch et al., 2022, Rassner, 2009, Lüllmann-Rauch and Asan, 2019).

Die Hautdecke lässt sich in zwei Schichten gliedern: Cutis mit Oberhaut (lat.: „Epidermis“) und Lederhaut (lat.: „Dermis“) und die Unterhaut (lat.: „Subcutis“). Die Subcutis besteht zum Großteil aus Fettgewebe, das als Druckpolster, Wärmeisolator und Energiespeicher dient. Sie wird von Bindegewebssepten durchzogen, in denen sich versorgende Leitungsbahnen finden. Zusätzlich finden sich in der Subcutis Drüsen und Organe, die der Sinneswahrnehmung dienen, sowie Haarfollikel (Lüllmann-Rauch and Asan, 2019).

Die sich anschließende Dermis besteht aus Bindegewebe, verleiht der Haut Festigkeit und Elastizität und speichert Wasser. Man unterscheidet das dichtere Stratum reticulare vom lockereren Stratum papillare, welches die Dermis mit der Epidermis verzahnt. Die hier verlaufenden Gefäße versorgen nicht nur die Umgebung, sondern dienen auch der Wärmeregulation. Außerdem finden sich Zellen der Immunabwehr und diverse Sinnesrezeptoren (Welsch et al., 2022).

Die Epidermis ist die äußerste Schicht des Körpers und bildet die eigentliche Barriere der Haut zu ihrer Umwelt. Sie besteht aus mehrschichtig verhorntem Plattenepithel, das sich zu 90% aus Keratinozyten zusammengesetzt (Rassner, 2009). Zusätzlich dazu enthält sie vereinzelt Melanozyten, Immunzellen und Sinnesrezeptoren (Lüllmann-Rauch and Asan, 2019). Die Keratinozyten lagern auf einer Basalmembran, die der Dermis aufliegt (Gumbiner, 1996). Keratinozyten sind spezialisierte Epithelzellen, die innerhalb von vier Wochen verschiedene Differenzierungsstadien und somit die verschiedenen Schichten der Epidermis durchlaufen (Blanpain and Fuchs, 2009).

Im Stratum basale stehen die kubischen Keratinozyten noch direkt über Hemidesmosomen mit der Basallamina in Kontakt. Hier kommen auch Stammzellen vor, die zu weiterhin teilungsfreudigen Vorläuferzellen proliferieren. Postmitotische Keratinozyten treten schließlich in den Differenzierungsprozess ein. Wenn die Zellen zunehmend an Volumen gewinnen und keinen direkten Kontakt mehr zur Basalmembran haben, spricht man von Stratum spinosum. Im anschließenden Stratum granulosum enthalten die Zellen zunehmend basophile granuläre Strukturen, sogenannte Keratohyalingranula, die aus Zytokeratinfilamentbündeln und Keratohyalin bestehen und erste Korrelate der beginnenden Verhornung sind (Lüllmann-Rauch, 2015). Die oberste Schicht bildet das Stratum corneum, in dem die apoptotischen Keratinozyten nun als kernlose Korneozyten zusammen mit einer speziellen, von den Keratinozyten gebildeten Interzellulärsubstanz die Hornschicht bilden. Unter Wahrung eines Gleichgewichts mit den neugebildeten Basalzellen werden hier alte Hornzellen abgeschilfert (Rassner, 2009).

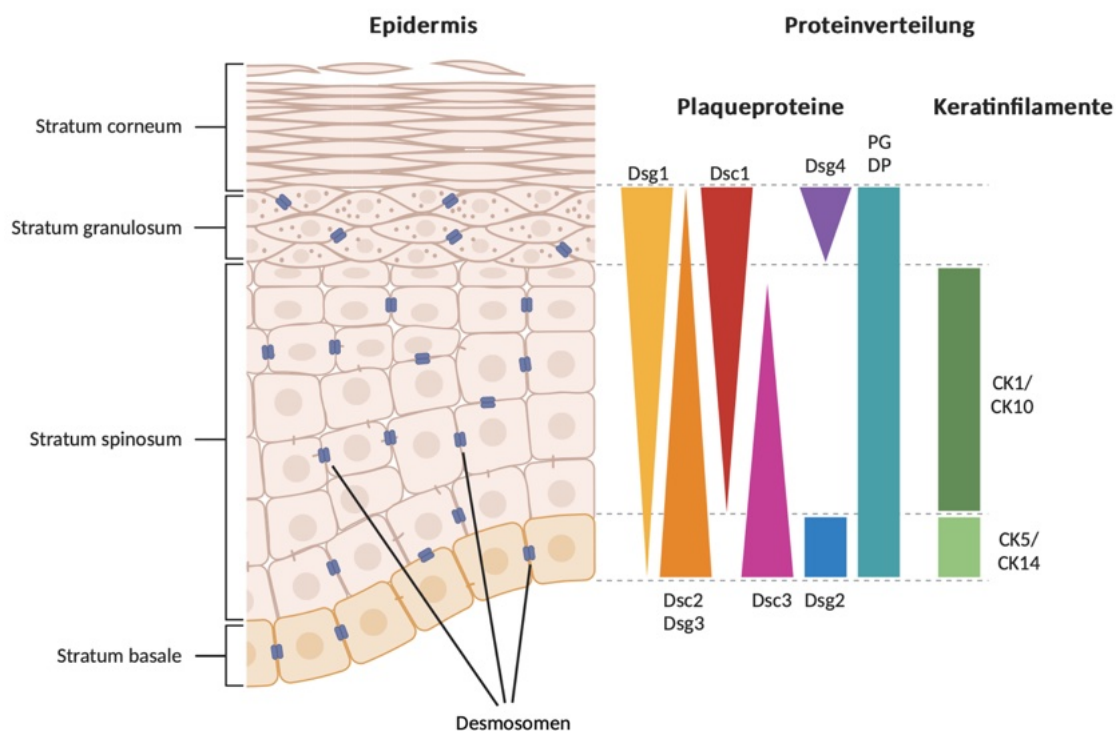


Abbildung 1: Gliederung der Epidermis und vereinfachte Darstellung der Verteilung desmosomaler Proteine.

Modifiziert nach Egu et al., 2022 und Kirfel et al., 2003, mit BioRender.com erstellt.

3.1. Zell-Zell-Kontakte

Um mechanischen Zusammenhalt zu gewährleisten und mit der eigenen Umwelt interagieren zu können, bilden Zellen verschiedene Arten von Zellkontakten untereinander, sowie mit der

umgebenden Matrix aus. Diese finden sich je nach Funktion des Gewebes in verschiedener Ausprägung (Alberts, 2015).

Verschlusskontakte (Tight junctions) kommen in Endothelien, sowie einschichtigen und mehrschichtigen Epithelien vor und dienen der Versiegelung des Interzellulärspalts und Abgrenzung von verschiedenen Kompartimenten. Sie tragen zur Bildung einer Diffusionsbarriere bei, wodurch der parazelluläre Transport limitiert wird. Die Verschlusskontakte werden durch die Proteine Occludin und verschiedene Claudine gebildet und sind über Adaptorproteine an das Aktinskelett gekoppelt. Ohne eine Absicherung durch mechanische Zellkontakte in unmittelbarer Nähe kann eine Barriere jedoch nicht aufrechterhalten werden (Capaldo et al., 2014, Green et al., 2019).

Kommunikationskontakte (Nexus, „Gap junctions“) bilden ionendurchlässige Kanäle zwischen dem Inneren von zwei Zellen, wodurch ein elektrophysiologischer und metabolischer Austausch bis zu einer Molekülgröße von <1 kDa ermöglicht wird (Lüllmann-Rauch and Asan, 2019). Besonders wichtig sind diese Kontakte für koordinierte muskuläre und neuronale Erregung. Mehrere Connexine bilden ein Connexon und je ein Connexon von zwei benachbarten Zellen eine „Gap junction“. Die Connexone sind ebenfalls über Adaptorproteine an das Aktinskelett angebunden (Alberts, 2015).

Die Basalzellen bilden an der Basalmembran Zell-Matrix-Kontakte und vermitteln so Haftung an die sie umgebende Matrix. Integrine formen Hemidesmosomen und Fokalkontakte und interagieren über Laminine mit den Kollagenen der Extrazellulärmatrix (Alberts, 2015, Green et al., 2019).

3.1.1. Haftkontakte, Adhäsionskontakte

Adhaerens-Junktionen werden von Desmosomen unterschieden. Adhärenskontakte treten in vielen nicht-epithelialen Geweben meist als kleine punktförmige oder lineare Kontakte auf. In Epithelien finden sie sich am häufigsten in Form einer Zonula adhaerens und verbinden Zellen ringsherum gürtelförmig mit Nachbarzellen. In den Adhärenskontakten finden sich als Transmembranproteine gewebespezifische klassische Cadherine, in Epithelien z.B. E-Cadherin (Franke, 2009). Verankert werden die Adhärenskontakte über ihre Plaqueproteine (u.a. α -, β - und p120-Catenin) mit den hier parallel zur Membran laufenden Aktin- und Myosinfilamenten (Lüllmann-Rauch and Asan, 2019). Den in der Plaque vorkommenden Proteinen kommen verschiedene Aufgaben zu. Zum einen dienen sie als Mechanosensoren und können auf die entlang des Zytoskeletts auftretenden Kräfte oder andere regulatorische Signale reagieren

und in der Folge ihre Bindung stärken (Hegazy et al., 2022, Alberts, 2015). Zum anderen entsteht durch dieses komplexe Netzwerk die Fähigkeit zu einer gewissen Mobilität und Motilität der Zellen, wodurch die Zellen die Möglichkeit erlangen, ihre Oberfläche zu modellieren und z.B. Krypten oder Vesikel zu bilden (Alberts, 2015).

Besondere Bedeutung haben die Adhärens-Junktionen zudem in der embryonalen Entwicklung (Franke, 2009).

3.1.1. Desmosomen

Desmosomen sind fleck- oder punktförmige Haftkontakte von 0,2 – 0,5 µm Durchmesser und die wichtigsten Zell-Zell-Kontakte, um die Integrität von Geweben bei mechanischer Belastung zu gewährleisten (Thomason et al., 2010). Man findet sie daher vor allem in mechanisch beanspruchten Geweben wie der Haut, den Schleimhäuten, sowie dem Myokard (Waschke, 2008, Kowalczyk and Green, 2013). Darüber hinaus finden sich aber auch in der Arachnoidea Desmosomen und einzelne desmosomale Proteine (Akat et al., 2003).

Desmosomen sind Proteinkomplexe bestehend aus Proteinen unterschiedlicher Familien: desmosomale Cadherine wie Desmogleine (Dsg) und Desmocolline (Dsc), Armadilloproteine wie Plakoglobin (Pg) und Plakophilin (Pkp), sowie Desmoplakin (Dp) aus der Plakinfamilie (Green et al., 2019). Über Intermediärfilamente werden sie am Zytoskelett verankert (Waschke, 2008) (siehe Abbildung 2).

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind Desmosomen an ihren elektronendichten Plaques zu erkennen, die sich spiegelbildlich entlang der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran von aneinanderhaftenden Zellen anordnen. Man unterscheidet die innere dichte Plaque (IDP), in der Intermediärfilamente (IF) an Dp binden, von der äußeren dichten Plaque (engl. „outer dense plaque“, ODP), die direkt der Plasmamembran (PM) anliegt. Im ca. 30 nm breiten Interzellularspalt findet die eigentliche Bindung der Extrazellulärdomäne der desmosomalen Cadherine statt, welche durch eine verdichtete Mittellinie (engl. „dense midline“, DM) im elektronenmikroskopischen Bild zu erkennen ist (Thomason et al., 2010, Hegazy et al., 2022).

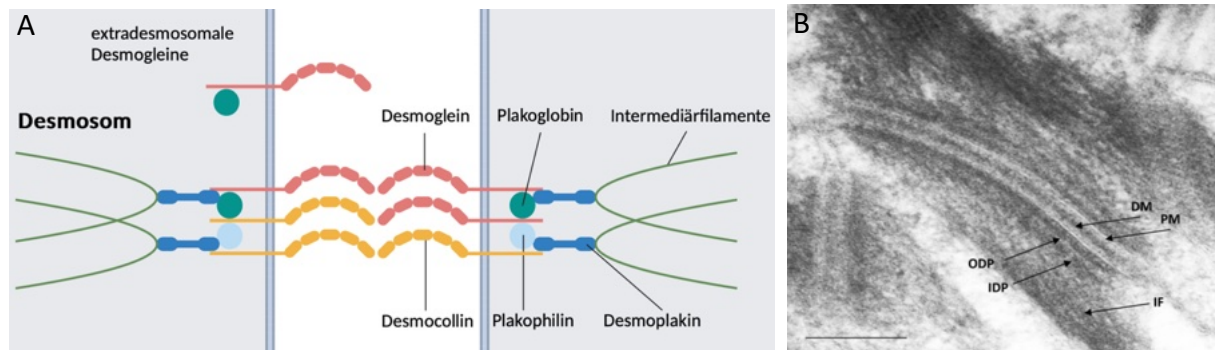


Abbildung 2: A Struktureller Aufbau eines Desmosoms. B Elektronenmikroskopische Darstellung eines Desmosoms.

Äußere dichte Plaque (ODP), Innere dichte Plaque (IDP), verdichtete Mittellinie (DM), Plasmamembran (PM) Intermediärfilamente (IF). Modifiziert nach Waschke and Spindler, 2014, mit BioRender.com erstellt (A). Aus Thomason et al., 2010, Größenmarker 160 nm (B).

3.1.2. Zelladhäsionsmoleküle

Die Gruppe der Cadherine umfasst mehr als 180 verschiedene Transmembranproteine, deren charakteristische, namensgebende Eigenschaft ihre Ca^{2+} -abhängige Fähigkeit zur Ausbildung von extrazellulären Bindungen ist (Alberts, 2015). Alle Cadherine weisen eine ähnliche Primärstruktur auf. Gemein haben sie ihre extrazelluläre Komponente bestehend aus mehreren Kopien von *extracellular cadherine (EC) domains*, die sich wiederum aus ca. 110 Aminosäuren zusammensetzen, die unter anderem 7 β -Faltblätter bilden. Die Anzahl an Wiederholungen der EC-Domänen und ihre Anordnung erlaubt eine Zuordnung in weitere Untergruppen (Brasch et al., 2012). Dem N-terminus vorgeschaltet liegt ein Precursor-Protein, welches intrazellulär synthetisiert und proteolytisch abgespalten wird, bevor ein aktives Adhäsionsmolekül entstehen kann (Amagai, 1995). Von je einem extra- und einem intrazellulären Anker flankiert, folgt eine Transmembrandomäne, die die Zellmembran einmal durchspannt, sodass das Aminoende extrazellulär zu liegen kommt (Amagai, 1995, Dusek et al., 2007). C-terminal, auf der zytosolischen Seite der Membran folgt dem intrazellulären Anker eine Cadherin-typische Sequenz (ICS) mit Bindungsstellen für die sich anschließenden Plaqueproteine. Über diese Sequenz interagieren die Desmogleine außerdem mit Nachbarmolekülen (Dusek et al., 2007).

Unterschieden werden die klassischen Cadherine, wie E-, N- und P-Cadherin, von den nicht-klassischen Cadherinen (Harris and Tepass, 2010). Diese beinhalten auch die desmosomalen Cadherine, Desmoglein und Desmocollin, deren Aminosäuren zu ca. 30% homolog zueinander und zu denen der klassischen Cadherine sind (Garrod et al., 2002).

Die klassischen Cadherine sind bisher am besten untersucht und stellen eine Art Prototyp für Ca^{2+} -abhängige homophile Zellinteraktion dar. Ihre Ektodomäne besteht aus fünf starren EC-Domänen, welche untereinander durch ein Ca^{2+} -abhängig versteifendes Gelenk verbunden sind (Shapiro and Weis, 2009, Shapiro et al., 1995, Overduin et al., 1996). Bindungen zwischen zwei Cadherinen von benachbarten Zellen werden *trans*-Bindungen genannt, während zwei benachbarte Cadherine derselben Zelle *cis*-Bindungen ausbilden (He et al., 2003, Al-Amoudi et al., 2007). Strukturelle Analysen der Ektodomänen der Cadherine haben ergeben, dass das N-terminale β -Faltblatt der EC1-Domäne entscheidend für die *trans*-Bindung von klassischen Cadherinen ist. Schlüssel ist dabei die wechselseitige Interaktion eines hydrophoben Ankers des einen Cadherins in eine passende hydrophobe Tasche des gegenüberliegenden Cadherins. Dieser Mechanismus wird auch „strand swap“ (Strangaustausch) genannt (Brasch et al., 2012).

Obwohl bisher kein Nachweis des genauen Bindungsverhaltens der desmosomalen Cadherine gelingen konnte, wird aufgrund der großen Homologie, besonders der EC1-Domäne, vermutet, dass sie einen ähnlichen Bindungsmechanismus wie die klassischen Cadherine nutzen (Yin and Green, 2004, Dusek et al., 2007, Green et al., 2019, Hegazy et al., 2022). Es wurden sowohl heterophile als auch homophile Interaktionen zwischen den verschiedenen desmosomalen Cadherinen nachgewiesen. Strukturelle Analysen zellfreier Experimente deuten darauf hin, dass homophile Interaktionen durch geladene Aminosäuren gehemmt werden könnten und deshalb schwächer als heterophile seien (Harrison et al., 2016). Studien mit lebenden Keratinozyten zeigten hingegen eine Präferenz der homophilen Interaktionen (Vielmuth et al., 2018a, Nie et al., 2011).

Beim Menschen finden sich vier Isoformen von Desmogleinen (Dsg1-4) und drei Isoformen von Desmocollinen (Dsc1-3), deren Verteilung gewebe- und differenzierungsabhängig ist. Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass diese Expressionsmuster eine wichtige Rolle bei der Ausdifferenzierung der epidermalen Schichten haben (Kowalczyk and Green, 2013). So unterscheiden sich die Desmosomen auch auf biochemischer und funktioneller Ebene in Abhängigkeit der Gewebeschichten (Brooke et al., 2012).

Dsg2 und Dsc2 werden in allen Desmosomen-tragenden Geweben exprimiert, in der Haut vor allem in der basalen Schicht. Dsg1 und Dsc1 werden in der granulären und spinösen Schicht kräftig exprimiert und nehmen zu den tieferen Schichten hin ab. Dsg3 und Dsc3 findet sich in umgekehrter Weise verstärkt in den basalen Zellschichten und nimmt nach superfiziell hin ab.

Dsg4 findet sich in Haarfollikeln und ist auf die granuläre Schicht beschränkt (Brooke et al., 2012) (siehe Abbildung 1).

Über ihr desmosomales Vorkommen hinaus finden sich desmosomale Cadherine auch "extradesmosomal", wo eine Assoziation zu Aktinfilamenten diskutiert wird (Sato et al., 2000, Tsang et al., 2012, Fuchs et al., 2023). Diese fungieren adhäsionsabhängig, wie auch - unabhängig als Signalmoleküle und vermitteln „outside-in-signaling“ (Waschke and Spindler, 2014, Yulis et al., 2018).

3.1.3. Plaqueproteine

Plakoglobin (Pg, auch γ -Catenin genannt) und die Plakophiline sind Proteine der Gruppe der Armadilloproteine und Bestandteile der desmosomalen Plaque. Ihre Aufgabe ist zum einen die mechanische Verankerung und Bindung der Cadherine an das Zytoskelett über Dp. Zum anderen steuern beide Proteine die Assemblierung von Cadherinen und deren laterale Interaktion und nehmen so eine zentrale Rolle bei der Regulation des Auf- und Abbau der Desmosomen ein (Kowalczyk and Green, 2013).

Pg setzt sich aus 12 Armadillo-Wiederholungen, flankiert von einer N- und einer C-terminalen Region, zusammen. Über seine C-terminale Seite bindet Pg an die ICS-Domäne von Dsg und Dsc und fungiert so als Brücke zwischen dem Cadherin-Schwanz und den Intermediärfilamente-bindenden Proteinen (Delva et al., 2009). Es zeigt eine große Ähnlichkeit zu β -Catenin, welches ähnliche Aufgaben in Adhärens-Junktionen erfüllt. Beide Proteine können in den Zellkern translozieren und Einfluss auf die Proteinexpression und den Zellzyklus nehmen (Green and Simpson, 2007, Hu et al., 2003, Brooke et al., 2012). Pg kann sowohl mit desmosomalen Proteinen interagieren als auch mit denen der Adhärens-Junktionen, weshalb ihm eine besondere Rolle bei der Formierung neuer Zellkontakte zugeschrieben wird (Hegazy et al., 2022). Eine Reihe von möglichen Phosphorylierungsstellen beeinflussen die Funktion und Bindungsaffinität von Pg an desmosomale Cadherine und Dp und somit auch die Stärke der desmosomalen Bindung (Miravet et al., 2003, Yin et al., 2005a, Gaudry et al., 2001, Hu et al., 2001).

Pg-defiziente Keratinozyten sind nicht mehr in der Lage, adäquat auf Umweltreize zu reagieren (Yin et al., 2005b). Sie zeigen eine Reihe von Signalwegdysregulationen und hyperproliferieren. In dieser Weise wirkt Pg wie ein Gegenspieler des Tumorpromotors β -Catenin (Williamson et al., 2006, Charpentier et al., 2000, Yin et al., 2005a). Die Verbindung von Zelladhäsion durch Cadherine und an diese gebundenen Plaqueproteinen zu Pg-

vermittelten Transkriptionsmechanismen zeigt, wie durch Pg Umweltreize in die Regulation des Zellzyklus und der Zelladhäsion integriert werden (Waschke, 2008, Williamson et al., 2006, de Bruin et al., 2007).

In einer Studie mit Kardiomyozyten und murinen Herzschnitten konnte gezeigt werden, dass adrenerges Signaling, mittels β -Agonist oder Adenylatzyklaseaktivator und Phosphodiesteraseinhibitor, die Zelladhäsion durch Stärkung der Desmoglein-2 Interaktion verbessert. Für dieses Phänomen wurde der Begriff der positiven Adhäsiotropie geprägt. Als zugrunde liegender Mechanismus wurde die Pg-Expression in den Glanzstreifen und im Speziellen eine PKA-abhängige Phosphorylierung von Pg an Serin 665 identifiziert. Sowohl Pg-defiziente Kardiomyozyten als auch Kardiomyozyten mit phosphodefizienten Pg an S665 zeigten kein Ansprechen auf eine cAMP-Spiegelerhöhung mehr (Schinner et al., 2017).

Die Pkp 1-3 gehören zur Gruppe der p120-Catenin-Unterfamilie und werden ebenfalls differenzierungsabhängig exprimiert (Kowalczyk and Green, 2013). Sie helfen dabei, die desmosomalen Proteinen zur elektronendichten Plaque zu bündeln (Hegazy et al., 2022).

Dp spielt eine Schlüsselrolle als Verbindungsstück zwischen der Plasmamembran und den Keratinfilamenten. Es formt Homodimere, welche N-terminal an Pg und Pkp und C-terminal an die Keratinfilamente binden (Kowalczyk and Green, 2013). Es sind zwei verschiedene Splicingvarianten von Dp bekannt, die ebenfalls gewebe- und differenzierungsabhängig exprimiert werden (Brooke et al., 2012). Dp ist an der Regulation der desmosomalen Haftung und Verankerung der Keratinfilamente u.a. über den PKC α -Signalweg beteiligt (Kroger et al., 2013, Hobbs and Green, 2012).

3.1.4. Keratinfilamente

Keratinfilamente sind die Intermediärfilamente der Keratinozyten. Intermediärfilamente vermitteln mechanische Stärke, indem sie seilartige Strukturen bilden. Sie finden sich daher in besonderem Maße in Zellen, die großen mechanischen Belastungen ausgesetzt sind (Alberts, 2015, Kirfel et al., 2003). Sie setzen sich aus mehreren einzelnen länglichen Proteinen mit zentraler α -Helix zusammen. Je zwei Proteine sind spiralförmig zu einem Dimer verwunden. Zwei Dimere wiederum bilden ein Tetramer, von welchen sich acht lateral zusammenlagern, um ein seilartiges Filament zu bilden (Herrmann and Aebi, 2016). Im Gegensatz zu Aktin oder Mikrotubuli zeigen Intermediärfilamente keine polare Anordnung (Bragulla and Homberger, 2009). Unter den Intermediärfilamenten bilden Keratinfilamente mit über 20 verschiedenen Varianten die diverseste Gruppe (Alberts, 2015). Keratinfilamente

werden über Disulfidverbindungen quervernetzt, wodurch sie selbst nach dem Zelltod weiterbestehen können (Alberts, 2015, Jacob et al., 2018). Dies ist besonders wichtig, da Keratin toten Geweben wie der Hornhaut, aber auch Nägeln und Haaren Struktur verleihen (Alberts, 2015).

Eine einzelne Epithelzelle kann mehrere Keratinvarianten exprimieren. Verschiedene Keratinvarianten werden u.A. gewebe- und differenzierungsabhängig exprimiert. In mehrreihigen Epithelien finden sich vor allem Keratin 5 und 14, welches vor allem in den basalen Schichten von mitotisch aktiven Zellen produziert wird (Bragulla and Homberger, 2009). In den oberflächlicheren Schichten hingegen wird zunehmend Keratin 1 und 10 exprimiert (Kirfel et al., 2003), (siehe Abbildung 1).

Es gibt verschiedene Beschreibungen des Aufbaus des Keratinzytoskelett in Hautzellen (Omary, 2009, Jacob et al., 2018). Ein Ansatz vergleicht die Struktur der Keratinfilamente mit dem Aufbau eines Rades. Analog zu den Radspeichen finden sich prominente, kräftige Keratinfilamente, die vom Kern ausgehend zu Desmosomen ziehen und diese an das Zytoskelett anschließen. Zirkumferentiell laufende Filamente verbinden vergleichbar mit der Radfelge Haftkontakte lateral miteinander (Quinlan et al., 2017).

Darüber hinaus sind Keratinfilamente an der Regulation von Signalwegen beteiligt. Zum einen können sie durch z.B. Phosphorylierungen modifiziert werden, zum anderen steuern sie direkt oder indirekt über zwischengeschaltete Signalmoleküle Signalwege (Vielmuth et al., 2018c, Berkowitz et al., 2005, Kroger et al., 2013, Woll et al., 2007). Keratinfilamente regulieren so u.a. die Bindungseigenschaften von Desmogleinen und nehmen damit direkten Einfluss auf desmosomale Adhäsion (Vielmuth et al., 2018b). Zudem sind sie an der PKC-vermittelten Regulation der Dp-Phosphorylierung beteiligt (Kroger et al., 2013).

3.1.5. Desmosomaler Molekülumsatz

Die Desmosomen verankern intrazelluläre Keratinfilamente über mehrere Zellen hinweg und erzeugen ein zellübergreifendes Gerüst. Desmosomen sind dennoch keineswegs statische Strukturen, sondern komplexe, an vielen verschiedenen Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen beteiligte Mechanosensoren (Nekrasova and Green, 2013). Hierzu unterliegen sie einem stetigen Umbauprozess und beeinflussen andere Zellkontakte (Kitajima, 2013, Green et al., 2019). Wichtig sind diese Anpassungen in der Embryogenese und Differenzierung von Geweben, bei Wundheilungsprozessen und der Anpassung an wechselnde Krafteinflüsse und Stressoren (Yin and Green, 2004, Saito et al., 2012).

Grundvoraussetzung für den Aufbau intakter Desmosomen ist die von klassischen Cadherinen vermittelte Adhäsion. Darüber hinaus ist Ca^{2+} ein wichtiger Faktor (Nekrasova and Green, 2013). Zellen, die keine klassischen Cadherine (wie z.B. E-Cadherin) exprimieren, sind nicht in der Lage, Desmosomen auszubilden (Michels et al., 2009). Desmosomen stehen gerade zu Beginn in engem Austausch mit Adhärenz-Junktionen, wobei beide Zellkontakten einander im Aufbau beeinflussen (Green et al., 2019, Kowalczyk and Green, 2013, Spindler and Waschke, 2018). Unser bisheriges Verständnis vom initialen Aufbau eines Desmosoms lässt sich wie folgt zusammenfassen: Anfangs finden sich über Mikrotubuli und Kinesine unabhängig transportiertes Dsg2 und E-Cadherin zu Clustern an der Zellmembran zusammen (Hegazy et al., 2022, Nekrasova and Green, 2013, Shafraz et al., 2018). Im Verlauf werden Dsc-2 und Aktin-abhängig Dp rekrutiert, wodurch größere Cluster entstehen (Hegazy et al., 2022, Waschke and Spindler, 2014). Die Komplexität der desmosomalen Plaque steigt mit dem Einbau jeder weiteren Proteinklasse an. In der Folge werden die bereits an Dp gekoppelten Keratinfilamente angeschlossen (Spindler and Waschke, 2018). Pkps spielen hier eine Schlüsselrolle, da sie die Anbindung an das Zytoskelett organisieren, Pg scheint u.a. die Länge der Plaque zu regulieren. Die gebildeten Strukturen ähneln halben Desmosomen (Nekrasova and Green, 2013).

Haben sich die Desmosomen einmal formiert, unterliegen sie weiterhin stetigen Umbauprozessen, wie FRAP- und elektronmikroskopische Daten zeigen (Windoffer et al., 2002). Die desmosomalen Cadherine stehen im beständigen Austausch mit extra-desmosomalen Pools (Nekrasova and Green, 2013). Basales Dsc3 und Dsg3 geht in den zur Oberfläche migrierenden Zellen zunehmend verloren, während die Dsg1- und Dsc1-Expression zunimmt (Hegazy et al., 2022). So wandeln sich die anfangs kleineren, weniger organisierten Desmosomen im Stratum basale mit der Ausdifferenzierung der Zellen nach suprabasal zu größeren, elektronendichteren und hochstrukturierten um (Green and Simpson, 2007).

3.1.6. An der Regulation von desmosomaler Adhäsion beteiligte Signalwege

Eine Reihe von Signalmechanismen beeinflussen den desmosomalen Molekülumsatz und steuern so die Funktion der Desmosomen. Häufig geschieht dies über posttranslationale Modifikationen desmosomaler Proteine, wodurch die Bindungseigenschaften von Proteinen beeinflusst werden (Hegazy et al., 2022).

Ca²⁺-Signaling, EGFR und die p38MAPK sind wichtige Signalwege in diesem Zusammenhang (Waschke and Spindler, 2014, Yulis et al., 2018, Nekrasova and Green, 2013). In Untersuchungen zu Zellmigration und Wundverschluss konnte der Einfluss von Ca²⁺-Signaling über die Proteinkinase C α (PKC α) auf die desmosomale Haftung, insbesondere Hyperadhäsivität, belegt werden (Garrod and Kimura, 2008, Sajda and Sinha, 2018, Nekrasova and Green, 2013). Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) -Signaling beeinflusst über Tyrosinkinasen zum einen direkt die Zelladhäsionen durch Phosphorylierung von Proteinen der Adhärenskontakte und Desmosomen, zum anderen nimmt es Einfluss auf andere Signalwege (Sajda and Sinha, 2018, Nekrasova and Green, 2013, Egu et al., 2024). In Keratinozyten liegt die p38MAP-Kinase in einem Komplex mit desmosomalen und extradesmosomalen Dsg3 und Pg, sowie Dsg1 vor (Schmitt et al., 2021, Spindler et al., 2013). Sie wird mit Zelldifferenzierung und Apoptose assoziiert und nimmt darüber hinaus eine zentrale Rolle in der Pathogenese vom Pemphigus vulgaris ein (Sajda and Sinha, 2018, Spindler et al., 2013, Berkowitz et al., 2006). Von ihr ist bekannt, dass sie als Teil des MAP-Kinase-Signalwegs u.A. die Keratinfilamentorganisation und somit die zytoskelettale Verankerung der Desmosomen reguliert (Waschke and Spindler, 2014, Berkowitz et al., 2005).

3.2. Regulation der Zelladhäsion durch cAMP

Cyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) kann aus Adenosintriphosphat (ATP) gebildet werden und beeinflusst als intrazelluläres Signalmolekül zahlreiche Stoffwechselprozesse und Signalwege, aber auch die Gentranskription. Externe Stimuli wie Hormone, Wachstumsfaktoren oder Neurotransmitter beeinflussen über G-Proteine die Bildung von cAMP durch Adenylatcyclasen (AC). Es existieren neun Isoformen von membrangebundenen Adenylatcyclasen und eine zytosolische (Taskén and Aandahl, 2004). Phosphodiesterasen (PDE) sind die einzigen Enzyme, welche cAMP in Adenosinmonophosphat (AMP) spalten und so das Signaling inaktivieren (Kopperud et al., 2003). Daneben können Ionenkanäle (cyclic-nucleotide-gated ion channels) Einfluss auf den cAMP-Spiegel nehmen (Houslay and Adams, 2003).

Eine weitere wichtige Eigenschaft von cAMP-Signaling ist, dass die Bereiche in einer Zelle, in welchen cAMP seine Wirkung entfaltet, stark kompartmentalisiert sind (Fischmeister, 2006). Dies wird dadurch erreicht, dass sowohl Effektorenzyme wie die PKA und EPAC (exchange proteins regulated by cAMP), als auch Adenylatcyclasen, Phosphatasen und

Phosphodiesterasen nicht gleichmäßig in der Zelle verteilt vorliegen, sondern über Ankerproteine an bestimmte zelluläre Orte gebunden werden (Houslay and Adams, 2003). Diese finden sich häufig wie auch andere Zellsignalmoleküle in cholesterinreichen Regionen der Zellmembran, auch genannt „membrane rafts“ (Taskén and Aandahl, 2004). Dadurch können regional wirksame cAMP-Spiegel sich vom gesamtytosolischen deutlich unterscheiden (Kopperud et al., 2003, Taskén and Aandahl, 2004, Fischmeister, 2006). Für diese Komplexe aus mehreren Signalproteinen wurde auch der Begriff „Signalosom“ geprägt (Fertig and Baillie, 2018).

Es existieren elf verschiedene PDE-Familien. Phosphodiesterasen der Klasse 4 (PDE4) hydrolysieren ausschließlich cAMP und sind dafür bekannt, in Leukozyten proinflammatorische Wirkung zu besitzen. PDE-Inhibitoren werden daher schon lange bei der Behandlung entzündlicher Erkrankungen eingesetzt (Houslay and Adams, 2003). Vier Gene (A/B/C/D) generieren durch alternatives Splicing über 20 verschiedene Isoformen der PDE4. Sie unterscheiden sich durch ihre N-terminale Region und werden je nach Länge in vier Gruppen eingeteilt (Houslay et al., 2007). Neben einer katalytischen Region verfügen sie über regulatorische Stellen, u.A. steht die Aktivität der PDE4 unter dem Einfluss der Proteinkinase A, Mg^{2+} und ERK-Signalings (Houslay and Adams, 2003). Über Bindungsstellen für Ankerproteine (AKAPs), die ebenfalls durch regulatorische Stellen beeinflusst werden, kann die PDE4 an verschiedene intrazelluläre Kompartimente gebunden werden (Houslay and Adams, 2003, Tasken et al., 2001).

Erhöhte intrazelluläre cAMP-Spiegel beeinflussen wiederum die Kinetik verschiedener Enzyme. Die prominentesten Ziele von cAMP sind die Proteinkinase A (PKA) und EPAC, sowie das cAMP response binding protein (CREB) (Cheng et al., 2008, Gonzalez and Montminy, 1989). Im inaktiven Zustand liegt die PKA als Holoenzym, zusammengesetzt aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten, vor. Unter Einfluss von cAMP können die Untereinheiten dissoziieren und die katalytischen Einheiten dann in ihrer aktiven Form vorliegend Serin- und Threoninreste von Proteinen phosphorylieren (Cheng et al., 2008). Darüber hinaus können die katalytischen Untereinheiten in den Kern translozieren und dort den Transkriptionsfaktor CREB phosphorylieren, wodurch die Gentranskription beeinflusst wird (Kopperud et al., 2003, Gonzalez and Montminy, 1989). Zudem bindet cAMP an die Guaninaustauscher Epac-1 und -2 (exchange protein activated by cAMP), welche im weiteren Verlauf die GTPasen Rap-1 und -2 aktivieren (Schlegel and Waschke, 2014, Bos, 2006).

Von cAMP ist bekannt, dass es in den Endothelien der Blutgefäße die Barrierefunktion verbessert (Schlegel and Waschke, 2014). Darüber hinaus konnte die protektive Funktion von cAMP auf Pemphigus-induzierten Haftungsverlust in der Haut, sowie positive Adhäsotropie am Herzen belegt werden (Spindler et al., 2010, Vielmuth et al., 2023, Yeruva and Waschke, 2023).

3.3. Blasenbildende Autoimmundermatosen

Unter den blasenbildenden Autoimmundermatosen wird eine Gruppe von schweren bis hin zu lebensbedrohlichen organspezifischen Autoimmunkrankheiten zusammengefasst, deren gemeinsames Merkmal eine autoantikörperbedingte Schädigung von Haft- und Strukturproteinen ist (Fritsch, 2009). Es werden je nach Ort der Spaltbildung drei Hauptgruppen unterschieden: Die Pemphigus-Gruppe, vom griechischen Wort πεμφιξ (Pemphix) für Blase abgeleitet, kennzeichnet eine intraepidermale Spaltbildung, auf deren genauere Pathogenese im Folgenden eingegangen werden wird (Schmidt et al., 2000). Davon werden Erkrankungen der Pemphigoid-Gruppe unterschieden, bei welchen es durch eine Autoimmunreaktion gegen Bestandteile der Hemidesmosomen zu einer Spaltbildung an der dermoepithelialen Junktionszone kommt (Schmidt and Zillikens, 2013). Des Weiteren existieren Erkrankungen mit dermolytischer Spaltbildung in der sublaminaären Dermis (Fritsch, 2009, Schmidt et al., 2000, Rassner, 2009).

3.4. Pemphigus

Innerhalb der Pemphiguserkrankungen werden drei Haupttypen unterschieden: Pemphigus vulgaris (PV), Pemphigus foliaceus (PF) und paraneoplastischer Pemphigus (PNP). Die häufigsten assoziierten Tumorerkrankungen bei PNP stammen mit 70-80% aus dem hämato-onkologischen Formenkreis. Auch wenn sich ebenfalls am häufigsten Antikörper gegen Dsg3 finden, ist die Bandbreite der Antigene größer, was das polymorphe klinische Erscheinungsbild erklärt und häufiger zu schwerer Klinik führt (Ohzono et al., 2015). Darüber hinaus werden weitere Pemphigusvarianten wie z.B. Medikamenten-induzierter Pemphigus und eine endemische Form des Pemphigus unterschieden (Kasperkiewicz et al., 2017). Innerhalb des Pemphigus vulgaris wird zwischen Subtypen wie dem durch plazentagängige Antikörper verursachte Pemphigus neonatorum oder dem durch papillomatösen und

verrukösen Vegetationen gekennzeichnete Pemphigus vegetans differenziert (Kneisel and Hertl, 2011a).

3.4.1. Epidemiologie

Die Inzidenz von Pemphigus variiert weltweit deutlich. Während in Europa, den Vereinigten Staaten und Japan Pemphigus vulgaris die häufigste Subgruppe ist und vor allem PatientInnen zwischen 50 und 60 Jahren betrifft, findet sich in Südamerika und Nordafrika häufiger Pemphigus foliaceus, an welchem häufiger jüngere PatientInnen erkranken (Bystryn and Rudolph, 2005, Didona et al., 2022). Dies erklärt man sich durch das Auftreten einer endemischen Variante des Pemphigus foliaceus (Hans-Filho et al., 2018). Dabei werden verschiedene Umweltantigene, vor allem Insektenstiche, und eine genetische Prädisposition als Auslöser einer Autoimmunreaktion diskutiert (Hans-Filho et al., 2018, Di Zenzo et al., 2012).

Sowohl das gehäufte Auftreten von Pemphigusfällen in Familien als auch eine erhöhte Prävalenz von anderen Autoimmunerkrankungen lässt eine genetische Prädisposition vermuten. Genetische Analysen haben ergeben, dass vor allem bestimmte HLA Haplotypen bei PemphiguspatientInnen ein gehäuftes Vorkommen zeigen (Schmidt et al., 2019). Daneben sind weitere nicht-HLA-assoziierte Genloci, wie z.B. Interleukine oder Immunglobuline, Gegenstand aktueller Untersuchungen (Vodo et al., 2018). Insgesamt ist weltweit von einer Pemphigus-Inzidenz zwischen 0,75 und 16 Neuerkrankungen pro einer Millionen Einwohner auszugehen, wobei ca. 70-80% der Fälle auf Pemphigus vulgaris entfallen (Kridin, 2018).

3.4.2. Ätiologie

Die erhöhte Prävalenz bestimmter HLA-Haplotypenvarianten (HLA = human leucocyte antigen, auch MHC = major histocompatibility complex) bei PemphiguspatientInnen kann eine genetische Prädisposition der Erkrankung erklären, während das Vorkommen gesunder Merkmalsträger die multifaktorielle Ätiologie unterstreicht (Yan et al., 2012). Ein aktueller Erklärungsansatz beschreibt die Ätiologie des Pemphigus folgendermaßen: Die Präsentation von Dsg-Peptiden über prädisponierende Varianten von MHC-II-Molekülen mit erhöhter Bindungsaffinität für immunogene Dsg3-Peptide führt durch autoreaktive CD4+ T-Zellen zur Aktivierung autoreaktiver B-Zellen und Antikörperbildung (Pollmann et al., 2018, Eming et al., 2014). Zusätzlich beeinflussen T-Helferzellen und regulatorische T-Zellen die Entstehung autoreaktiver B-Zellen (Veldman et al., 2003, Schmidt et al., 2016).

3.4.1. Klinik

Die antikörperbedingte Akantholyse resultiert bei PemphiguspatientInnen in Hautläsionen und den namensgebenden, intraepidermal gelegenen Blasen (Kneisel and Hertl, 2011a). Während die Blasen bei PV suprabasal auftreten, finden sie sich bei PF weiter oberflächlich gelegen im oberen Stratum spinosum oder granulosum (Kneisel and Hertl, 2011b).

Meistens manifestiert sich Pemphigus vulgaris initial im Bereich der oralen Schleimhäute in ca. 70% der Fälle mit lange persistierenden und schmerzhaften Blasen. Schleimhautläsionen an Nase, Larynx, Pharynx und an den Geschlechtsorganen finden sich seltener (Fritsch, 2009, Pollmann et al., 2018). Aufgrund der vielen Differentialdiagnosen wie z.B. Herpes stomatitis, Aphten und Candida wird die Krankheit im Frühstadium häufig fehldiagnostiziert und nicht adäquat therapiert (Pollmann et al., 2018). Im Verlauf zeigen sich zudem schlaffe und nässende Blasen der Haut am gesamten Integrum, vor allem an mechanisch beanspruchten Stellen sowie intertriginös (Malik et al., 2021). Zwar heilen die Läsionen narbenfrei ab, jedoch ist die Wundheilung unbehandelt erheblich beeinträchtigt (Schmidt et al., 2019). Aufgrund der Instabilität bersten die Blasen frühzeitig, was zu Erosionen und Verkrustung führt. Dadurch kann es sekundär zu lebensbedrohlichen Infektionen und Sepsis kommen (Rassner, 2009). Häufig beschriebene klinische Phänomene sind die Nikolsky-Zeichen: Das direkte oder Nikolsky-Zeichen-I ist Pemphigus-spezifisch und beschreibt eine durch seitliches Verschieben klinisch unauffälliger Haut induzierte Blasenbildung. Die Möglichkeit des lateralen Verschiebens oder einer Vergrößerung bestehender Blasen wird als indirektes oder Nikolsky-II-Zeichen bezeichnet und ist weniger spezifisch (Fritsch, 2009). Im Gegensatz zu Pemphigus vulgaris kommt es bei Pemphigus foliaceus zu keinen Schleimhautläsionen. Generell sind die Läsionen weniger stark ausgeprägt als bei Pemphigus vulgaris und großflächige Läsionen sind seltener (Schmidt et al., 2019, Rassner, 2009).

3.4.2. Diagnostik

Der Verdacht auf eine Pemphiguserkrankung kann in der Regel klinisch und anamnestisch gestellt werden (Kneisel and Hertl, 2011a). Die deutsche Leitlinie empfiehlt neben dem Abfragen von typischen Symptomen, Schmerz- und Medikamentenanamnese, sowie B-Symptomatik aufgrund der stark variierenden Prävalenz das Abklären der ethnischen Zugehörigkeit. In der klinischen Untersuchung können die bereits erwähnten Nikolsky-Zeichen, sowie das charakteristische Verteilungsmuster bei der weiteren Einordnung der

verschiedenen Pemphigusentitäten helfen (Schmidt et al., 2020). Für die Evaluation der Krankheitsaktivität stehen mit dem ABSIS (Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity-Score) und PDAI (Pemphigus Disease Area Index) zwei Scoring-Systeme zur Verfügung, die eine Unterteilung in mild, moderat und schwer ermöglichen (Hebert et al., 2019).

Zur weiteren Diagnostik empfiehlt die Leitlinie drei Methoden zur Basisdiagnostik (Schmidt et al., 2020). In der direkten Immunfluoreszenz von periläsionalem Gewebe können interzelluläre Ablagerungen von IgG und/oder Komplementfaktor C3 in der Epidermis nachgewiesen werden. Dank der histopathologischen Untersuchung läsionalen Gewebes kann die Höhe der Spaltbildung bestimmt werden (Kneisel and Hertl, 2011b). Mittels immunserologischer Methoden können pathogene Antikörper direkt nachgewiesen werden. Dabei können entweder die indirekte Immunfluoreszenz auf Affenösoophagusschnitten oder Dsg3- und Dsg1-exprimierenden Zellen oder verschiedene ELISA-Testsysteme genutzt werden (Kneisel and Hertl, 2011b, Schmidt et al., 2020). Mittlerweile gelten die ELISA-Systeme der Immunfluoreszenz als überlegen und können zudem als Verlaufsparemeter genutzt werden, da gezeigt werden konnte, dass die Höhe der Antikörperspiegel und die Antikörperspezifität meist mit der Klinik korrelieren (Schmidt et al., 2020, Harman et al., 2001).

3.4.3. Therapie und Prognose

Mit Einführung der Glucocortikoidtherapie sank die Einjahresmortalität von Pemphigus von 75% auf 30%. Die Entwicklung der Immunsuppressiva, bessere Behandlung von Komplikationen und ein früherer Behandlungsbeginn führten zu einer weiteren Senkung der Mortalität auf ca. 6% zum Ende der 80er Jahre hin (Bystryn and Steinman, 1996, Kridin et al., 2017a). Die Einführung des CD20-Antikörpers Rituximab hat auch die Pemphigustherapie revolutioniert (Schmidt et al., 2009, Salopek et al., 2002). Anfangs nur bei therapieresistentem Pemphigus genutzt, ist heute neben der Kombination von Kortison und klassischen Immunsuppressiva auch eine First-line-Therapie mit CD20-Antikörpern in Kombination mit einer Kortisonstoßtherapie bei moderatem bis schwerem Pemphigus vulgaris oder foliaceus etabliert (Joly et al., 2017). Zur Therapieeskalation stehen weiterhin Immunapherese und intravenöse Immunglobulintherapie zu Verfügung. Daneben wird eine supportive Therapie bestehend aus stadiengerechter, antiseptischer Wundversorgung und Analgesie empfohlen (Schmidt et al., 2020). Heute liegt die Mortalität von Pemphigus zwischen 1,6% und 12% (Kridin et al., 2017b, Langan et al., 2008, Hsu et al., 2016). Infektionen, vor allem Pneumonien

und Sepsis, gefolgt von kardiovaskulären Erkrankungen und Magenulzera sind die häufigsten Todesursachen unter PatientInnen mit Pemphigus vulgaris (Kridin, 2018).

Die zum Teil drastischen Nebenwirkungen und bis zu 10% therapierefraktäre PatientInnen geben dennoch Anlass zur Entwicklung weiterer Therapien. Ein Angriffspunkt ist die spezifischere Unterdrückung von Teilen des Immunsystems. Da die Gefahr der Hypogammaglobulinämie die Behandlung mittels B-Zell-Depletion oder Immunapharese limitiert, gilt die Entwicklung der Dsg-spezifischen Immunapharese als vielversprechender Behandlungsansatz (Hofrichter et al., 2018). Die Weiterentwicklung der CD20-Antikörper und weiterer immunsuppressiver Medikamente, aber auch neuartige individuelle Therapien, wie z.B. chimären Autoantikörper-Rezeptor-T-Zellen (CAAR-T-Zellen) spezifisch gegen die Autoantikörper-produzierenden B-Zellen, haben das Potential die Pemphigustherapie weiter zu verbessern (Schmidt et al., 2019, Ellebrecht et al., 2016).

Der zweite große, neuartige Angriffspunkt der Pemphigustherapie sind die zahlreichen Signalkaskaden, die durch Antikörperbindung beeinflusst werden (Schmitt and Waschke, 2021, Burmester et al., 2020). Diese sind besonders von Interesse, da sie potenziell Symptome lindern können, bis eine adäquate immunsuppressive Therapie etabliert werden kann.

3.4.4. Pathomechanismus

Die genaue Pathogenese des Pemphigus vulgaris ist bis heute nicht vollständig geklärt. Früh wurden Antikörper gegen Oberflächenproteine von Keratinozyten als zentrale Ursache der Pemphiguserkrankungen beschrieben (Beutner and Jordon, 1964), die später als die desmosomalen Cadherine Dsg1 und Dsg3 identifiziert wurden (Amagai et al., 1991, Stanley et al., 1986). Dabei reicht die Bindung von Fab-Fragmenten dieser Antikörper, um eine Blasenbildung zu induzieren, eine Komplement- oder Immunzellaktivierung ist nicht notwendig (Mascaró et al., 1997). Die meisten Antikörper richten sich gegen die EC1 und -2 Domänen der Dsgs, die für die trans-Bindung der Cadherine wichtig sind. Für monoklonale Antikörper gegen jene Regionen konnte zudem Pathogenität nachgewiesen werden (Amagai et al., 1992). Dsg3-defiziente Mäuse zeigen zudem einen Pemphigus-vulgaris-ähnlichen Phänotyp mit Schleimhautläsionen und Akantholyse (Koch et al., 1997). Es finden sich darüber hinaus jedoch auch pathogene Antikörper gegen andere Domänen der desmosomalen Cadherine (Schmitt et al., 2023, Hudemann et al., 2023).

Die sogenannte Desmogleinkompensationstheorie erklärt die unterschiedliche Lokalisation der Blasen bei den verschiedenen Pemphigusentitäten anhand der produzierten Antikörper

und der Verteilung der Cadherine (Amagai et al., 1999). Sie besagt, dass bei gleichzeitiger Expression Dsg1 und Dsg3 einander kompensieren würden und es so durch Dsg1-Antikörper zu superfiziellen Läsionen der Haut und durch Dsg3-Antikörper zu suprabasalen Läsionen der Schleimhäute komme (Mahoney et al., 1999, Amagai et al., 1999). Jedoch finden sich bei mukokutanem Pemphigus vulgaris lediglich suprabasale Blasen und nicht die gesamte Epidermis durchspannende (Spindler et al., 2007). Außerdem überlappen die Expressionsprofile der Desmogleine in menschlicher Haut mehr als in der von Mäusen (Waschke, 2008, Mahoney et al., 2006). Nicht zuletzt stellt die Diskrepanz von Klinik und ELISA-Ergebnissen die bestehende Theorie zur Pathogenese von Pemphigus infrage. In neueren Metaanalysen stellte sich heraus, dass in zwischen 33% und 46% der Fälle die Serologie nicht mit dem erwartbaren Phänotyp übereinstimmte (Sardana et al., 2013). Daneben finden sich pathogene Autoantikörper gegen extradesmosomale Proteine mit zum Teil ungeklärter Bedeutung für die Pathogenese (Kasperkiewicz et al., 2017, Sinha and Sajda, 2018, Amber et al., 2018). Sie finden sich vor allem bei den selteneren Pemphigusformen und den klinischen Subtypen von Pemphigus vulgaris (Schmidt et al., 2019).

Von der Desmogleinkompensationstheorie leitet sich das Konzept der sterischen Behinderung oder auch direkten Inhibition ab. Da sich die meisten Antikörper gegen die für die trans-Bindung verantwortlichen Epitope EC1 und EC2 der Dsgs richten, erkläre sie die Blasenbildung dadurch, dass die Antikörper die Bindung der Cadherine direkt inhibierten. (Amagai et al., 1992). Für auf diese Regionen selektierte Antikörper aus PatientInnenserum konnte Pathogenität nachgewiesen werden. In der selben Studie fanden sich jedoch auch PatientInnen, die keine Antikörper jene Domänen der Cadherine hatten und dennoch eine deutliche Klinik aufwiesen (Sekiguchi et al., 2001).

Aus AFM-Daten (atomic force microscopy) lässt sich tatsächlich eine Schwächung der homophilen *trans*-Dsg3-Interaktion unter zellfreien Bedingungen sowohl durch Pemphigus vulgaris Antikörper, als auch AK23, einem von Dsg3-defizienten Mäusen nach Immunisierung mit Dsg3 produzierten monoklonalen Antikörper, nachweisen (Heupel et al., 2008, Tsunoda et al., 2003). Einige Autoantikörper können also die Bindung der Desmogleine direkt stören und so u. U. zur Blasenbildung beitragen (Stanley and Amagai, 2006).

Das Auftreten von Pemphigusfällen bei PatientInnen mit Antikörpern gegen andere Domänen als EC1 und EC2, die Schwächung der desmosomalen Bindung ohne direkte Interferenz der

Cadherin-trans-Interaktion im AFM, sowie *in vitro*-Daten, die zeigen konnten, dass sowohl PF-IgG als auch PV-IgG in Präsenz von Dsg1 und Dsg3 Blasen induzieren können, sind wichtige Beispiele für Experimente, die die Desmogleinkompensationstheorie und das Konzept direkter Inhibition infrage stellen (Sekiguchi et al., 2001, Waschke et al., 2005, Spindler et al., 2007).

Antikörperspezifische Internalisierung von Desmogleinen, ultrastrukturelle Veränderungen der Desmosomen und Keratinretraktion sind morphologische Korrelate des Haftungsverlusts der Keratinozyten (Spindler and Waschke, 2018). Verschiedene, zum Teil überlappende Mechanismen werden als Erklärung für diese Schritte herangezogen.

Die extradesmosomalen Desmogleinemoleküle aggregieren schon 30-60 min. nach Bindung von PV-Antikörpern und werden in der Folge endozytiert und lysosomal abgebaut (Sato et al., 2000, Kitajima, 2014, Calkins et al., 2006). Erst nach 24-48 Std. kommt es durch den Abbau desmosomaler Desmogleine zur Schwächung der desmosomalen Bindung, welche für die Entwicklung von Blasen obligat ist (Saito et al., 2012, Calkins et al., 2006, Kitajima, 2014).

Die oben beschriebenen Beobachtungen führten zu einer weiteren wichtigen Hypothese zur Pathogenese des Pemphigus, die den Verlust der Zellhaftung durch verminderten Aufbau von Desmosomen und Depletion desmosomaler Desmogleine („Dissassembly/Nonassembly/Depletion“) erklärt. Antikörper-gebundene Desmogleine und ganze Desmosomenbestandteile werden abgebaut, parallel steht weniger extradesmosomales Dsg3 zum Einbau in Desmosomen zur Verfügung, wodurch es langfristig zur Destabilisierung der Desmosomen kommt (Kitajima, 2014, Aoyama et al., 2010, Otkarina et al., 2011).

Die früheste Veränderung, die sich in Hautproben von PemphiguspatientInnen finden lässt, ist ein Aufweiten der interzellulären Zwischenräume, welches sich schon in H.E.-Färbungen (Otkarina et al., 2011), aber auch elektronenmikroskopisch zeigt (Sokol et al., 2015, van der Wier et al., 2012). Diese ist vor allem in den basalen Zellreihen zu beobachten, tritt auch in nicht-läsionaler Haut auf und fand sich in einer Studie mit Patientenproben nur bei PatientInnen mit Dsg1-AKs (Otkarina et al., 2011). Andere Studien konnten auch nach AK23-Injektion im *ex vivo*-Hautmodell (Egu et al., 2017) oder in Mäusen (Schulze et al., 2012) intrazelluläre Aufweitung feststellen.

Es wird daher angenommen, dass das Aufweiten der Zellzwischenräume Korrelat der Depletion extradesmosomaler Desmogleine ist und noch nicht ausreicht, um eine

Blasenbildung zu induzieren. Erst mit der später beobachteten Reduktion der Desmosomengröße und -anzahl wird die desmosomale Bindung ausreichend geschwächt, um nach AK-Bindung und mechanischer Beanspruchung Blasen zu bilden (van der Wier et al., 2014, Saito et al., 2012).

Entlang der Cadherinbindung gesplattene Desmosomen, sogenannte „Split-Desmosomen“, kommen bei PF und PV im Bereich der Blasen sowohl mit Anschluss an Keratinfilamente als auch ohne vor (Spindler and Waschke, 2018, Egu et al., 2017, Stahley et al., 2016). PV-IgG-Bindung allein verursacht noch keine Aufspaltung der Desmosomen, das Aufspalten von größenreduzierten Desmosomen kann jedoch durch mechanischen Stress erzeugt werden und könnte das Korrelat einer Kombination aus geschwächter Bindung durch direkte Inhibition, verminderter Anzahl und veränderter Desmosomenarchitektur sein (Aoyama et al., 2010, Koch et al., 1997, Stanley and Amagai, 2006, van der Wier et al., 2014, Saito et al., 2012, Sokol et al., 2015).

Ein weiterer Schritt in der Pathogenese sind die häufig als „Keratinretraktion“ beschriebenen Veränderungen des Keratinnetzwerkes mit einer Rarefizierung der Filamente entlang der Zellmembran. Die Keratinfilamente lösen sich von den Desmosomen und liegen konzentriert um den Zellkern herum vor (Waschke, 2008). Diese Retraktion beginnt bereits vor der Internalisierung von Dsg3, was suggeriert, dass die Keratinretraktion ein früher Schritt in der Pathogenese ist (Schlogl et al., 2018). Obwohl keratindefiziente Zellen einen beschleunigten desmosomalen Turnover zeigen (Kroger et al., 2013), scheinen Keratinretraktion und Dsg3-Depletion bei PV unabhängig voneinander abzulaufen (Schlogl et al., 2018). Außerdem scheint die Anbindung des Keratinzytoskelett im Gegensatz zum Aktinskelett direkte Auswirkungen auf die Bindungsstärke der Desmosomen zu haben (Vielmuth et al., 2018c). Bemerkenswerterweise fand sich in Pg-defizienten Zellen keine Keratinretraktion nach PV-IgG-Inkubation mehr (Caldelari et al., 2001).

Durch Modulation einiger Signalwege können in verschiedenen Pemphigus-Modellen einzelne Schritte in der Pathogenese bis hin zur Bildung von Blasen unterdrückt werden (Waschke and Spindler, 2014, Sajda and Sinha, 2018). In umgekehrter Weise führt die Bindung von PV-IgG zur Aktivierung einiger dieser Signalwege (Schmitt and Waschke, 2021). Welche Signalwege dabei zu welchen der oben beschriebenen Veränderungen der Desmosomen und des Zytoskeletts führen ist dabei nicht endgültig erforscht.

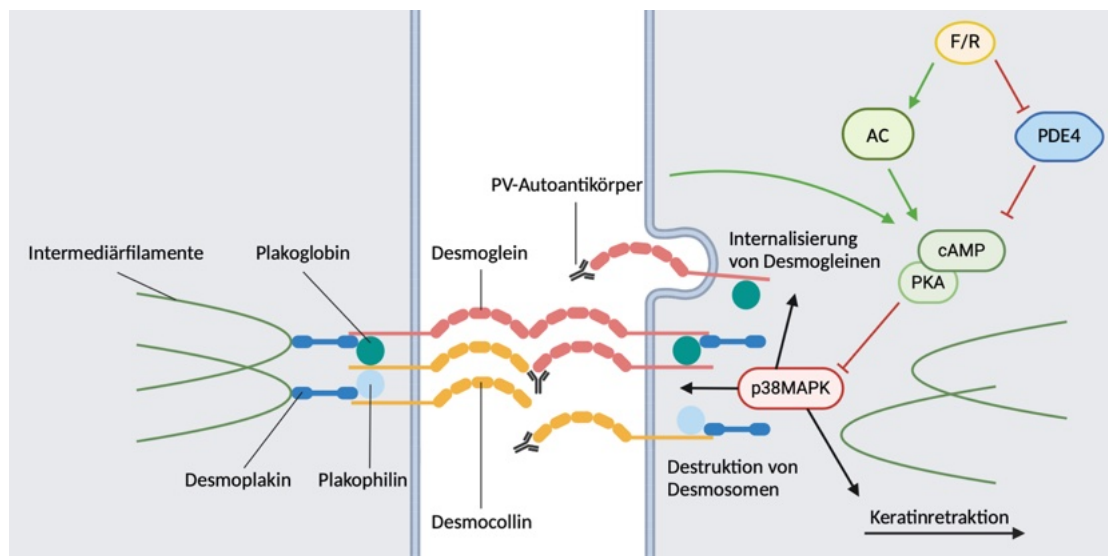


Abbildung 3: Pathomechanismen bei Pemphigus vulgaris.

Modifiziert nach Waschke and Spindler, 2014, mit BioRender.com erstellt.

Einer der am besten beschriebenen Signalwege im Zusammenhang mit PV-IgG-vermittelter Dsg3 Depletion und Keratinretraktion ist der p38MAPK-Weg. Die p38MAPK liegt in einem Komplex mit Dsg3 und Pg, sowie Dsg1 vor (Spindler et al., 2013, Schmitt et al., 2021). Zellen, in denen die Pg-expression mittels siRNA herabreguliert wird, zeigen eine verminderte Zellhaftung und Aktivierung der p38MAPK. Die Reexpression von extranukleärem, nicht jedoch nukleärem Pg hemmte Keratinretraktion, Dsg3-Depletion und die p38MAPK-Aktivität (Spindler et al., 2014). Die Bindung von PV-IgGs oder AK23 führt, genau wie anderweitige Inhibition der Zellhaftung, zu einer Pg-abhängigen Aktivierung der p38MAPK (Berkowitz et al., 2005, Berkowitz et al., 2008, Spindler et al., 2013, Kawasaki et al., 2006, Mao et al., 2011, Spindler et al., 2014). Die Inhibition der p38MAPK hemmt die PV-IgG-induzierte Dsg3-Internalisierung, Keratinretraktion und Aktin-Reorganisation *in vitro* (Berkowitz et al., 2005, Jolly et al., 2010), sowie Blasenbildung im Mausmodell *in vivo* (Berkowitz et al., 2006) und im menschlichem *ex vivo*-Hautmodell (Egu et al., 2017). Eine Aktivierung der p38MAPK mit Anisomycin führt zu einem Pemphigus-ähnlichen Phänotyp mit Zelldissoziation und Keratinretraktion (Spindler et al., 2013, Vielmuth et al., 2018b).

In AFM-Experimenten konnte gezeigt werden, dass PV-IgG zwar die Dsg3-Interaktion direkt hemmt, dies jedoch nicht ausreicht, um einen Zellhaftungsverlust zu bewirken. Vielmehr

konnte durch Inhibition der p38MAPK dem Zellhaftungsverlust entgegengewirkt werden, obwohl weiterhin eine reduzierte Dsg3-Interaktion nachweisbar war (Vielmuth et al., 2015b). Im menschlichen *ex vivo*-Pemphigus-Hautmodell hemmt eine p38MAPK-Inhibition die Keratinretraktion, die Reduktion der Desmosomengröße und -anzahl und das Auftreten von Splitdesmosomen (Egu et al., 2022). Es wird daher angenommen, dass die p38MAPK sekundär als Reaktion auf eintretenden Dsg3-Haftungsverlust aktiviert wird und den Zellhaftungsverlust in Form eines Feedforward-Mechanismus verstärkt (Spindler et al., 2018). Eine klinische Studie mit einem p38MAPK-Inhibitor bei 15 Pemphigus vulgaris PatientInnen musste wegen schwerer Nebenwirkungen abgebrochen werden, jedoch zeigten die Hälfte der PatientInnen zumindest partielles Ansprechen, während die andere Hälfte keine Verbesserung oder gar eine Verschlechterung der Symptome zeigte (Schultz et al., 2011).

Neben der p38MAPK sind auch die Signalwege von EGFR, Src und PKC/Ca²⁺-Signaling an der Pathogenese des Pemphigus beteiligt (Sajda and Sinha, 2018, Schmitt and Waschke, 2021, Egu et al., 2022, Kroger et al., 2013, Walter et al., 2017). Dabei sind einzelne Signalwegsalterationen mit bestimmten Desmoglein-Antikörpern verknüpft. Während anti-Dsg1-AKs vor allem Erk- und Ca²⁺-Signaling beeinflussen, wirken sich anti-Dsg3-AKs auf cAMP-, EGFR- und Src-Signaling aus (Walter et al., 2019, Schmitt and Waschke, 2021). Darüber hinaus finden sich innerhalb dieser Unterschiede Hinweise auf Epitop-spezifische Modulation von Signalwegen (Schmitt et al., 2023).

Im Gegensatz zu Signalwegen, die durch Antikörperbindung aktiviert oder inhibiert werden und pathophysiologisch zu einem Zellhaftungsverlust führen, stellt eine cAMP-Spiegelerhöhung einen zellulären Rettungsmechanismus dar. PV-IgGs verursachen in Keratinozyten eine leichte cAMP-Spiegel-Erhöhung. Die Behandlung mit einem β -Agonisten konnte die Blasenbildung in Mäusen nach Behandlung mit PV-IgG komplett verhindern. In Zellkulturexperimenten zeigte sich, dass eine cAMP-Spiegel-Erhöhung mit einem β -Agonisten oder einer Kombination aus Adenylatzyklaseaktivator Forskolin und Phosphodiesterase-4-Inhibitor Rolipram (F/R) die Zelladhäsion stärkt und die Dsg3-Depletion hemmt. Die Effekte von cAMP sind abhängig von einer Aktivierung der PKA und lassen sich durch eine nach cAMP-Erhöhung auftretende Hemmung der in der Pemphiguspathogenese viel beschriebenen p38MAPK-Aktivierung erklären (Spindler et al., 2010).

Diese Erkenntnisse führten zu der Vorstellung, dass nicht die Desmogleinkompensation, sondern Ebenen- und somit Expressionsspezifische Signalwege für die verschiedenen Höhen

der Spaltbildung bei PV verantwortlich sein könnten (Waschke and Spindler, 2014). Auch wenn die genauen Mechanismen des Zellhaftungsverlustes noch nicht geklärt sind, so scheint doch eine Verbindung zwischen Antikörperbindungen an Desmogleine und signalwegsvermitteltem Zellhaftungsverlust zu bestehen. Passenderweise, wurden für Signalmoleküle Interaktionen mit desmosomalen Strukturproteine nachgewiesen. Besonders extradesmosomale Desmogleine könnten dabei als Umgebungssensoren dienen und outside-in-Signaling bewirken (Spindler et al., 2018).

Zusammenfassend kommt es durch Antikörperbindung bei Pemphigus vulgaris zum einen zur direkten Inhibition der Dsg3 trans-Interaktion. Darüber hinaus werden eine Reihe von Signalkaskaden beeinflusst, die Auswirkungen auf den desmosomalen Auf- und Abbau haben. In der Folge treten eine Schwächung der Zellhaftung, eine Depletion desmosomaler Proteine, ultrastrukturelle Veränderung der Desmosomen und eine Retraktion des Keratinzytoskeletts auf.

4. Fragestellung

Auch wenn Pemphigus heute mittels immunsuppressiver Therapie effektiv behandelt werden kann, so wird die Therapie dennoch von schweren Nebenwirkungen begleitet (Schmidt et al., 2009). Gleichzeitig ist bisher keine Therapieoption zugelassen, die direkt dem Adhäsionsverlust der Keratinozyten entgegenwirkt.

Untersuchungen der letzten Jahre identifizierten cAMP-Signaling als potenzielles Ziel pharmakologischer Therapien bei Pemphigus, die direkt die Keratinozytenhaftung moduliert (Vielmuth et al., 2023). Eine Erhöhung des cAMP-Spiegels durch eine Kombination des Adenylatzyklaseaktivators Forskolin und des Phosphodiesterasehemmers Rolipram wirkt protektiv gegen den durch PV-IgG induzierten Haftungsverlust *in vitro*. Der β -Rezeptoragonist Isoprenalin konnte der PV-IgG-induzierten Blasenbildung *in vivo* hemmen. Der protektive Effekt von cAMP wird dabei durch eine Hemmung der durch die p38MAPK induzierten pathologischen Veränderungen erklärt. Aufgrund schwerer Nebenwirkungen sind die in dieser Studie verwendeten Mediatoren im Menschen jedoch nicht anwendbar (Spindler et al., 2010). 2017 wurde im Herzen ein neuer cAMP-abhängiger Mechanismus mit Auswirkung auf die Zellhaftung entdeckt. Durch eine Phosphorylierung des Plaqueproteins Pg an Serin 665 kommt es zu einer gestärkten Haftung von Dsg2 und Reorganisation der Zellkontakte (Schinner et al., 2017).

Phosphodiesterasehemmer werden seit langem mit großem Erfolg in der Medizin eingesetzt (Houslay et al., 2005). Seit 2014 steht mit Apremilast ein für die Therapie von Psoriasis neuzugelassener PDE4-Hemmer zur Verfügung (Papp et al., 2012). Bisher erklärt man sich die therapeutischen Effekte über eine Erhöhung des cAMP-Spiegels in peripheren mononukleären Zellen des Blutes, wodurch weniger proinflammatorische Mediatoren ausgeschüttet werden. Außerdem reduziert Apremilast die TNF- α -Produktion in natürlichen Killerzellen und Keratinozyten (Papp et al., 2012). Da PDE4 in Keratinozyten exprimiert wird, und eine cAMP-Erhöhung hier protektiv gegen PV-IgG-induzierten Zellhaftungsverlust wirkt, soll in dieser Studie untersucht werden, ob neben den immunmodulatorischen Effekten von Apremilast auch Effekte auftreten, die die Zellhaftung direkt verbessern. Dazu wurde Apremilast in verschiedenen Modellsystemen getestet und die Mechanismen, die zu einer verbesserten Zellhaftung führen, untersucht.

5. Material

5.1. Zelllinien und Bakterienstämme

Bezeichnung	Zellart, Gewebe, Spezies	Herkunft
HaCaT Wildtyp	Keratinocyten, Epidermis, Mensch	(Boukamp et al., 1988)
HaCaT JUP K.O. 4'F8		(Wanuske et al., 2021)
HaCaT JUP K.O. 4'F8 + pDEST-Pg-WT-eGFP		Eigens generiert
HaCaT JUP K.O. 4'F8 + pDEST-Pg-S665A-eGFP		
HaCaT-CK5-YFP		Reinhard Windoffer und Nicole Schwarz, Institut für Molekular- und Zellantomie, RWTH Aachen, (Sawant et al., 2018)
DH5α Competent Cells	Escherichia coli	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts

Plakolgebigen (JUP), Knock out (K.O.), Serin (S), Alanin (A), Green Fluorescent Protein (GFP), Yellow Fluorescent Protein (YFP Wildtyp (WT)

5.2. Konstrukte

Konstrukt	Quelle	Verwendung
pDEST-Pg-WT	(Schinner et al., 2017)	Pg-Rekonstitution in JUP K.O. Zellen
pDEST-Pg-S665A	(Schinner et al., 2017)	Pg-Rekonstitution in JUP K.O. Zellen

5.3. Zellkulturmedien

Name	Zusammensetzung	Verwendung
Einfriermedium	FCS mit 10% DMSO	Lagerung von Zellen
Zellkulturmedium	500 ml DMEM, 15 mg Penicillin, 32,5 mg Streptomycin, 50 ml FKS	Zellkultur HaCaT Wt, Ex vivo Hautschnitte
Zellkulturmedium mit G418	500 ml DMEM, 15 mg Penicillin, 32,5 mg Streptomycin, 50 ml FKS, 290 mg G418	Zellkultur HaCaT CK5-YFP, HaCaT JUP K.O. + pDEST-Pg-Wt und pDEST-Pg-S665A

LB-Medium	20g LB-Medium Pulver auf 1l auffüllen, pH auf 7 einstellen	Bakterienzellkultur
-----------	--	---------------------

5.4. Primärantikörper

Name	Hersteller	Typ und Spezies	Konzentration	
			IF	WB
Anti-CK14	Abcam	Maus	n.v.	1:5000
Anti-Desmocollin 3	LS Bio	Hase	1:100	1:1000
Anti-Desmoglein 1	Abcam	Maus	1:100	n.v.
Anti-Desmoglein 2	Acris	Maus	Ex vivo: 1:100, in vitro 1:50	n.v.
Anti-Desmoglein 3 mouse	Invitrogen	Maus	Ex vivo: 1:100	n.v.
Anti-Desmoglein 3 rabbit	Biozol	Hase	1:100	1:1000
Anti-Desmoplakin	Santa Cruz	Hase	n.v.	1:1000
Anti-E-Cadherin	BD Transduction	Maus		
Anti-GAPDH	Santa Cruz	Maus	n.v.	1:1000
Anti-p-Plakoglobin (S665)	(Yeruva et al., 2020)	Maus	1:10	1:10
Anti-panCK	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri	Maus	1:200	n.v.
Anti-panCK-FITC	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri	Maus, FITC-gekoppelt	1:200	n.v.
Anti-Plakoglobin	Progen	Maus	1:100	1:1000
Anti- α -Tubulin	Abcam	Maus	n.v.	1:1000
Anti- β -Catenin	BD Transduction	Maus	n.v.	1:1000
Alexa Fluor 488 Phalloidin	Molecular Probes\Life technologie		1:600	n.v.

5.5. Sekundärantikörper

Name	Hersteller	Kopplung	Konzentration	
			IF	WB
Ziege-anti-Hase-Fc	Dianova, Hamburg, Deutschland	Cy2	1:600	n.v.
Ziege-anti-Hase-Fc		Cy3	1:600	n.v.
Ziege-anti-Hase-Fc		pox	n.v.	1:10.000
Ziege-anti-Maus-Fc		Cy2	1:600	n.v.
Ziege-anti-Maus-Fc		Cy3	1:600	n.v.

Ziege-anti-Maus-Fc		Pox	n.v.	1:10.000
--------------------	--	-----	------	----------

5.6. Mediatoren

Wirkstoff	Hersteller	Wirkmechanismus	Konzentration
AK23	Medical & Biological Laboratories Co., Ltd. (Nagoya, Japan)	Pathogener anti-Dsg3-Antikörper aus einem Mausmodell	75 µg/ml
Apremilast, Pulver, (CC-100004)	BPS Bioscience, San Diego, Californien	Hemmer der Phosphodiesterase 4	1, 10, 100 µM
Apremilast, Tablette, „Otezla“	Celgene, Summit, New Jersey	Hemmer der Phosphodiesterase 4	1, 10, 100 µM
C-IgG	Aus Serum aufgereinigt	Gepoolte IgG-Fraktionen gesunder Probanden	1:100
DMSO	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri	Lösungsmittel	unverdünnt
Dsg3-Fc	In CHO-Zellen synthetisiert und aufgereinigt	Zur Messspitzen-funktionalisierung	-
Forskolin	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri	Aktivator der Adenylatcyklase	5 µM
Propranolol	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri	β-Rezeptorantagonist	10 µM
PV-IgG	Aus Serum aufgereinigt	IgG-Fraktion eines PV-Patienten	1:100
Rolipram	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri	Hemmer der Phosphodiesterase 4	10 µM

5.7. PV-IgG-Spiegel

Die jeweiligen ELISA-Werte wurden in den Unikliniken Lübeck (Dsg1, Dsg3) und Marburg (Dsc3) bestimmt (Sigmund et al., 2023).

Name	Dsg1 [U/ml]	Dsg3 [U/ml]	Dsc3 [fold of C-IgG]
PV-IgG	760	4711	1,8

Tabelle 1: Titer von Dsg1, Dsg3 und Dsc3 des verwendeten PV-Serums. Modifiziert nach Sigmund et al., 2023.

5.8. Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
------------	------------

Acetal-Polyethylenglykol (PEG)-Linker	BroadPharm, San Diego, Californien
Aceton	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri
Acrylamid	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri
Aluminium-Kaliumsulfat-Dodecahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Aprotinin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
APS	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
BSA	VWR, Radnor, Pennsylvania
Chlorhydrat	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dispase II	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri
DMEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
DMSO	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri
DPX	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri
DTT	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
EGTA	VWR, Radnor, Pennsylvania
Eosin	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri
Ethanol	Bernd Kraft, Duisburg, Deutschland
Ethanolaminhydrichlorid	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri
FCS	Biochrom, Berlin, Deutschland
G418	Merck, Darmstadt, Deutschland
Gefriereinbettmedium	Leica, Wetzlar, Deutschland
Glycerol	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri
Glycin	VWR, Radnor, Pennsylvania
Glucose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
H ₂ O ₂	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri
Hämatoxlin	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri
HBSS	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
HEPES	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri
Kaliumacetat	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri
Kanamycin	VWR, Radnor, Pennsylvania
KCl	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
KH ₂ PO ₄	VWR, Radnor, Pennsylvania
LB-Medium nach Lennox	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Leupeptin	VWR, Radnor, Pennsylvania
Lipofectamin 3000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Luminol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
MES	Biomol, Hamburg, Deutschland
Methanol	Avantor, Radnor, Pennsylvania
MgCl ₂	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Na ₂ HPO ₄	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri
NaCl	VWR, Radnor, Pennsylvania
NaCNBH ₃	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
NaF	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaOH	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcarbonat	appliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumcitrat	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri
Natriumiodat	Alfa Aesar, Haverhill, Massachusetts
NGS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
p-Chumarsäure	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
PBS-Pulver	appliChem, Darmstadt, Deutschland
Penicillin G	appliChem, Darmstadt, Deutschland
Pepstatin A	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
PMSF	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri
Prophylgallat	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri
Proteaseinhibitor: cOmplete ULTRA Tablets, Mini, EASYpack Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Basel, Schweiz
Protein A Agarose	Merck, Darmstadt, Deutschland
ROTI Block	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
RNAse	Invitrogen , Waltham, Massachusetts
SDS	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri
Sodiumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Streptomycinsulfat	appliChem, Darmstadt, Deutschland
TEMED	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Triton X 100	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Trypsin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Tween-20	appliChem, Darmstadt, Deutschland
Xylol	VWR, Radnor, A Pennsylvania
Zitronensäure	AppliChem, Darmstadt

5.9. Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen	Verwendung	Zusammensetzung
2% Paraformaldehyd in PBS	Immunfluoreszenz	20 g Paraformaldehyd in 1000 ml PBS gelöst
Alaunhämatoxylin	HE-Färbung	1 g Hämatoxilin, 200 mg Natriumiodat, 50 g Aluminium-Kaliumsulfat-Dodecahydrat, 50 g

		Chlorhydrat, 1g Zitronensäure in 1000 ml Aqua gelöst
Blotpuffer	WB	15,5 g Tris, 73,2 g Glycerin, 5 g SDS, 1 l Methanol, auf 5 l mit destilliertem Wasser aufgefüllt
BSA/NGS	Immunfluoreszenz	3 g BSA, 1 g NGS in 100 ml PBS-Puffer
Dispase II/Protease from <i>Bacillus polymyxa</i>	Keratinocyten-dissoziationsversuch	100 mg Dispase in 20,8 ml HBSS-Puffer
ECL-Lösung I	WB	5,0 ml 1 mol/l Tris-HCL-Puffer, 500 µl Luminol, 220 µl p-Cumarsäure, auf 50 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt
ECL-Lösung II	WB	5,0 ml 1mol/l Tris-HCL-Puffer, 32 µl H ₂ O ₂ , auf 50 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt
Elektrophoresepuffer	WB	15 g Tris, 72 g Glycerin, 5 g SDS, auf 5l mit destilliertem Wasser aufgefüllt
Eosin	HE-Färbung	1 g Eosin in 1000 ml Aqua dest.
Ethanolamin in DMSO	AFM	4,95 g Ethanolamin in 9 ml DMSO = 5,64 mol/l
HBSS	Keratinocyten-dissoziationsversuch, AFM	9,83 g HBSS-Pulver, 0,35 g Natriumhydrogencarbonat, auf 1 l mit destilliertem Wasser aufgefüllt, steril filtriert
KCM-Puffer 5x	Transformation in prokaryotischen Zellen	0,5 mol/l KCl, 0,15 mol/l CaCl ₂ , 0,25 mol/l MgCl ₂ , steril filtriert
Laemmli-Puffer	WB	3-fach konzentriert, 2,27 g Tris, 6 g SDS, 37,8 g Glycerol, 2 ml Bromphenolblau (10 mg/ml Stocksolution), auf 100 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt, + 0,1 mol/l DTT
LB-Agarplatten	Bakterienanbau	7,5 g Bactoagar auf 500 ml mit LB-Medium aufgefüllt, autoklaviert
L1-Puffer	DNS-Isolation Prokaryoten	50 mM Glucose, 25 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8,0 einstellen
L2-Puffer		0,2 M NaOH, 1% SDS
L3-Puffer		3M Kaliumacetat, 11,5% Eisessig, Aqua dest
NPG	Immunfluoreszenz	1,5 g N-Propylgallat in 38,5 g PBS gelöst, 60 g Glycerol
P/S	Zellkultur	6,05 g Penicillin G, 13 g Streptomycinsulfat, 9,55 g PBS, auf 1 l mit destilliertem Wasser aufgefüllt, steril filtriert
PBS-Puffer	allgemein	5x konzentriert: 400,3 g NaCl, 10 g KCl, 68 g Na ₂ HPO ₄ , 10 g KH ₂ PO ₄ , pH 7,4 mit NaOH, auf 10 l mit destilliertem Wasser aufgefüllt
PBS/EDTA	Zellkultur	47,75 g PBS-Pulver, 50 g EDTA-Pulver auf 5 l mit destilliertem Wasser aufgefüllt, autoklaviert
Polyacrylamidgel 10%	WB	Trenngel, 10% Polyacrylamid (für 4 Gele): 8,1 ml dest. Wasser, 6,7 ml Polyacrylamid 30%, 5,0 ml 1,5 M Tris-Puffer (pH 8,8), 0,2 ml SDS

		10%, 90 µl APS 10% (Initiator), 45 µl TEMED (Katalysator)
Polyacrylamidgel 3,5%	WB	Sammelgel 3,5% Polyacrylamid (für 4 Gele): 6,2 ml dest. Wasser, 1,2 ml Polyacrylamid 30%, 2,5 ml 0,5 M Tris-Puffer (pH 6,8), 0,1 ml SDS 10%, 45 µl APS 10%, 22,5 µl TEMED
Proteaseinhibitorlösung	WB	2x konzentriert: 1 Tablette gelöst in 25 ml destilliertem Wasser
SDS-Lysepuffer	WB	25 mmol/l HEPES, 2 mmol/l EDTA, 25 mmol/l NaF, 1% SDS
Strippingpuffer	WB	25 mmol/l Glycin 1,88 g/1000ml, pH auf 2,2 eingestellt, 1 % SDS 10 g/1000ml
TBS 1x	WB	20 mmol/l Tris-Base 2,42 g, 137 mmol/l NaCl 8g, pH 7,6 mit HCl, auf ein 1 liter mit destilliertem Wasser aufgefüllt
TBS-T	WB	1 ml Tween 20% auf 2l TBS = 0,05% Tween
Tris-HCL-Puffer 0,5 M	WB	30,28 g Tris auf 500 ml destilliertes Wasser, pH = 6,8
Tris-HCL-Puffer 1 M	WB	60,57 g Tris auf 500 ml destilliertes Wasser, pH = 8,5
Tris-HCL-Puffer 1,5 M	WB	90,86 g Tris auf 500 ml destilliertes Wasser, pH = 8,8
Triton-X-100-Lyseuffer	WB	990 µl Triton-X-100-Puffer, 1 µl Aprotinin 1mg/ml, 1 µl Pepstatin 1mg/ml in Methanol, 1 µl Leupeptin 2 mg/ml, 10 µl PMSF
Triton-X-100-Puffer	WB	0,5 ml 0,5% Triton-X-100, 0,98 g 50 mmol/l MES, 0,95 g 25mmol/l EGTA, 0,102 g 5 mmol/l MgCl ₂ ; 100 ml destilliertes Wasser, pH = 6,8
Trypsin/EDTA	Zellkultur	9,55 g PBS, 0,6 g Trypsin, 0,2 g EDTA, auf 1 l destilliertes Wasser aufgefüllt, pH 7,2, steril filtriert

5.10. Geräte, Software, etc.

Gerät/Software	Herrsteller	Funktion
AFM: NanoWizard 3 AFM SPM Controller v4 SPM Data Processing v4.2 Axio Observer D1 10x NA 0,25 Luftobjektiv 63x NA 1,4 Ölobjektiv MLCT Cantilver	JPK Carl Zeiss, Jena, Deutschland Bruker, Tucson, Arizona	Rasterkraftmikroskop AFM Steuerungsprogramm AFM Auswertungsprogramm AFM inverses Mikroskop AFM Objektive AFM Blattfederhalter

Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts	Gesamtproteinkonzentrationsbestimmung
cAMP Enzyme Immunoassay Kit, Direct, CA200	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri	cAMP Immunoassay
Centrifuge 5418R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	Zentrifuge
Centrifuge 5430R		
Leica TCS SP5 63x Öbektiv Leica LASX Version 3.4.1.17822	Leica, Wetzlar, Deutschland	Confokalmikroskop Objektiv Steuerungs- und Auswertungssoftware
EOS 750D (W)	Canon, Ota, Japan	Kamera
Finnpipette™ Novus 100 µl - 1000 µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts	Elektrische Pipette
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc, Boston, Massachusetts	Statistiksoftware und Graphenerstellung
ImageJ	National Institute of Health, Bethesda, Maryland	Quantifizierung und Bilddatenanalyse
infinite 200 pro	Tecan, Männedorf, Schweiz	Extinktionsmessungen
Origin Pro 2016G 64bit	OriginLab, Northampton, Massachusetts	Statistiksoftware
Photoshop 2022	Adobe, San Jose, Californien	Bildbearbeitung und Erstellung der Abbildungen
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Venlo, Niederlande	DNS-Extraktion
Western Blot: Mini Trans-Blot® Cell Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell VWR™ Power Source™ 300V Electrophoresis Power Supply Nitrocellulose/Filter Paper Sandwiches, 0.45 µm, 8.5 x 13.5 cm FLuoCHem E	Biorad, München, Deutschland VWR, Radnor, Pennsylvania Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts	Gelkammern Elektrophoresekommer Western Blot Kammer Nitrozellulosemembran Entwickler

	Proteinsimple, San Jose, California	
ZEISS Axio Vert.A1	Carl Zeiss, Jena, Deutschland	Inverses Mikroskop

6. Methoden

6.1. Zellkultur

Für *in vitro*-Versuche wurde die spontan immortalisierte aneuploide Keratinozytenzelllinie HaCaT verwendet (Boukamp et al., 1988). Für einige Versuche wurden stabil Keratin-5-YFP exprimierende HaCaT-Zellen (Moch et al., 2013), *JUP*-defiziente HaCaT-Zellen (Wanuske et al., 2021) und stabil mit pDEST-Pg-Wt-eGFP oder pDEST-Pg-S665A-eGFP transfizierte *JUP*-defiziente HaCaT-Zellen verwendet. Die HaCaT-Zelllinie entstand aus einer Biopsie aus dem nicht-tumorigenen Randgebiet eines Melanoms und immortalisierte spontan. Die Zellen behalten bei einem leicht veränderten Phänotyp *in vitro* ihre Differenzierungsfähigkeit und wachsen in einem *in vivo* Mausmodell nicht tumorigen und nicht invasiv und bilden eine strukturierte und differenzierte Epidermis (Boukamp et al., 1988).

Die Zellen wurden in ihrem jeweiligen Zellkulturmedium (siehe 5.3) im Inkubator bei 37°C bei befeuchteter Atmosphäre und einem CO₂-Gehalt von 5% gehalten, wobei alle zwei Tage ein Mediumswechsel vollzogen wurde.

Gefrorene Zellen wurden nach kurzem Auftauen in Zellkulturmedium aufgenommen, bei 280 rcf und Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand verworfen, in Zellkulturmedium resuspendiert und auf Kulturgefäße verteilt. Genetisch modifizierte HaCaT-Zelllinien wurden in mit G418 versetztem Zellkulturmedium gehalten, um den Selektionsdruck zur stabilen Expression der verwendeten Konstrukte aufrecht zu erhalten.

Die verschiedenen Zelllinien wurden in T75 Kulturflaschen gehalten und bei Erreichen von 100% Konfluenz passagiert. Dazu, oder um die Zellen für Versuche auszusähen, wurden die Zellen zuerst für 20 min. mit PBS/EDTA vorbehandelt, um ihnen Ca²⁺ zu entziehen und so die Cadherin-Bindungen zu schwächen und im Anschluss für 3 min. mit Trypsin/EDTA bei 37°C im Inkubator inkubiert, um sie vom Flaschenboden abzulösen. Anschließend wurden sie erneut in Zellkulturmedium aufgenommen und entsprechend der gewünschten Konzentration aufgeteilt.

Um Zellen einzufrieren, wurden sie wie oben beschrieben vom Flaschenboden abgelöst, dann in Zellkulturmedium aufgenommen, abzentrifugiert, der Überstand verworfen und dann in Einfriermedium aufgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

6.2. Transformation in prokaryotischen Zellen

Um die in unserer Arbeitsgruppe etablierten Konstrukte pDEST-Pg-WT-eGFP und pDEST-Pg-S665A-eGFP in größeren Mengen zu produzieren, wurden diese in *E. coli* Bakterien transformiert und vervielfältigt. Die DNS-Vektoren beinhalten neben der DNS für menschliches Pg- vom Wildtyp bzw. einer Mutante, bei der Serin 665 durch Alanin ersetzt wurde, wodurch es nicht mehr phosphoryliert werden kann, Resistenzgene gegen Kanamycin für die Selektion in prokaryotischen Zellen und gegen G418 für die in eukaryotischen Zellen. Außerdem wurde C-terminal ein GFP-tag angefügt, um Pg in der Immunfluoreszenz sichtbar zu machen (Schinner et al., 2017).

Es wurden in 2 ml Eppendorfgefäßen 79 µl destilliertes Wasser vorgelegt, 20 µl KCM-Puffer und 1 µl der zu vervielfältigenden DNS dazugegeben. Anschließend wurden 100 µl kompetente *E. coli* Bakterien, die vorher langsam auf Eis aufgetaut wurden, hinzugegeben. Von Kompetenz spricht man in diesem Zusammenhang, wenn Bakterienzellen dazu in der Lage sind fremde, freie DNS aus der Umgebung aufzunehmen. Dieser Ansatz wurde nun 30 min. auf Eis, anschließend 10 min. bei Raumtemperatur und abschließend noch einmal 5 min. auf Eis gemäß Protokoll des Herstellers inkubiert. Nach Zugabe von 900 µl LB-Medium wurden die Zellen unter kräftigem Schütteln für eine Stunde bei 37 °C bebrütet. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugieren bei 6000 rpm (engl. „rotation per minute“, rpm) pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet resuspendiert und auf Agarplatten, die das entsprechende Resistenzantibiotikum enthielten, verteilt. In diesem Fall waren die Platten mit Kanamycin versetzt, wodurch nur Bakterien, die den Vektor inklusive eines Resistenzgens gegen Kanamycin aufgenommen hatten, in der Lage waren auf dem Nährmedium zu überleben und Kolonien zu bilden.

Am nächsten Tag wurde eine Kolonie ausgewählt, mittels einer sterilisierten Öse aufgenommen und in LB-Medium resuspendiert. Dieser Ansatz wurde anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert.

6.3. Plasmid-DNS Isolierung aus Bakterien

Um die Plasmid-DNS aus den Bakterien zu isolieren, wurde die Mini-prep Methode verwendet. Dazu wurden 1,8 ml der Bakterienkultur in ein Eppendorfgefäß gegeben und für 2 min. bei 2.000 rcf zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl L1 Puffer resuspendiert und

10 µg RNase hinzugefügt. Daraufhin wurden erst 200 µl L2 Puffer, dann vorsichtig invertiert und abschließend 150 µl L3 Puffer hinzugefügt, erneut invertiert und der Ansatz fünf min. auf Eis inkubiert. Danach wurde bei 4°C und 19.000 rcf 10 min. zentrifugiert, 350 µl Überstand abgenommen und 700 µl 100% Ethanol vermischt. Dieser Ansatz wurde erneut zentrifugiert, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und abschließend das Pellet getrocknet. Danach wurde es in 30 µl sterilem Aqua dest. aufgenommen und der DNS-Gehalt mittels Extinktionsmessung bestimmt.

6.4. Sequenzierung der Plasmid-DNS

Um den Erfolg der DNS-Vervielfältigung zu evaluieren, wurde die gewonnene Plasmid-DNS durch einen externen Anbieter sequenziert (Eurofins Genomics Europe Shared Services GmbH, Ebersberg, Deutschland). Wie zu erwarten, fand sich in den pDEST-Pg-Wt Konstrukten die Erbinformation für humanes Pg und in den pDEST-Pg-S665A-Konstrukten eine Punktmutation, die zum Einbau von Alanin anstelle von Serin an der Stelle 665 führt.

6.5. Transfektion in eukaryontischen Zellen

Um die Plasmide in eukaryontischen Zellen stabil zu transfizieren, wurde das Verfahren der Lipofektion verwendet. Dabei wird die Nukleinsäure durch Einschluss von Liposomen durch die Zellmembran eingebracht. Hierfür wurde in ein Eppendorfgefäß 25 µl Optimem, 1 µl P3000 und 0,5 µl der zu transfizierenden DNS und in ein anderes Eppendorfgefäß 25 µl Optimem und 1 µl Lipofectamin vorgelegt. Beide Ansätze wurden gründlich gemischt und anschließend vorsichtig miteinander vermischt. Dieser Ansatz wurde für 25 min. bei Raumtemperatur ruhen gelassen, sodass sich um die DNS Mizellen bilden konnten. Anschließend wurde das Gemisch je eine T75 Zellkulturflasche mit ca. 70% konfluenter Zellen gegeben.

Nachdem die Zellen unter Selektionsdruck stehend durch G418 in einer T75-Flasche Konfluenz erreicht hatten, wurden die GFP-tragenden Zellen in der Core Facility für Durchflusszytometrie (FACS Aria III, Becton Dickinson) des LMU-Klinikums durch PD. Dr. Michael Hristov sortiert. Die so erhaltenen Zellen wurden weiterhin unter Selektionsdruck stehend gehalten und nach Bestätigung erfolgreicher stabiler Transfektion für die entsprechenden Versuche verwendet.

6.6. DNS-Isolierung aus eukaryotischen Zellen

Um den Erfolg der Transfektion zu beurteilen, wurde die Plasmid-DNS aus eukaryotischen Zellen isoliert und anschließend mittels Polymerasekettenreaktion (engl.: „polymerase chain reaction“, PCR) analysiert. Für die Isolierung wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit gemäß der Anleitung des Herstellers verwendet. Das Verfahren arbeitet unter DNS-fällenden Pufferbedingungen mit Kieselgelsäulen, die die DNS binden.

6.7. Polymerasekettenreaktion

Durch das Team um Frau Dr. Mariya Radeva wurde aus der gewonnenen DNS mittels Auswahl von Pg flankierende Primern die Pg-Sequenz mittels PCR vervielfältigt und anschließend im Southern Blot analysiert. In drei untersuchten Zelllinien (HaCaT Jup K.O., HaCaT Jup K.O. + pDEST-Pg-WT, HaCaT Jup K.O. + pDEST-Pg-S665A) fanden sich die erwarteten Ergebnisse mit deutlicher Bande der Produkte im Southern Blot aus den transfizierten Zelllinien auf derselben Höhe des als Positivkontrolle verwendeten Ausgangsplasmids, HaCaT Jup K.O. Zellen zeigten wie zu erwarten keine Bande.

Parallel dazu stellte sich in den transfizierten Zelllinien das GFP-markierte Pg im Fluoreszenzmikroskop wie für Pg üblich entlang der Zellmembran und zu geringeren Anteilen zytosolisch dar.

6.8. Aufreinigung von Patienten- und Kontrollantikörpern mittels Affinitätschromatographie

Da die Pathogenese von Pemphigus vulgaris vor allem auf der Wirkung von Autoantikörpern beruht, ist es von Interesse diese aus Patientenserum aufzureinigen, um sie von anderen Blutbestandteilen zu trennen. Die verwendeten PV-Immunglobuline (PV-IgG) wurden aus dem Serum eines an Pemphigus vulgaris erkrankten Patienten aus der dermatologischen Klinik Lübeck (Prof. Dr. Dr. Enno Schmidt), bei dem die Erkrankung klinisch, serologisch und histologisch nachgewiesen wurde, aufgereinigt. Klinisch zeigte sich beim Patienten ein muköser Phänotyp. Für die Gewinnung von Kontroll-IgGs (C-IgG) wurde Serum von gesunden Spendern verwendet. Nach der schriftlichen Einverständniserklärung zur wissenschaftlichen Verwendung der Blutproben wurden diese zentrifugiert und das gewonnene Serum weiter verarbeitet.

Die Aufreinigung erfolgte mithilfe von Protein-A-Agarose. Protein A ist ein in Bakterien vorkommendes Protein, dass spezifisch das Fc-Fragment von IgG-Antikörpern bindet. Um die Seren aufzureinigen, wurde in eine 5 ml Säule eine Fritte gelegt und darauf 500 µl Protein-A-Agarose gegeben. Die Säule wurde mit 20 ml PBS gespült und im Anschluss 2 ml Serum dazugegeben. Die nach oben und unten abgedichtete Säule wurde dann für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einen Rotor fixiert, damit die Antikörper an Protein A binden können. Danach wurde die Säule erneut mit 20 ml PBS gespült und anschließend die Antikörper durch Zugabe von 3 ml 20 mmol/l Natriumcitratlösung (pH = 2,4) eluiert und das Eluat in 60 µl 2 mol/l Natriumcarbonatlösung aufgefangen. Anschließend wurde das Eluat in ein Zentrifugen-Filtereinheit mit 30 kDa Porengröße gegeben und bei 19.000 rcf 20 min. zentrifugiert. Die verbliebenen Antikörper wurden in 500 µl PBS aufgenommen, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

6.9. *Ex vivo*-Pemphigus-Hautmodell

Für die *ex vivo* Versuche wurden Hautbiopsien von Körperspendern, die ihren Körper nach schriftlicher und informierter Einwilligung nach ihrem Tod der anatomischen Lehre und Wissenschaft an der anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilian-Universität München zur Verfügung gestellt haben und keine Anamnese von Hauterkrankungen hatten, verwendet. Die Ethikkommission der LMU München bestätigte, dass keine weitere Genehmigung für das Versuchsprotokoll notwendig ist.

Körperspendern, die uns maximal 24 Stunden post mortem erreichten, wurde nach vorangegangener Desinfektion mit 80% Ethanol ein ca. 5 x 8 cm großes Stück Haut aus der Regio deltoidea entnommen. Das Hautpräparat wurde von Fett und überschüssigem Bindegewebe gereinigt und anschließend in Betaisodona-Lösung desinfiziert und in PBS gewaschen und dann in Zellkulturmedium gelagert.

Nachfolgend wurde das Hautpräparat in ca. 2 x 2 cm große Stück geteilt und die einzelnen Stücke in einer mit 3 ml Zellkulturmedium befüllte 6-Lochplatte verteilt. Mit einer 30,5 G Nadel wurden zunächst 50 µl Apremilastlösung oder DMSO und eine Stunde später zusätzlich 50 µl Kontroll-IgGs oder Pemphigus-IgGs intradermal gespritzt. So wurden die Präparate nun für 24 Stunden im Medium im Inkubator bei 37°C und befeuchteter Atmosphäre mit einem CO₂-gehalt von 5% inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Stücke aus der Lochplatte genommen. Mithilfe eines Radiergummikopfes wurde auf alle Konditionen ein gleichförmiger

Scherstress ausgeübt, um die mechanische Belastung der Haut zu simulieren und im Sinne des Nikolskyzeichens Blasenbildung zu induzieren. Anschließend wurden die Proben in zwei Hälften geteilt. Je eine Hälfte pro Kondition wurde in Gefriereinbettmedium bei -20°C für die weitere Verarbeitung zu Kryoschnitten für Immun- und Hämatoxylin-Eosin-Färbung eingebettet und die andere Hälfte in 4%-Glutaraldehyd bei 4°C für elektronmikroskopische Analyse gelagert. Diese wurden anschließend von Herrn Desalegn Egu für die elektronenmikroskopische Analyse weiterverarbeitet (Egu et al., 2019).

Die in Kryoeinbettmedium gelagerten Hautbiopsien wurden von Frau Andrea Wehmeyer mit dem Gefriermikrotom in 7 µm dicke Scheiben geschnitten, auf Objektträger aufgezogen und anschließend bei -20°C gelagert.

6.10. Keratinozytendissoziationsversuche

Um die mechanische Zellhaftung in einer Einzelzellschicht zu testen und damit indirekt auf die Haftung der Desmosomen zurückschließen zu können, wurden Keratinozytendissoziationsversuche durchgeführt. Das Verfahren ist in der Pemphigusforschung etabliert (Ishii et al., 2005). HaCat-Zellen wurden in Kulturmedium in 24-Lochplatten zur Konfluenz herangezüchtet und den Versuchsbedingungen entsprechend inkubiert. Nach Abnahme des Mediums und Waschen mit HBSS wurden die Zellen mit 200 µl Dispase II bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellmonolayer im Ganzen vom Boden der Lochplatte ablösten. Dispase II ist eine Protease, die Fibronectin und Kollagen Typ IV spaltet ohne die Zellmembran selber zu beschädigen (Stenn et al., 1989). Anschließend wurde die Dispase abgenommen und gegen 450 µl HBSS (engl.: „Hanks' Balanced/Buffered Salt Solution, HBSS) ausgetauscht. Nun wurden die Monolayer einem definierten mechanischem Stress ausgesetzt. Dazu wurde eine elektrische 1 ml Pipette verwendet, die mit konstanter Geschwindigkeit den Monolayer mit enthaltenem HBSS durch den 1 ml Pipettenaufsatz auf- und abpipettiert. Anschließend wurden die Zellfragmente händisch unter einem Auflichtmikroskop oder nach Fotodokumentation per automatischer Auswertung mittels ImageJ (siehe dazu Auswertung) ausgezählt und die Konditionen untereinander verglichen. Die Anzahl der Fragmente korreliert hierbei negativ mit der Stärke der Zellhaftung.

6.11. Proteinbiochemische Methoden

Um den Proteingehalt des untersuchten Zellmaterials zu vergleichen, wurden Gelelektrophorese, Western Blot und immunologischen Methoden verwendet.

Die untersuchten Zellen wurden in Lochplatten bis zur Konfluenz herangezüchtet, das Medium abgenommen und einmalig mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen im jeweiligen Lyse Puffer lysiert. SDS-Lysate wurden verwendet um den gesamten Zellinhalt in einem zu lysieren, während Tritonlysate verwendet wurden, um nicht-zytoskelettal-gebundene (Triton-Fraktion) von zytoskelettal-gebunden Proteinen (SDS-Fraktion) zu separieren. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

6.11.1. Proteinextraktion im SDS-Lysepuffer

Für die Herstellung von SDS-Lysaten wurden die Proben in SDS-Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren lysiert. SDS ist ein denaturierendes Tensid, das nicht kovalente Bindungen von Proteinen löst und so deren Tertiär- und Quartärstruktur auflöst, während die Proteaseinhibitoren proteolytische Spaltungen verhindern. Anschließend wurde das Lysat mit der Pipettenspitze aufgenommen, in eine Eppendorfgefäß überführt und sonifiziert, um die Zellmembran zu zerstören. Dabei wurden die Proben stets auf Eis gekühlt gelagert.

6.11.2. Triton-X-100-vermittelte Proteinextraktion

Für Triton Lysate wurden die Zellen nach dem Waschen mit kaltem PBS zunächst in 100 µl Triton X-100-Lysepuffer für 20 min. auf Eis inkubiert und dann mit dem Zellschaber vom Plattenboden abgekratzt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Triton-X-100 ist ein schwach denaturierendes Tensid, das die Oberflächenspannung herabsetzt und so frei lösliche und frei in der Membran befindliche Proteine von zytoskelettal Gebundenen trennt. Die im Puffer enthaltenen Proteaseinhibitoren hindern freigesetzte Proteasen zusätzlich zur Temperaturminderung daran Proteine zu zersetzen. Nun wurden die Proben bei 19.000 rcf bei 4°C zentrifugiert, um die lösliche von den zytoskelettal-gebundenen Fraktion zu separieren. Anschließend wurde der lösliche Überstand abgenommen und in separate Eppendorfgefäße überführt. Das Pellet wurde erneut mit Triton-X-100-Lyse-Puffer gewaschen und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt und Abnahme des Überstandes in SDS-Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren lysiert und sonifiziert.

6.11.3. Gesamtproteinkonzentrationsbestimmung

Im Folgenden wurde der Gesamtproteingehalt mittels photometrischer Messung bestimmt. Dafür wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit nach Protokoll des Herstellers verwendet. In einer 96-Lochplatte wurden die Proben im Verhältnis 1:5 im jeweiligen Puffer verdünnt und dieses Gemisch dann im Verhältnis 1:8 mit dem BCA-Reagenz (Reagenz A:B = 50:1) vermischt. Eine Standardreihe im jeweiligen Lysepuffer wurde ebenfalls mitaufgetragen. Das Prinzip des Testes ist es, eine durch Bindung und Reduktion von Kupfer-Ionen an Peptidbindungen ausgelöste Farbreaktion zu detektieren. Nach einer halben Stunden Inkubation bei 37°C und anschließendem Abkühlen bei Raumtemperatur wurde der Proteingehalt der Proben mittels Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 562 nm auf dem Mikroplattenleser Infinite 200 Pro anhand der Standardkurve bestimmt.

6.11.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um die Proteine der Größe nach in Gelelektrophorese aufzutrennen wurde das SDS-PAGE verfahren verwendet (Laemmli, 1970). Dafür wurde das Probenmaterial zunächst Laemmli-Puffer versetzt. Nach dem Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen durch thermische Denaturierung (95°C, 5 min.) dient das enthaltene SDS neben seiner ebenfalls denaturierenden Wirkung dazu, die Eigenladung der Proteine zu überdecken und sie konstant negativ zu laden. Zusammen mit der Denaturierung der Proteine führt dies durch elektrische Abstoßung zur Linearisierung der Proteine, was eine Auftrennung nach Kettenlänge erlaubt. Zusätzlich werden Disulfidbrückenbindungen durch das zugefügte DTT mittels Reduktion gespalten. Der beigefügte niedermolekulare, anionische Farbstoff Bromphenolblau macht bei der späteren Gelelektrophorese die Laufmittelfront sichtbar.

Als Matrix für die Gelelektrophorese dienten Polyacrylamidgele, bei denen zwischen einem 3,5%-Sammelgel- und einem 10%-Trenngelanteil unterschieden wird. Die Gele entstehen durch Polymerisation von Acrylamid, wobei TEMED als Katalysator und APS als Initiator der Reaktion fungieren.

Der obere Teil des Gels besteht aus dem Sammelgel, in das Taschen für die Proben eingelassen sind. Der untere Teil besteht aus dem Trenngel, in dem sich die Proteine der Größe nach auftrennen. Die Gele wurden senkrecht in Gelelektrophoresekammern eingespannt und die Kammer mit Elektrophoresepuffer befüllt. Nachdem die mit Laemmli-Puffer versetzten Proben zu gleichen Gesamtproteinmengen in die Geltaschen eingefüllt wurden, wurde eine

elektrische Spannung von 80 V für die Sammelphase und 120 V für die Trennphase angelegt, bis die Lauffront das positiv geladene Ende der Gele erreicht hat. Außerdem wurde ein parallellaufender Größenstandard (engl.: „PageRuler Prestained Protein Ladder“) aufgetragen.

6.11.5. Western Blot-Analyse

Der Western Blot wird verwendet, um die Proteine aus dem Gel auf eine Trägermembran zu übertragen (Renart et al., 1979, Towbin et al., 1979). Dafür werden die Gele aus den Glaskammern genommen, das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel zusammen mit einer Nitrocellulosemembran im Mini Trans-Blot-System von Biorad eingespannt. Es handelt sich um ein Wet-Blot-Verfahren. In der mit Blotpuffer befüllten Kammer werden nun die negativ geladenen Proteine bei einem konstanten Stromfluss von 350 mA für 1,5 Stunden in einem senkrecht zur Membran verlaufendem elektrischen Feld vom Gel auf die Nitrocellulosemembran übertragen.

6.11.6. Färbung und Aufnahme

Um unspezifische Bindungsstellen für Proteine auf der Membran abzusättigen, wurde die Nitrocellulosemembran direkt im Anschluss für 30 min. in 1:10 mit Aqua dest. verdünntem Blockierungsreagenz ROTI-Block inkubiert. Anschließend wurde die Membran für 5 min. in TBS-T gewaschen und in entsprechender Verdünnung in 5% BSA in TBS-T mit dem Primärantikörper bei 4°C über Nacht auf dem Rüttler inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen und anschließend für 2 Std. in entsprechender Konzentration mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde die peroxidaseinduzierte Reaktion mit der verstärkten Chemilumineszenz-Methode (engl.: „Enhanced chemiluminescence“; ECL) anhand des Entwicklers ausgewertet. Dazu wurden die ECL-Lösungen I und II im Verhältnis 1:1 gemischt und die Membran darin für eine min. inkubiert. Dabei wird das enthaltene Luminol von der Meerrettichperoxidase umgesetzt, sodass seine Lumineszenz aufgenommen werden kann.

Um Antigen-gebundene Antikörper nach dem Entwickeln zu entfernen und die Membran erneut inkubieren zu können, wurde das Strippingverfahren verwendet. Dazu wurde die Membran bei 69°C für 20 min. im Strippingpuffer inkubiert, anschließend mit TBS-T gewaschen und kann dann wieder mit Erstantikörper inkubiert werden.

6.11.7. Enzyme Immunoassay Kit

Für die Messung der intrazellulären cAMP-Spiegel wurde das cAMP Enzyme Immunoassay (EIA) Kit gemäß der Gebrauchsanleitung verwendet, alle genannten Chemikalien sind im Kit enthalten. Bei dem Kit handelt es sich um einen kompetitiven Immunoassay, was bedeutet, dass neben dem eigentlich gesuchten Antigen ein zweites vom Antikörper detektiertes, enzymgekoppeltes Antigen mit inkubiert wird und so um die Bindungsstellen mit dem eigentlichen Antigen konkurriert. Das gekoppelte Enzym katalysiert nach Zugabe seines Substrats eine Farbreaktion, die mittels Extinktionsmessung erfasst werden kann und sich umgekehrt proportional zur Konzentration des gesuchten Antigens verhält.

Zellen wurden in 12-Lochplatten ausgesät und einen Tag nach Erreichen von Konfluenz inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen und die Zellen für 20 min. mit 160 µl 0,1 M HCl auf Eis lysiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Plattenboden abgekratzt und in Eppendorfgefäße überführt. Diese wurden nun für 5 min. bei 600 g bei Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend 100 µl des Überstandes für den Test verwendet. In die vom Hersteller mit Ziege-Anti-Hase-Antikörper vorinkubierten 96-Loch-Zellkulturplatten wurden 50 µl Neutralisationsreagenz, 100 µl Standardlösung oder Probe, 50 µl Lösung mit cAMP-konjugierter alkalischer Phosphatase und 50 µl Lösung mit einem polyklonalem Antikörper (Hase) gegen cAMP oder cAMP-gebundene alkalische Phosphatase gegeben. Außerdem wurden je eine Vertiefung (engl.: „Well“) für nicht spezifische Bindungen (NSB, 150 µl HCl anstelle der Proben und des Antikörperreagenz) und die maximale Aktivität (100 µl HCl anstelle der Proben) pipettiert. Dieser Ansatz wurde nun abgedeckt und für 2 Std. auf einem Rüttler mit 500 rpm inkubiert.

Anschließend wurden die Wells geleert und dreimal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen, bevor 200 µl des Färbereagenz p-Nitrophenylphosphat zugeben wurden. Nach einer Std. Inkubation wurden 50 µl Stopp-Lösung hinzugegeben und die Wells umgehend bei einer Wellenlänge von 405 nm für die Farbreaktion und 580 nm als Korrekturwert ausgelesen. Pro Kit wurde eine Standardreihe gemäß der Anleitung pipettiert und in Doppelbestimmung mit ausgelesen.

Die Daten wurden mit folgender Formel ausgewertet:

$$\frac{\text{Ext. 405 nm} - \text{Ext. 580 nm} - \text{NSB}}{\text{max. Aktivität}} = \text{prozentuale Anteil an max. Aktivität}$$

Für Werte zwischen 0 und 1 lässt sich nun Anhand der Standardkurve die cAMP-Konzentration bestimmen. Für die Auswertung der Extinktionsmessung wurde Origin Pro 2016 verwendet. Aus den Werten der Standardkurve wurde eine Gerade erstellt, anhand derer die gemessene cAMP-Konzentration bestimmt wurde.

6.12. Indirekte Immunfluoreszenz

Um verschiedene Gewebe mikroskopisch betrachten zu können, wurde Immunfluoreszenzmikroskopie verwendet. Die Technik nutzt dabei fluorophorgekoppelte Antikörper, die entweder direkt als Primärantikörper oder indirekt über einen Zwischenschritt als Zweitantikörper Antigene markieren. Außerdem wurde fluorophorgekoppeltes Phalloidin, welches an filamentöses Aktin bindet, verwendet. Fluorophore sind Stoffe, die nach Anregung mittels eines Lasers innerhalb ihres Anregungsspektrums, für kurze Zeit Licht innerhalb ihres Emissionsspektrums abstrahlen. Diese Lichtstrahlung kann mittels eines Mikroskops sichtbar gemacht werden.

Dazu wurden Zellen auf Deckgläschen in 24-Loch-Zellkulturplatten ausgesät, bei Konfluenz gemäß den Versuchsbedingungen inkubiert und anschließend fixiert. Es kamen zwei verschiedene Fixierungsmethoden zum Einsatz.

Entweder wurden die Zellen einmalig 5 min. mit PBS gewaschen, im Anschluss mit 500 µl 2%-Paraformaldehyd in PBS für 10 min. bei Raumtemperatur fixiert, danach erneut dreimal mit PBS gewaschen und dann mit 200 µl 0,1% Triton 100 in PBS für 5 min. permeabilisiert.

Alternativ, für die Färbung der Keratinfilamente, wurden die Zellen einmalig für 5 min. mit kaltem PBS gewaschen, dann mit 1 ml -20 °C kaltem 100%-Ethanol und anschließend mit 500 µl -20 °C kaltem Aceton auf Eis fixiert.

Nach beiden Verfahren wurden die Proben im Folgenden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend die Deckgläschen aus den Zellkulturplatten genommen, auf Objektträger gegeben und für 30 min. mit 30 µl BSA/NGS geblockt, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Danach wurde BSA/NGS abgenommen und die Proben mit 30 µl Primärantikörper in PBS in befeuchteter Umgebung bei Dunkelheit bei 4°C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Objektträger nach dreimaligem Waschen mit PBS mit 30 µl Sekundärantikörper in PBS für 2 Stunden in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Der Zweitantikörper richtet sich gegen das speziesspezifische Fc-Fragment des Primärantiköpers.

Gegebenenfalls wurde Alexa Fluor 488 Phalloidin zusammen mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurde für 10 min. 10 µl DAPI, ein Fluoreszenzfarbstoff, der DNS anfärbt, zum Sekundärantikörper hinzugegeben. Abschließend wurden die Proben erneut dreimal mit PBS gewaschen, kurz in destilliertem Wasser gespült, um Salzreste zu entfernen und dann in einem Tropfen NPG mit der Zellseite nach unten eingedeckt. Die Proben wurden bei 4°C gelagert.

Um Kryoschnitte zu färben wurde ein leicht abgewandeltes Verfahren verwendet. Die Kryoschnitte wurden auf dem Objektträger bei 37°C für 30 min. und anschließend für weitere 30 min. bei 60°C eingebrannt. Anschließend wurden sie kurz in Aqua dest. getaucht und dann für 10 min. in 2% Paraformaldehyd in PBS fixiert und nach dem Waschen für 1-2h in 1% Triton 100 in PBS in einer Küvette permeabilisiert. Abweichend vom Prozedere für Deckgläschen wurden für die Schnitte jeweils 60 µl BSA/NGS und Antikörperlösung, sowie 20 µl DAPI und 5 µl NPG verwendet.

6.13. Hämatoxilin-Eosin-Färbung

Ausgewählte Kryoschnitte wurden für 30 min. bei 60°C eingebrannt und anschließend für 20 min. in 2%-Paraformaldehyd in PBS fixiert. Anschließend wurden die Schnitte in destilliertem Wasser gewaschen und dann für 15 min. in Alaunhämatoxylin, einem basischen Farbstoff, der saure Zellbestandteil anfärbt, inkubiert. Danach wurde die restliche Farbe unter laufendem Leitungswasser ausgewaschen, wobei die pH-Wert Erhöhung durch das neutrale Wasser für die Umwandlung von einer rötlich-braunen in die charakteristische blaue Färbung sorgt. Anschließend werden die Objektträger für ca. 3 min. in Eosin, einem sauren Farbstoff, der die basischen Zellbestandteile färbt, inkubiert. Nachdem die Proben erneut in destilliertem Wasser gewaschen wurden, wurden sie für je 1 min. in eine aufsteigende Alkoholreihe (70%-Ethanol, 80%-Ethanol, 90%-Ethanol) und abschließend für zweimal 10 min. in 100%-Ethanol gegeben. Der Alkohol dient dazu, verbliebenes Wasser schrittweise aus den Proben zu verdrängen. Die Proben wurden nun in Xylol, einem organischen Lösungsmittel, für zweimal 5 min. geklärt, bevor sie in DPX eingedeckt wurden. Die Proben wurden bei Raumtemperatur gelagert.

6.14. Rasterkraftmikroskopie

Um die Häufigkeit und Lokalisation von Adhäsionsmolekülen sowie die Stärke von Einzelmolekülbindungen auf Zellen und deren Topografie untersuchen zu können, wurde Rasterkraftmikroskopie (engl.: „Atomic force microscopy“, AFM) und dabei Kraftspektroskopie-Messungen verwendet. Dabei handelt es sich um ein nicht-optisches Mikroskop (Binnig et al., 1986, Vielmuth et al., 2018a).

Eine von Piezoelementen gesteuerte, an einer Blattfeder befestigte Nadel tastet eine Probe in einem definierten Raster ab. Kommt es zur Verbiegung der Blattfeder, wird diese mittels eines auf die Rückseite der Feder gerichteten Lasers und eines Photodetektors in Form von elektrischen Spannungsunterschieden registriert und in zwei Ebenen gemessen. Ist die Federkonstante bekannt, so kann dank des Hookeschen Gesetzes

$$F = D \times \Delta l$$

anhand der Auslenkung der Feder (Δl) und der bestimmten Federkonstante (D) die resultierende Kraft berechnet werden.

Das Mikroskop kann auf verschiedene Arten betrieben werden. Der QI-Modus („Quantitative Imaging“) wurde für die Aufnahme von Übersichtsbildern verwendet. Um Kraftmessungen durchzuführen wurde der FM-Modus („Force Mapping“) genutzt. Hierbei steht die Messspitze in direktem Kontakt mit dem untersuchten Material. Zunächst muss am Gerät der jeweilige Messfederhalter kalibriert werden. Dafür wird durch eine Kontaktmessung auf einer Glasplatte die Sensitivität ($\Delta U/\Delta s$) des Photodetektors gegenüber der Beugung der Feder gemessen. Im Anschluss wird mittels „thermal noise“ Methode die Federkonstante (D) bestimmt. Dadurch kann die gemessene elektrische Spannungsdifferenz am Photodetektor in die auf die Feder ausgeübte Kraft umgerechnet werden (Hutter and Bechhoefer, 1993).

Ein Messzyklus lässt sich wie folgt beschreiben. Ein Piezoelement steuert die Nadel in der Horizontalebene an einen definierten Punkt. Beginnend von einer definierten Höhe (engl.: „Z-length“) wird die Nadel mit Hilfe eines weiteren Piezoelements in einer definierten Geschwindigkeit (engl.: „extend speed“) auf die Probe zubewegt. Kommt nun die Nadel mit der Oberfläche der Probe in Kontakt (engl.: „contact point“), so wird die Blattfeder nach oben ausgelenkt, der Laser abgelenkt, und der Photodetektor registriert die Verschiebung durch eine gemessene Spannungsdifferenz. Die Nadel wird so lange weiter auf die Oberfläche

gedrückt, bis eine definierte Kraft (engl.: „setpoint“) erreicht wird. Die Nadel bleibt nun für eine definierte Zeitspanne (engl.: „extended delay“) an dieser Position und wird anschließend mit definierter Geschwindigkeit (engl.: „retract speed“) zur Ausgangsposition (engl.: „Z-length“) zurückgefahren. Tritt jedoch eine Bindung zwischen Adhäsionsprotein der Probe und einem an der Spitze immobilisiertem Adhäsionsprotein auf, so wird die Blattfeder beim Zurückziehen in umgekehrter Richtung ausgelenkt, bis die zurückführende Kraft die Kraft der Bindung übersteigt und sie an einem bestimmten Punkt (Engl.: „step position“) zum Reißen bringt (engl.: „unbinding force“). Dadurch wird die Feder ruckartig in ihre Ruheposition zurückbewegt. Zu diesem Zwecke können die Nadelspitzen durch Bindung verschiedener Molekülgruppen funktionalisiert werden und so Rückschlüsse auf die Wechselwirkungen zwischen dem untersuchten Material und der funktionellen Gruppe geschlossen werden. Hat die Nadel die Ausgangsposition wieder erreicht, so wird sie in der Horizontalebene gemäß dem Raster an den nächsten Messpunkt bewegt.

Nun lässt sich an jedem Messpunkt die gemessene Kraft dem korrespondierenden Abstand der Nadel vom Ausgangspunkt zuordnen und so in einem Kraft-Abstands-Diagramm Kraftabstandskurven ermitteln. Aus den Informationen der „Contact points“ und der jeweiligen horizontalen Position der Nadel lassen sich topographische Abbilder des Materials erstellen, während sich auftretende Bindungsereignisse hinsichtlich ihrer „unbinding force“, „step position“, Lokalisation und Häufigkeit untersuchen lassen.

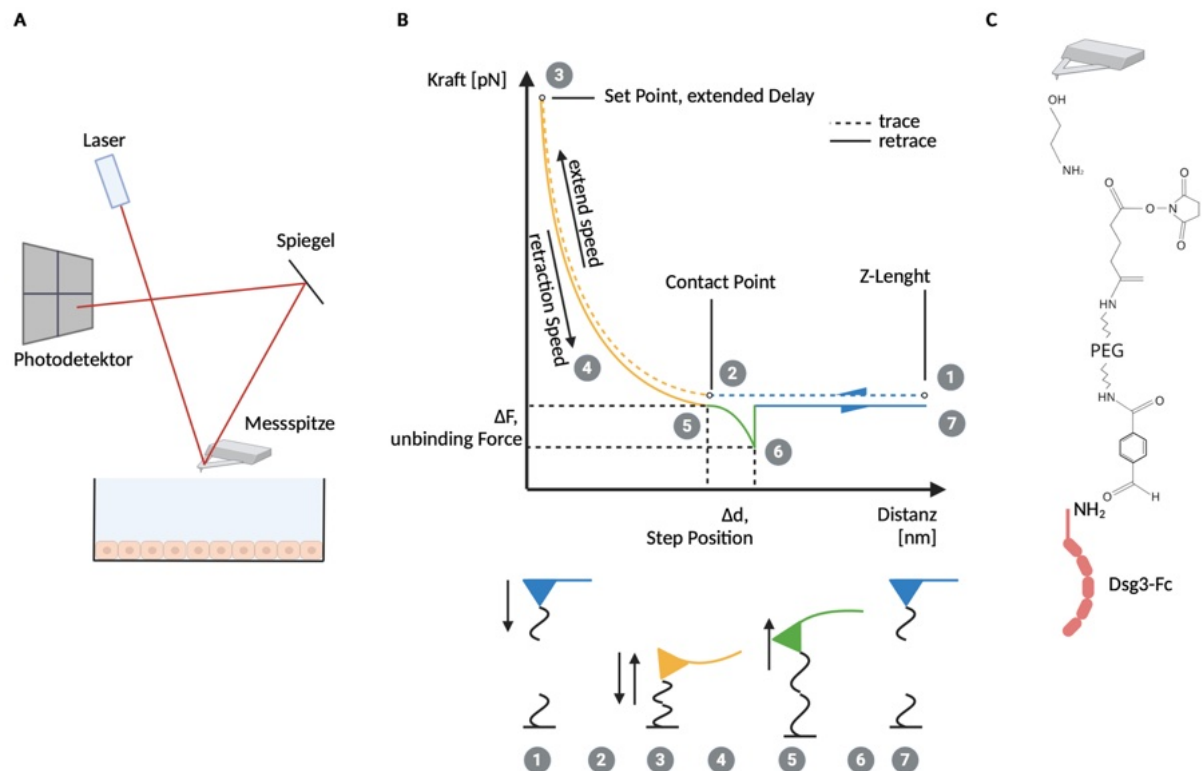


Abbildung 4: Illustration der Funktionsweise des Rasterkraftmikroskops (AFM)

A Vereinfachter Aufbau des AFMs: Über den Photodetektor wird die Abweichung des auf die Messspitze gerichteten Lasers detektiert und so die Auslenkung der Feder gemessen. **B** Illustration einer typischen Kraft-Abstands-Kurve: Die Nadel wird auf die Probe zubewegt, bis sie mit der Oberfläche in Kontakt kommt, wodurch die Blattfeder nach oben ausgelenkt wird, was durch den Photodetektor registriert wird. (1-3). Tritt ein Bindungsereignis auf, wird die Blattfeder beim Zurückfahren in umgekehrter Weise ausgelenkt, bis die Bindung reißt (4-6). Ausführlichere Erläuterung im Text. **C** Darstellung einer funktionalisierten Messspitze. An die Siliziumnitrid-Oberfläche der Blattfeder wird mittels Ethanolamin ein PEG-Linker gebunden, durch den ein größerer Abstand zwischen Spitze und Protein gewonnen wird. Anschließend wird an den PEG-Linker das gewünschte Protein (hier: Dsg3-Fc) gebunden.

6.14.1. Proteinaufreinigung

Um die Spitzen für die Messung der Dsg3-Dsg3-Interaktionen zu funktionalisieren, wurde ein Konstrukt aus der extrazellulären Domäne von Desmoglein-3 gekoppelt an das Fc-Fragment von Immunglobuline der Klasse G verwendet (Heupel et al., 2008). Verschiedene Konstrukte dieser Art wurden gemäß einem etablierten Protokoll (Schlegel et al., 2010) von der biophysikalischen Einheit unter der Leitung von Dr. Franziska Vielmuth produziert und allgemein zur Verfügung gestellt. CHO-Zellen (engl.: „Chinese hamster ovary cells“) wurden mit dem entsprechenden Konstrukt transfiziert, das Protein translatiert, korrekt gefaltet, posttranslational modifiziert und sezerniert. Das aus dem Medium gewonnene Protein wurde dann mittels Säulenchromatographie isoliert und zur Funktionalisierung der Spitzen verwendet.

6.14.2. Funktionalisierung der Messspitze

Die Messfederhalter vom Typ MLCT, an denen die aus Siliziumnitrid bestehenden Blattfedern und Messspitzen befestigt sind, wurden mit Chloroform gereinigt und über Nacht in 5,64 mol/l Ethanolamin in DMSO inkubiert. Ethanolamin ist ein primäres Amin und wird unter Abspaltung von Wasser durch eine Esterbindung an die Siliziumnitrid-Oberfläche gebunden (Klein et al., 2003). Nach zwei Waschschritten in DMSO und drei Weiteren in Ethanol wurden die Messfederhalter getrocknet. Nun wird ein Acetal-Polyethylenglykol-Abstandshalter (engl.: „PEG-Linker“) an die Spitze gekoppelt, um einen größeren Abstand zwischen Messspitze und dem später angefügten Protein zu gewinnen. Dadurch ist das Protein in der Lage sich während der Messung freier zu orientieren, was die Bindungsfrequenz verbessert. Die gemessenen Kräfte werden durch den PEG-Linker nicht beeinflusst, da sich dieser gemäß des Modells einer wurmartigen Kette verhält (Kienberger et al., 2000).

Der NHS-Ester des PEG-Linkers bildet mit der Aminogruppe des an der Spitze befindlichen Ethanolamins eine Peptidbindung. Der PEG-Linker wurde in 600 µl Chloroform und 30 µl Triethylamin gelöst und anschließend für 2 Stunden in einem luftdichten Gefäß auf die Spitzen der Messfederhalter gegeben. Anschließend wurden die Spitzen für 10 min. in 1% Zitronensäure gegeben, wodurch die Acetal-Gruppe des PEG-Linkers in eine Aldehydgruppe konvertiert wird. Im Folgenden wurden die Blattfederhalter erst in destilliertem Wasser und dann in Chloroform gewaschen. An die Aldehydgruppe wird nun über die freie Aminogruppe eines Lysinrests das Fc-Teil des Proteinkonstrukts gebunden (Ebner et al., 2007). Dazu wurde für eine Stunde 50 µl Proteinlösung in einer Konzentration von 0,15 mg/ml auf die getrockneten Spitzen gegeben und die Reaktion durch hinzugeben von 1 µl 1 mol/l NaCNBH₃ gestartet. Nach einer Stunde wurde die Reaktion durch hinzugeben von 2,5 µl 1 mol/l Ethanolamin (pH = 9,6) gestoppt. Die Messfederhalter wurden in HBSS gewaschen und anschließend in einer luftdicht verschlossenen Petrischale in HBSS bei 4°C bis zu 10 Tage gelagert.

6.14.3. Messung und Auswertung

Die Messungen wurden auf einem NanoWizard3 AFM durchgeführt, das auf einem invertierten optischen Fluoreszenzmikroskop (Axio Observer D1), bestückt mit einem 10 x NA 0,25 Luft- und einem 63x NA 1,4 Ölobjektiv, montiert ist. Dieser Aufbau befindet sich separiert in einer Kammer, die stets bei 37°C Raumluft gehalten wird. Das AFM wurde mit dem

Programm SPMControl v4 betrieben und die Daten mit dem Programm SPM Data Processing v4.2 ausgewertet.

Für die Messung wurden mit Dsg3-Fc funktionalisierte, pyramidal geformte D-Spitzen einer MLCT-Spitzenträgers verwendet und mittels einer Spange auf dem Glasblock des AFM montiert. Der Laser des AFM wurde auf die verwendete Spitze eingestellt und der Spiegel so ausgerichtet, dass der reflektierte Strahl in der Mitte der Messfläche des Photodetektors erfasst wird. Der Richtwert der Federkonstante für die verwendeten MLCT-Blattfedern lag bei $D = 0,03 \text{ N/m}$.

Um eine Übersichtsaufnahme zu erstellen, wurden folgende Parameter am AFM eingestellt: Qi-modus, Imaging mode, Setpoint: 0,5 nN, Z-lenght: 1.500 nm, $20 \times 30 \text{ }\mu\text{m}$, 100×150 Messpunkte. Für die Kraftmessungen wurden folgende Einstellungen verwendet: „Contact mode“, „force mapping“, rel. Setpoint: 0,5 nN, Z-lenght: 1.500 nm, Extend Speed $10,0 \text{ }\mu\text{m/s}$, extended delay 0,1 s, 60×15 Messpunkte, $5 \times 1,25 \text{ }\mu\text{m}$.

Die auf Deckgläschen in 6-Lochplatten angezüchteten Zellen wurden dreimal gründlich mit Zellkulturmedium gewaschen, in die AFM-Halterung eingespannt und mit Medium bedeckt. Anschließend wurde die Halterung im AFM montiert. Die Spitze wurde bis auf das Niveau der Zelloberfläche herabgefahren. Nun können zum einen Bilder von der Oberfläche der Zellen erstellt werden und zum anderen Kraft-Abstandskurven ermittelt werden. Es wurde eine Übersichts-Topographieaufnahme erstellt und anschließend im aufgenommenen Bereich an drei definierten Arealen, die Zellkontaktzonen überspannten, Kraftmessungen durchgeführt. Nachdem zuerst die basalen Bedingungen ermittelt wurde, wurden $100 \text{ }\mu\text{M}$ Apremilast hinzugegeben und nach 2 Std. erneut in denselben Bereichen auf dieselbe Art gemessen.

Um Proteindenaturierung zu vermeiden, wurde darauf geachtet, dass die funktionalisierte Spitze immer feucht gehalten wurde und die Zellen von Medium bedeckt blieben.

6.15. Migrationsversuche

Um Zellmigration und Proliferation zu untersuchen wurden Zellmigrationsversuche verwendet (Rötzer et al., 2016, Grada et al., 2017).

Dafür wurden Keratinozyten in 24-Lochplatten ausgesät, auf denen vorher auf der Unterseite fünf horizontale Linien pro Well gezogen wurden, um später ein Raster zur Verfügung zu haben, um Wachstum und Migration beobachten und quantifizieren zu können. Sobald die Zellen 100% konfluent waren, wurde mithilfe einer $10\text{-}100 \text{ }\mu\text{l}$ Pipettenspitze entlang eines

Lineals eine definierte Wundfläche senkrecht zu den Markierungen durch den Monolayer appliziert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit Medium gewaschen und mit den jeweiligen Mediatoren inkubiert. Nach 48 Stunden wurde erneut das Medium gewechselt und die Zellen neu inkubiert. Pro Well wurden alle 24 Stunden vier Fotos gemacht und anschließend mit ImageJ die ausgekratzte Fläche vermessen. Ausgehend vom Ausgangswert wurde das prozentuale Schrumpfen der ausgekratzten Fläche graphisch dargestellt.

6.16. Aufnahme und Auswertung von Bild- und Datenmaterial

Keratinozytendissoziationversuche

Für die automatisierte Auswertung von Keratinozytendissoziationsversuchen wurden mit einer Canon 50D Bilder aufgenommen und mit ImageJ 2.3.0 analysiert. Dazu wurden die Bilder importiert, der Bereich des Lochplatte im Bild ausgeschnitten, das Bild in eine 8-Bit-Datei umgewandelt und mittels Threshold-Funktion ein Binärbild generiert. Anschließend wurde die Zahl der Fragmente mit der Funktion „Analyze Particles“ für Fragmente über einer Größe von 60 Pixeln ausgezählt.

Western-Blot-Analyse

Western-Blot-Banden wurden mithilfe der Software ImageJ 2.3.0 durch Messung des mittleren Grauwertes in einem Rechteck von definierter Größe um die jeweilige Bande quantifiziert. Die mittlere Grauwertintensität des Hintergrundes der jeweiligen Proteinspur wurde von dem Ergebnis abgezogen und die Werte auf eine entsprechende Ladekontrolle bezogen.

Immunfluoreszenzmikroskopie

Die verarbeiteten Proben wurden mithilfe des Konfokalmikroskops und einem 63x Ölobjektiv betrachtet und Bilder aufgenommen. Je Kondition wurden mindestens 4 Übersichtsbilder in 3-facher Vergrößerung und 8 Detailaufnahmen in 15-facher Vergrößerung von zwei verschiedenen Deckgläschen aufgenommen. Die jeweiligen Einzelkanalaufnahmen sowie ein zusammengefügtes Mehrkanalbild wurden erstellt.

Um die Keratinretraktion zu quantifizieren wurden die Bilder der panCK-Färbung mit ImageJ 2.3.0 analysiert. Dafür wurde die Farbintensität entlang einer Linie von 10 µm Länge senkrecht zu verlaufenden Zellgrenze gemessen und mit der Funktion „Plot profile“ dargestellt und als Datenpunkttabelle mit x = Längenkoordinate und y = Farbintensität ausgegeben. Pro Kondition wurden so je fünf Zellgrenzen aus zwei Übersichtsbildern pro N vermessen.

Anschließend wurden die Daten in Excel importiert, die Werte der einzelnen Farbtintensitätsprofile am gemeinsamen Tiefpunkts in der Mitte der Linie ausgerichtet, auf einheitliche Länge gekürzt und anschließend Mittelwerte gebildet. Die gemittelten Profile wurden dann in einem Liniendiagramm dargestellt. Um den graphisch dargestellten Verlauf der Keratinfilamente zu quantifizieren wurde der Abstand der Höhepunkte der Keratinfärbung jeder Kondition gemessen und im Balkendiagramm dargestellt (siehe Abbildung 14D).

Um die Co-Lokalisation von Desmoglein-3-Färbung und panCK-Färbung zu quantifizieren wurde ein Protokoll verwendet (Dunn et al., 2011). Mittels ImageJ wurde Pearson's R (Analyse – Colocalisation - Coloc 2 -> Pearson's R value (no threshold)) aus je zwei Übersichtsbildern pro N gemessen, ein Mittelwert gebildet und die Daten in einem Balkendiagramm dargestellt.

In einer weiteren Quantifizierungsmethode wurden die Anzahl der Keratinbündel pro definierter Strecke von 10 μm ausgezählt. Dafür wurde In ImageJ eine Linie entlang der Zellgrenze gezogen und mit der Funktion „Plot profile“ die Keratinfilamente im Querschnitt dargestellt. Anschließend wurde die Anzahl der sich im Profil darstellenden Keratinbündel, die sich mindestens über das Fünffache des Grundrauschens erheben, ausgezählt (siehe Abbildung 15C).

Um die Blasenlänge der ex vivo Experimente zu bestimmen wurde H.E. gefärbte Bilder im Auflicht Mikroskop in kompletter Länge aufgenommen. Die Bilder wurden anschließend mit ImageJ analysiert. In drei Experimenten wurde in jedem Schnitt die aufgetretene Blasenlänge vermessen und der Mittelwert gebildet.

Rasterkraftmikroskopie

Die AFM-Datensätze wurden mit der JPK Data Processing Software ausgewertet. Dazu wurden die gemessenen Kraft-Abstandskurven manuell ausgewertet und Bindungsereignisse vermessen. Die erhaltenen Daten wurden mit der Software Origin pro ausgewertet. Da die Werte für die „unbinding force“ und „step position“ nicht Normalverteilt sind, wurde ein Peakfit verwendet.

Statistik und Graphische Darstellung

Zur statistischen Analyse der Daten wurden Microsoft Excel und GraphPad Prism 8 verwendet. Erhobene Daten wurden in Excel zusammengefasst und analysiert. Die gezeigten Diagramme wurden mit GraphPad Prism erstellt. Sie zeigen, wenn nicht anders angegeben, den Mittelwert, die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar (engl. „standard error of the

mean“, SEM). Für die statistische Analyse wurde ebenfalls GraphPad Prism verwendet. Für die Analyse von zwei unabhängigen Gruppen wurde ein zweiseitiger, ungepaarter studentischer t-Test verwendet. Wenn mehr als zwei Gruppen analysiert wurden, wurde eine einfache Varianzanalyse („Analysis of variance“, ANOVA) mit Bonferroni Korrektur für multiples Testen durchgeführt. Für Werte ab $p < 0,05$ wurde statistische Signifikanz angenommen.

Die Bearbeitung und Zusammenstellung der Bilder erfolgten mit Adobe Photoshop 2022 und die Illustrationen wurden mit BioRender.com erstellt.

7. Ergebnisse

Daten dieser Arbeit wurden 2023 unter dem Titel „Apremilast prevents blistering in human epidermis and stabilizes keratinocyte adhesion in pemphigus“ von den gleichberechtigten Erstautoren Dr. Anna Sigmund, Sophia Engelmayer und dem Promovierenden im Journal Nature communications publiziert (Sigmund et al., 2023).

7.1. Apremilast induziert eine cAMP-Spiegelerhöhung in humanen Keratinozyten.

Apremilast ist ein Inhibitor der Phosphodiesterase 4 (Gottlieb et al., 2008). Gemäß vorangegangener Publikation wird die PDE4 ebenfalls in Keratinozyten exprimiert (Papp et al., 2012). Um zu überprüfen, ob Apremilast auch in Keratinozyten wie erwartet den cAMP-Spiegel erhöht, wurde ein EIA durchgeführt. Da Apremilast in DMSO gelöst wurde, stellt DMSO eine Kontrollbedingung bei allen Experimenten dar.

Sowohl nach 2h- wie auch nach 24h-Inkubation mit 100 μ M Apremilast zeigte sich ein signifikanter Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration um den Faktor $2,7 \pm 1,0$ (2h) bzw. $2,7 \pm 1,2$ (24h). Nach 24h Inkubation mit PV-IgG zeigte sich ein nicht-signifikanter Anstieg um das $2,2 \pm 0,5$ -fache, nach gemeinsamer Inkubation mit Apremilast stieg der cAMP-Spiegel signifikant auf das $4,5 \pm 0,8$ -fache (siehe Abbildung 5).

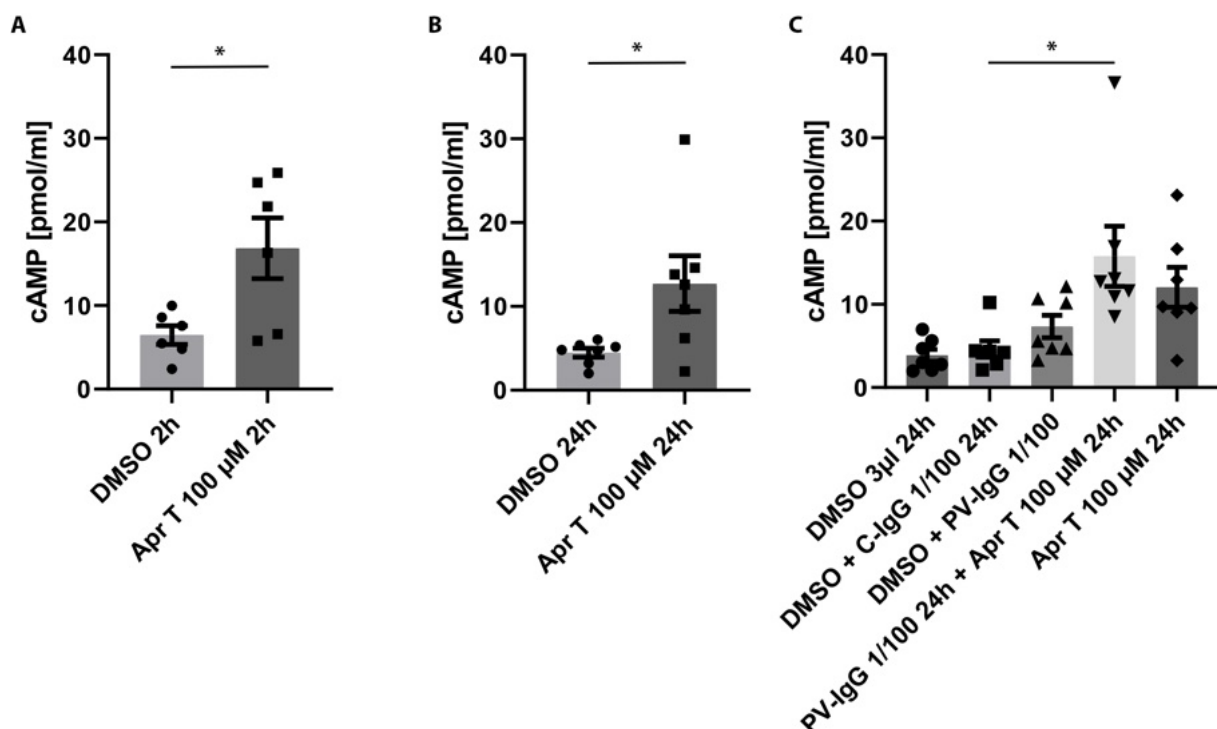


Abbildung 5: Apremilast erhöht den cAMP-Spiegel in Keratinozyten.

A Im cAMP Enzyme Immunoassay von HaCaT-Zelllysaten zeigte sich nach Inkubation mit Apremilast (100 μ M) für 2 Stunden (A, $n = 6$) bzw. 24 Stunden (B, $n = 7$) ein signifikanter Anstieg der cAMP-Spiegels gegenüber Kontrollbedingungen (DMSO). C cAMP ELISA nach 24h Inkubation mit DMSO, Apremilast, C-IgG und PV-IgG. Dargestellt ist der Mittelwert, die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. Ungepaarter, zweiseitiger T-Test (A, B), one-way ANOVA mit Bonferronikorrektur (C), * $p < 0,05$, modifiziert nach Sigmund et al., 2023.

7.2. Apremilast stärkt die Zelladhäsion humaner Keratinozyten dosisabhängig.

Um zu testen, ob Apremilast neben seiner immunmodulierenden Wirkung auch direkte Auswirkungen auf die Zelladhäsion hat, wurden Keratinozytendissoziationsversuche durchgeführt.

Schon unter basalen Bedingungen zeigte sich nach 2h Inkubation mit Apremilast ein Dosisabhängiger, nicht-signifikanter Trend zu reduzierten Fragmentzahlen im Keratinozytendissoziationsversuch (siehe Abbildung 6). Effekte traten dabei in vergleichbarem Maße unabhängig der verwendeten Medikationsform auf. Zum einen wurde reines Apremilast in Pulverform in DMSO gelöst (P), zum anderen wurde die vom Hersteller erhältliche Tablette gemörsert und mitsamt den enthaltenen Zusatzstoffen ebenfalls in DMSO gelöst (T).

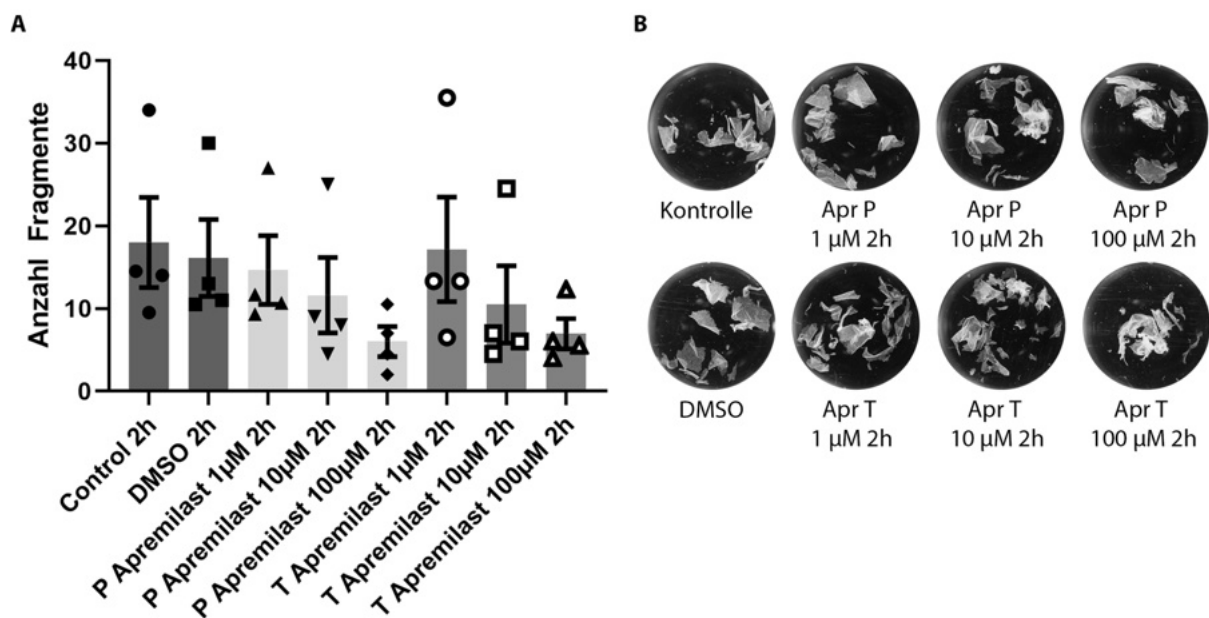


Abbildung 6: Dosisabhängige Stärkung der Zelladhäsion durch Apremilast.

A, B Apremilast stärkt die Zelladhäsion im Keratinozytendissoziationsversuch dosisabhängig ($N = 4$) und unabhängig der verwendeten Medikationsform (Pulver (P) oder Tablette(T)). Dargestellt ist der Mittelwert, die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an (A). B Repräsentative Bilder aus $N = 4$, modifiziert nach Sigmund et al., 2023.

7.3. Apremilast wirkt protektiv gegen den AK23-vermittelten Haftungsverlust in humanen Keratinozyten.

AK23 ist ein pathogener, monoklonaler Antikörper gegen die EC1-Domäne von Dsg3. Die Verwendung des Antikörpers ist gut zur Induktion eines PV-Phänotyps *in vitro* und *in vivo* etabliert (Tsunoda et al., 2003, Schulze et al., 2012, Spindler et al., 2013). Um zu überprüfen, ob Apremilast protektiv gegen einen durch AK23 induzierten Haftungsverlust wirkt, wurden zunächst Keratinozytendissoziationsversuche durchgeführt. Dazu wurden die Zellen 24 Std. mit AK23 und Apremilast inkubiert. Nach Inkubation mit AK23 zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Fragmente von $7,0 \pm 0,7$ auf $27,3 \pm 3,2$. Eine Behandlung mit Apremilast in 10 μM Dosierung konnte den Zellhaftungsverlust nicht ausgleichen ($25,2 \pm 4,5$). Wurde Apremilast in 100 μM -Dosierung verwendet, reduzierte sich die Anzahl der Fragmente signifikant auf $8,6 \pm 1,6$ (siehe Abbildung 7 A, B).

Der p38MAPK-Signalweg nimmt eine Schlüsselrolle in der Pathogenese von Pemphigus vulgaris ein. Eine Aktivierung des p38MAPK-Signalwegs führt *in vitro* und *in vivo* zu teils ähnlichen Veränderungen wie sie auch durch PV-IgGs hervorgerufen werden (Berkowitz et al., 2005, Berkowitz et al., 2006). Diese Veränderungen konnten in vorherigen Studien durch eine Erhöhung des cAMP-Spiegels mittels F/R gehemmt werden, aus der eine Hemmung der p38MAPK resultierte (Spindler et al., 2010, Vielmuth et al., 2018b).

Im Western Blot fand sich nach 24h weder eine Aktivierung der p38MAPK durch AK23, noch konnte eine Dsg3-Depletion nachgewiesen werden (siehe Abbildung 7 C, D). Im Folgenden wurde Apremilast 100 μM verwendet.

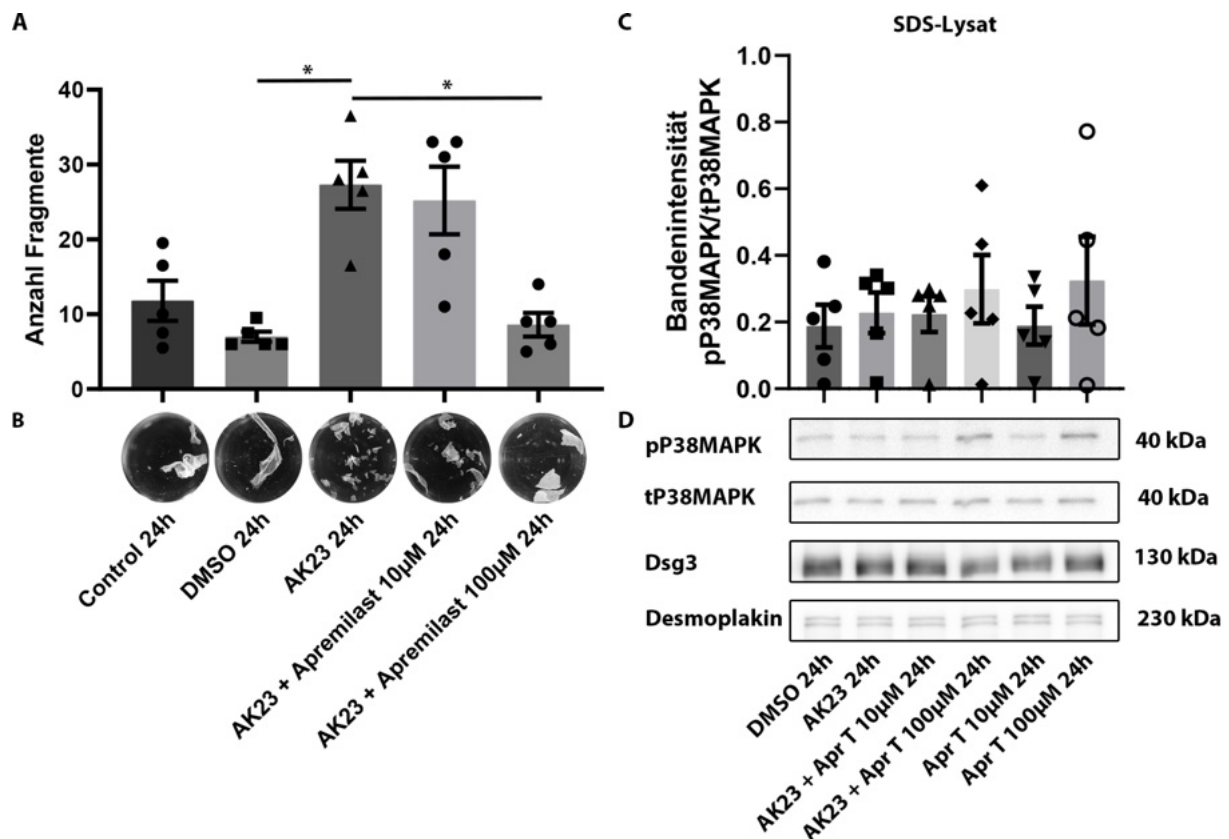


Abbildung 7: Apremilast wirkt protektiv gegen AK23-vermittelten Haftungsverlust in Keratinozyten ohne Einfluss auf die Aktivität der p38MAPK zu nehmen.

A Apremilast hemmt den AK23-bedingten Zellhaftungsverlust im Keratinozytendissoziationsversuch (N = 6). **B** Repräsentative Bilder aus (A). **C, D** Im Western Blot zeigt sich keine signifikante Aktivierung der p38MAPK (N = 5) durch AK23. Es fand sich darüber hinaus keine Dsg3-Depletion nach 24h Behandlung mit AK23 oder Apremilast (N = 3). **C** Quantifizierung von (D) p38MAPK. Dargestellt ist der Mittelwert, die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. One-way ANOVA mit Bonferronikorrektur (A, D), * $p < 0,05$, modifiziert nach Sigmund et al., 2023.

Um den Effekt von AK23 und Apremilast auf die Dsg3-Depletion morphologisch zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenz-Versuche durchgeführt. Dazu wurden HaCaT-Zellen auf Deckgläschen ausgesät, bis zur Konfluenz anwachsen gelassen und dann mit den zu untersuchenden Mediatoren behandelt.

Unter Kontrollbedingungen stellten sich HaCaT-Zellen als polygonale Zellen mit geringem zytoplasmatischem Anteil und relativ großem Zellkern dar. Dsg3 war homogen entlang der Zellmembran verteilt. Das kortikale Aktin fand sich ebenfalls in unmittelbarer Nähe der Zellmembran und kolokalisiert, erkennbar an der Farbüberlagerung von rot und grün zu gelb/weiß, mit der Dsg3-Färbung (siehe Abbildung 8, Reihe 1).

Nach Behandlung mit AK23 stellte sich Dsg3-Färbung entlang der Zellgrenzen ebenfalls fragmentiert und leicht verbreitert im Vergleich zu Kontrollbedingungen dar. Dsg3

kondensiert sich zu kleinen Streifen senkrecht zur Zellmembran, welche als „linear arrays“ bezeichnet werden (Spindler et al., 2013, Tsunoda et al., 2003). Auch nach Behandlung mit Apremilast finden sich noch andeutete „linear arrays“ (siehe Abbildung 8, Reihe 2-4).

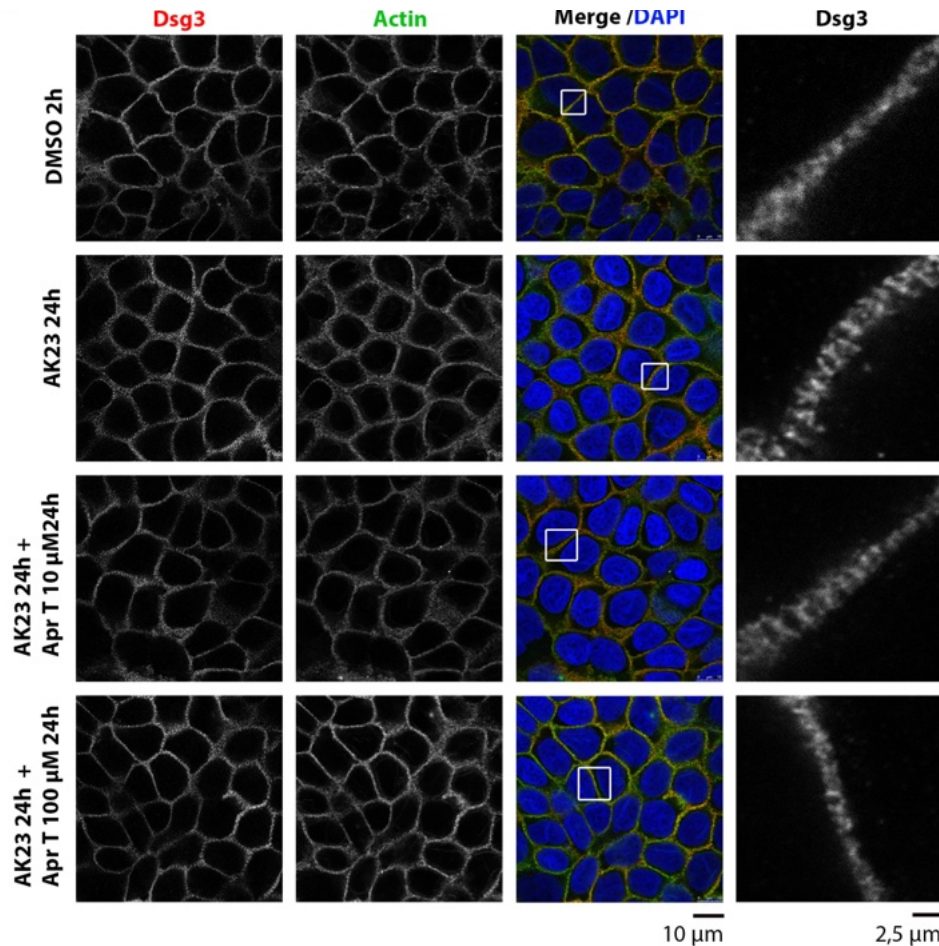


Abbildung 8: Immunfluoreszenzdarstellung von Dsg3 und Aktin nach 24h Inkubation von AK23 und Apremilast. Repräsentative Zusammenstellung aus N = 4.

7.4. Apremilast wirkt protektiv gegen PV-IgG-vermittelten Haftungsverlust in humanen Keratinozyten.

Aufgrund der positiven Ergebnisse der Vorversuche mit AK23 wurde im nächsten Schritt der Einfluss von Apremilast auf die Effekte von PV-IgGs getestet. Die aufgereinigten PV-IgGs wurden in einer Verdünnung von 1:100 für weitere Versuche verwendet. Als Kontrolle wurden im selben Verfahren gewonnene Kontroll-IgGs (C-IgG) von Gesunden genutzt.

In Keratinozytendissoziationsversuchen zeigte sich, dass PV-IgG, wie auch schon AK23, die Zellhaftung beeinträchtigt. Um den verschiedenen Prozessen der Pemphiguspathogenese gerecht zu werden, wurden zwei verschiedene Inkubationsdauern gewählt. Erste

Signalwegsalterationen, wie z.B. die Aktivierung der p38MAPK, finden sich bereits innerhalb der ersten halben Stunde nach Bindung von PV-IgGs an Dsg3 (Berkowitz et al., 2005, Lee et al., 2009). Wichtige morphologische Korrelate wie Dsg3-Depletion und Keratinretraktion wiederum treten zum Teil erst nach sechs und mehr Stunden in Erscheinung (Berkowitz et al., 2005, Lee et al., 2009, Jolly et al., 2010).

Sowohl nach 2h Inkubation mit Apremilast und 30min Inkubation mit PV-IgG als auch nach gemeinsamer Inkubation beider Mediatoren über 24h, zeigten sich signifikante Effekte. So führten die PV-IgGs zu einer signifikanten Erhöhung der Fragmentzahl von $13,6 \pm 2,8$ auf $37,4 \pm 5,9$ (2 Std./0,5 Std.) bzw. $7,6 \pm 2,5$ auf $31,8 \pm 4,1$ (24 Std.). Durch Behandlung mit Apremilast in 100 μ M Dosierung konnte die Anzahl der Fragmente signifikant auf $17,8 \pm 2,1$ bzw. $9,4 \pm 1,3$ gesenkt werden (siehe Abbildung 9 A-D).

Entgegen den Erwartungen fand sich nach Behandlung mit der verwendeten PV-IgG-Fraktion keine Aktivierung der p38MAPK (siehe Abbildung 9 E-H) in der Western Blot-Analyse der Triton-X-100-löslichen Fraktion. Die p38MAPK findet sich vorwiegend in jener Triton-löslichen Fraktion, in welcher sie nicht an zytoskelettal gebunden Proteine vorliegt (Walter et al., 2017). In vorangegangenen Publikationen konnte eine solche nachgewiesen werden (Berkowitz et al., 2005, Spindler et al., 2010). Auch hemmte Apremilast die p38MAPK-Phosphorylierung nicht. Dies ist am ehesten auf die individuelle Zusammensetzung der PV-IgG-Fraktion und der jeweiligen Antigene zurückzuführen, welche von PatientIn zu PatientIn variieren (Walter et al., 2017).

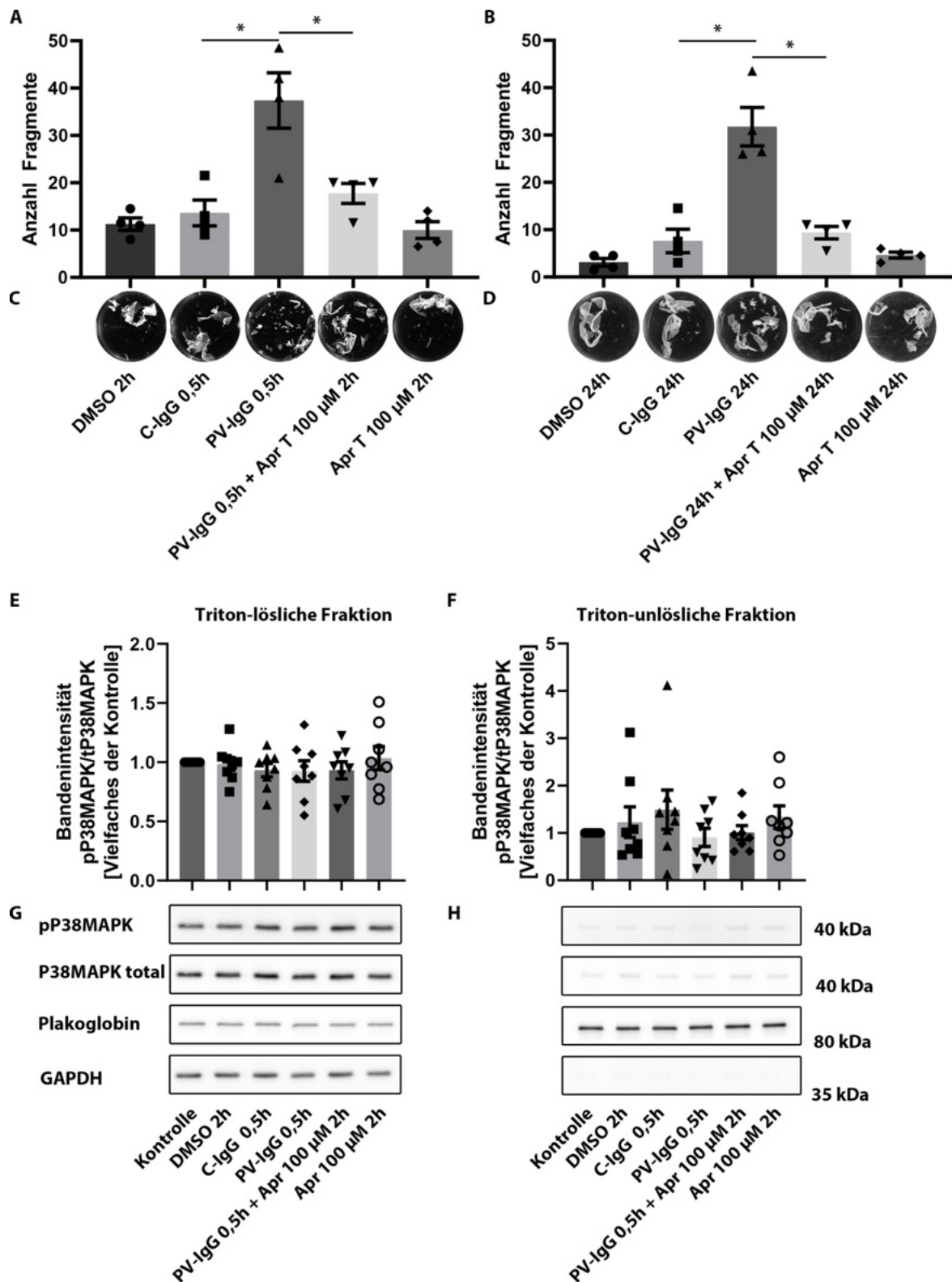


Abbildung 9: Apremilast wirkt protektiv gegen PV-IgG-vermittelten Haftungsverlust in Keratinozyten.

A, B Apremilast hemmt den PV-IgG-bedingten Zellhaftungsverlust im Keratinozytendissoziationsversuch nach 30 min. (A, N = 4) und nach 24 Stunden (B, N = 4) signifikant. C, D Repräsentative Bilder aus (A und B). E, F Quantifizierung der p38MAPK (G, H): Im Western Blot zeigt sich keine Aktivierung der p38MAPK (N = 4) durch 30 min. Behandlung mit PV-IgG, welche durch 2h

Behandlung mit Apremilast ebenfalls unbeeinträchtigt bleibt. **G, H** Repräsentative Western Blot-Analyse nach Triton-X-100-Extraktion. Dargestellt ist der Mittelwert, die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. One-way ANOVA mit Bonferronikorrektur (A, B, E, F), * $p < 0,05$, modifiziert nach Sigmund et al., 2023.

7.5. Apremilast hat keinen Einfluss auf die durch PV-IgG induzierte-Dsg3 Depletion.

Nach Behandlung mit F/R wird die Dsg3-Depletion in Keratinozyten gehemmt (Spindler et al., 2010). Folglich war es von Interesse zu evaluieren, ob nach Inkubation mit Apremilast, welche den cAMP-Spiegel nur etwa ein Drittel so stark erhöht wie F/R, ebenfalls zur Hemmung der Dsg3-Depletion kommt.

Unter Kontrollbedingungen fanden sich Dsg3 und kortikales Aktin homogen entlang der Zellmembran verteilt und kolokalisierten (siehe Abbildung 10 A, Reihe 1-3). Nach Inkubation mit PV-IgG kommt es zur aus der Literatur bekannten Depletion und Umverteilung von Dsg3 an der Zellmembran. Dsg3 stellt sich nicht mehr in einem durchgängigen Band entlang der Zellmembran dar. Vielmehr findet sich eine Clusterbildung und gepunktetes Vorliegen im Bereich der Zellgrenzen. Insgesamt stellte sich eine Reduktion der Dsg3-Färbung dar, die Zellgrenzen selbst wirkten leicht verbreitert. Nach Behandlung mit PV-IgG kam es zu einer verringerten Kolokalisation von Aktin und Dsg3. Die Aktinfärbung stellte sich weniger homogen und leicht verbreitert entlang der Zellmembran dar (siehe Abbildung 10 A, Reihe 4). Alleinige Apremilastinkubation führte zu keinen sichtbaren Veränderungen der Verteilung von Dsg3 oder Aktin entlang der Zellmembran (siehe Abbildung 10 A, Reihe 5-6). Im Gegensatz zu F/R scheint Apremilast keine Auswirkungen auf die Dsg3-Depletion zu haben.

Um die Dsg3-Depletion auch quantitativ beurteilen zu können, wurden Western Blot-Experimente durchgeführt. Nach 24h Behandlung mit PV-IgG zeigte sich eine signifikante Reduktion der Dsg3-Bande in der Triton-löslichen Fraktion. Ebenfalls 24-stündige Koinkubation mit Apremilast hatte keinen Einfluss auf die Dsg3-Depletion. Pg, Dp und GAPDH stellen Ladekontrollen dar und bestätigten, dass die Triton-Separation funktioniert hat. Sie zeigten sich durch die Behandlung unverändert (siehe Abbildung 10 B, C).

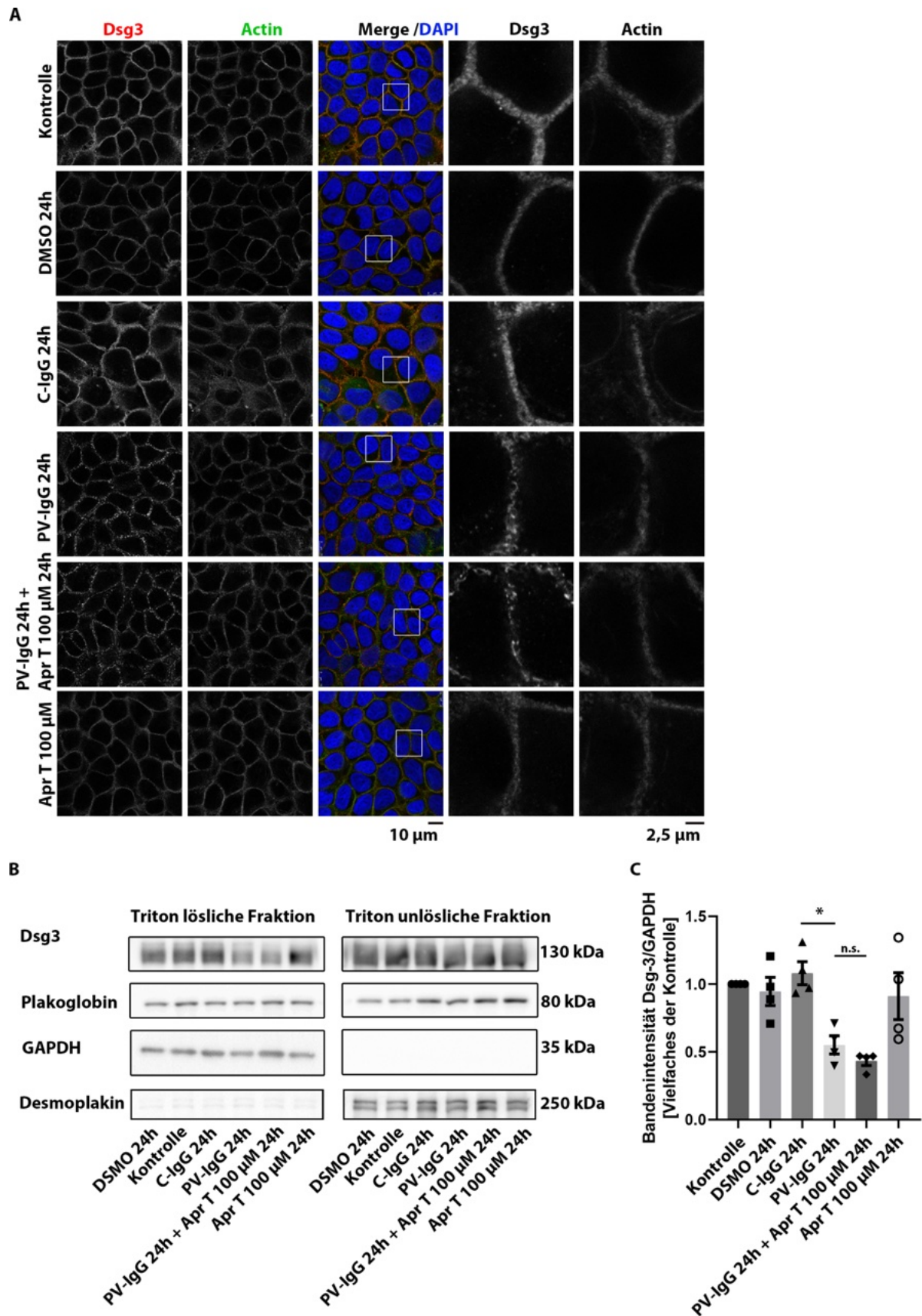


Abbildung 10: Apremilast nimmt keinen Einfluss auf die Dsg3-Depletion durch PV-IgG.

A In der Immunfluoreszenzfärbung zeigt sich keine Hemmung der durch PV-IgG verursachten Dsg3-Depletion. Das Aktinskelett stellt sich unauffällig dar. Repräsentative Zusammenstellung aus N = 4. **B Triton-X-100-Proteinextraktion:** Auch

in der quantitativen Proteinanalyse mittels Western Blot zeigt sich keine Hemmung der Dsg3-Depletion, repräsentativer Western Blot von 4N. C Quantifizierung der Triton-löslichen Fraktion aus (B), dargestellt ist der Mittelwert, die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. One-way ANOVA mit Bonferronikorrektur (C), * $p < 0,05$, modifiziert nach Sigmund et al., 2023.

7.6. Die Einzelmolekülbindungseigenschaften von Dsg3 werden durch Apremilast nicht beeinflusst.

Die Rasterkraftmikroskopie (engl. „Atomic Force Microscopy“, AFM) ist ein relativ neuartiges, aus der Materialphysik stammendes Verfahren, mit welchem Einzelmolekülbindeeigenschaften analysiert werden können (Binnig et al., 1986). Mithilfe einer Messspitze können hochauflösende topographische Übersichtsbilder von Materialien oder Geweben erstellt werden. Darüber hinaus können die Messspitzen mit Proteinen funktionalisiert und so Einzelmolekülbindungen analysiert werden (Vielmuth et al., 2018a, Li et al., 2017).

HaCaT-Zellen wurden auf Glasplättchen ausgesät und nach Erreichen von Konfluenz analysiert. Zunächst wurden mit einer mit Dsg3-Fc beschichteten Messspitze unter Kontrollbedingungen ein Übersichtsbild und im Anschluss Einzelkraftmessungen entlang der Zellgrenzen durchgeführt. Dabei lässt sich die Bindungsstärke einer einzelnen Molekülbindung, in diesem Falle die von Dsg3, als „unbinding force“ bestimmen. Darüber hinaus können die Bindungsfrequenz und die „unbinding position“ als die Distanz in Zugrichtung bestimmt werden. Letztere kann als Maß für die zytoskelettale Verankerung der Desmosomen angesehen werden (Vielmuth et al., 2018a, Sariisik et al., 2015).

Die HaCaT-Zellen zeigten das typische morphologische Erscheinungsbild für AFM-Experimente (Vielmuth et al., 2015a). Sie sind polykolonale Zellen mit zahlreichen fingerförmige Ausläufer, die mit denen der Nachbarzelle in Kontakt stehen (siehe Abbildung 11 A). In den Einzelmolekülmessungen fanden sich mit der Literatur vergleichbare Werte für „unbinding force“ von ca. 40 pN und „step position“ von 168 nm (Hiermaier et al., 2021, Vielmuth et al., 2015a). Nach Durchführung der Kontrollmessungen wurden die Zellen für 2h mit Apremilast inkubiert. Nach erneuter Aufnahme der Übersichtsbilder und Einzelmolekülmessungen, fanden sich keine signifikanten Unterschiede für „unbinding force“, „unbinding position“ und Bindungsfrequenz (siehe Abbildung 11 B-D).

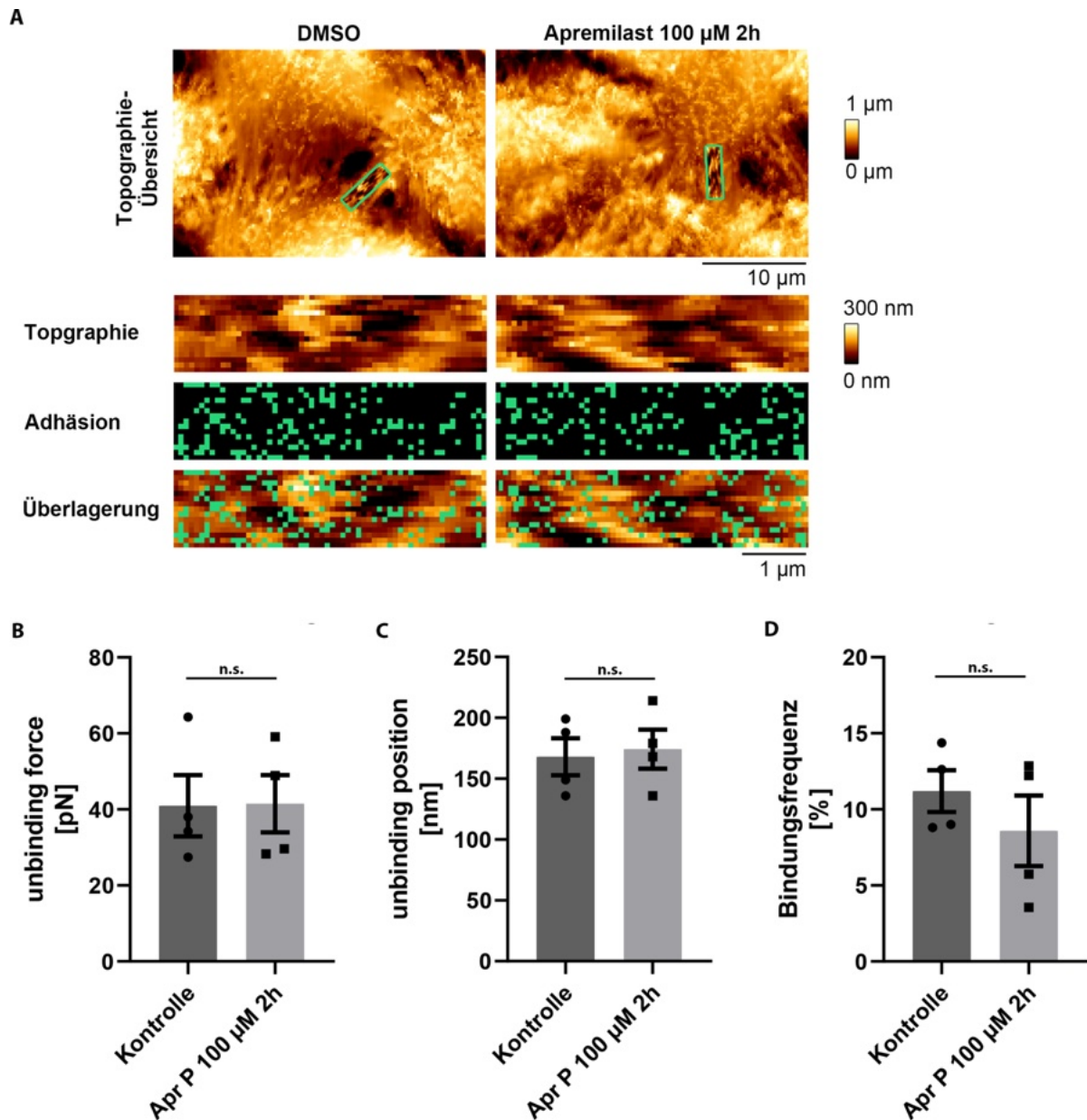


Abbildung 11: Die Einzelmolekülbindungseigenschaften von Dsg3 werden von Apremilast nicht beeinflusst.

A Übersichtsbilder und Detailaufnahmen von AFM-Messungen auf HaCaT-Zellen. Nach 2h Inkubation mit Apremilast 100 µM finden sich nur geringe morphologische Veränderungen. In den Detailaufnahmen stellen sich die fingerförmigen Ausläufer der HaCaT-Zellen dar. Die grünen Punkte geben aufgetretene Bindungsereignisse wieder. **B, C, D** Mittelwerte von „unbinding force“ (**B**), „unbinding position“ (**C**) und Bindungsfrequenz (**D**). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. Ungepaarter, zweiseitiger T-Test (**B, C, D**), * $p < 0,05$, modifiziert nach Sigmund et al., 2023.

7.7. Die Lokalisation von Dsg2, Dsc3 sowie E-Cadherin werden durch Apremilast und nach PV-IgG Inkubation nicht beeinflusst.

In den Seren von PemphiguspatientInnen wurden Antikörper gegen eine Reihe weiterer Proteine gefunden (Amber et al., 2018). Für Antikörper gegen Dsc3 konnte Pathogenität

nachgewiesen werden (Spindler et al., 2009, Hudemann et al., 2022). Da auch in den verwendeten PV-Seren Antikörper gegen Dsc3 nachweisbar waren (siehe Tabelle 1), wurden weitere Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Unter Kontrollbedingungen findet sich Dsc3 sowohl zytosolisch als auch entlang der Zellmembran angefärbt. Es liegt homogen mit Aussparung des Zellkerns in der ganzen Zelle in Form von kleinen Punkten verteilt vor. Nach Inkubation mit PV-IgG stellte sich Dsc3 in der Färbung unverändert dar, Apremilast zeigte ebenfalls keinen Einfluss (siehe Abbildung 12, Spalte 1, 4).

Um einen etwaigen Effekt von Apremilast auf Adhärens-Junktionen zu untersuchen, wurden Färbungen gegen E-Cadherin angefertigt. E-Cadherin stellt sich unter Kontrollbedingungen erwartungsgemäß homogen, dicht entlang der Zellmembran gefärbt dar. Auch hier fanden sich keine Veränderungen nach Behandlung mit PV-IgG oder Apremilast, was dessen spezifischen Effekt auf Desmosomenhaftung unterstreicht (siehe Abbildung 12, Spalte 2, 5).

Da Dsg2 in der Haut von PemphiguspatientInnen hochreguliert wird (Iwatsuki et al., 1999, Sigmund et al., 2020) und Dsg3 heterophile Interaktionen mit Dsg2 eingehen kann (Vielmuth et al., 2018c, Sigmund et al., 2020), wurden Färbungen gegen Dsg2 durchgeführt. Unter Kontrollbedingungen findet sich in HaCaT-Zellen eine homogene, kräftige Färbung von Dsg2 entlang Zellmembran. In der Immunfluoreszenz stellen sich keine Veränderungen nach Inkubation mit PV-IgG oder Apremilast dar. Das mitgefärbte Aktinzytoskelett zeigte die oben beschriebenen geringgradigen Veränderungen (siehe, Abbildung 13).

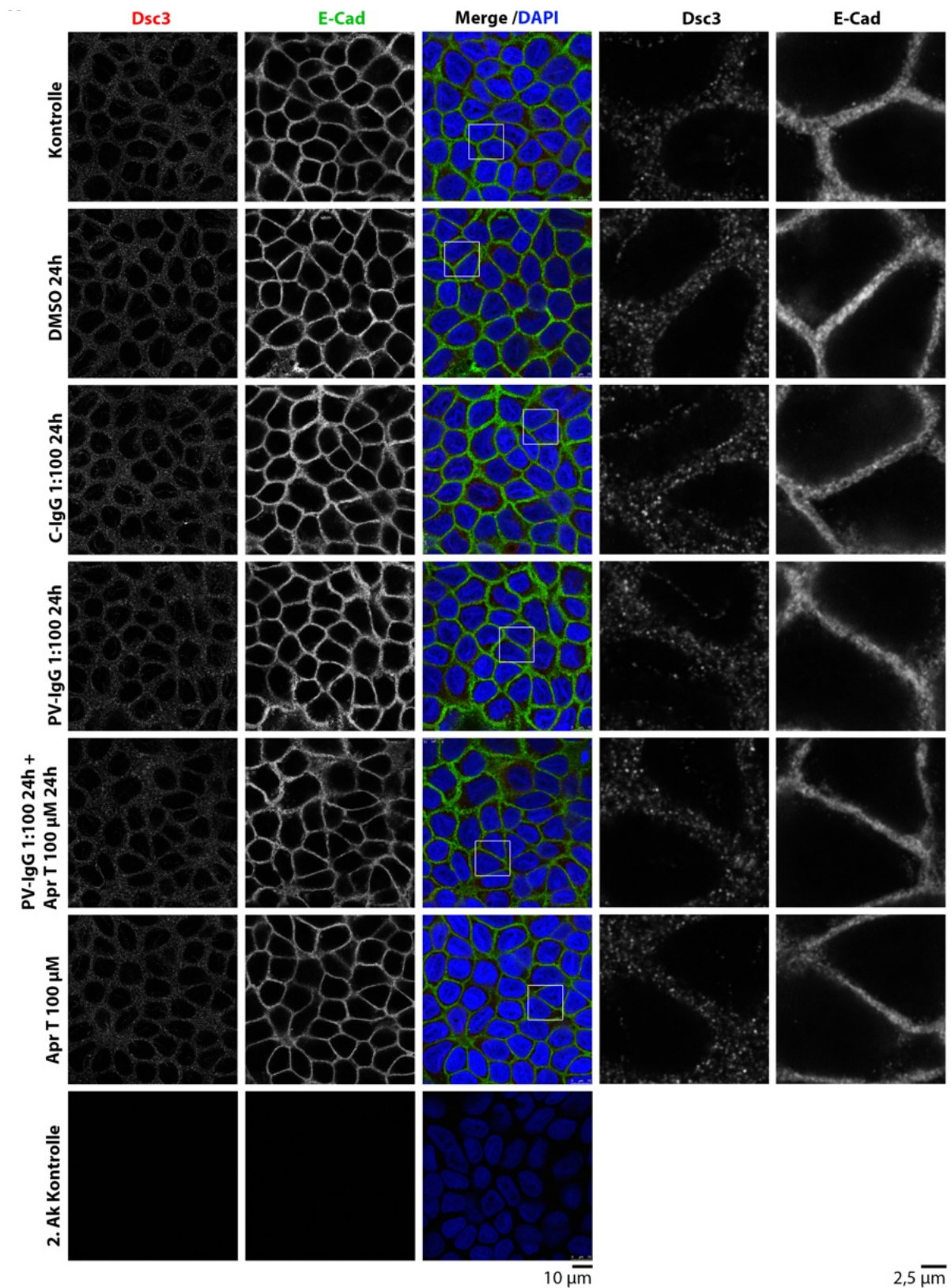


Abbildung 12: Apremilast nimmt keinen Einfluss auf die Dsc3- und E-Cadherin-Expression in HaCaT-Wildtpy-Zellen.

Immunfluoreszenzdarstellung von Desmocollin-3 und E-Cadherin nach 24h Behandlung mit PV-IgG und Apremilast. Es finden sich keine Veränderungen in der Zellmorphologie. Repräsentative Zusammenstellung aus N = 4. Modifiziert nach Sigmund et al., 2023.

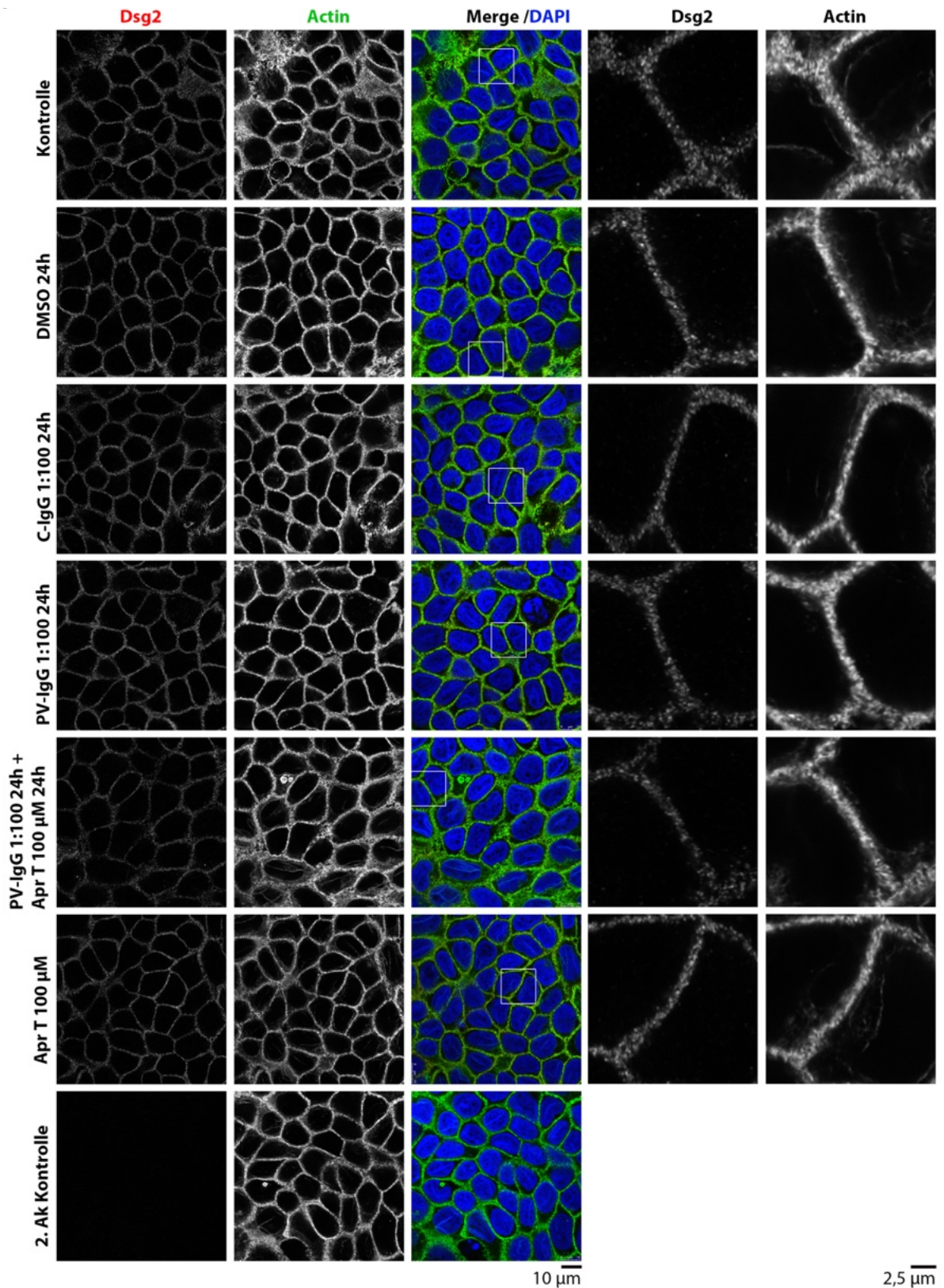


Abbildung 13: Apremilast nimmt keinen Einfluss auf die Dsg2-Expression in HaCaT-Wildtyp-Zellen.

Immunfluoreszenzdarstellung von Dsg2 und Aktin in HaCaT-Wildtyp-Zellen nach 24h Behandlung mit PV-IgG und Apremilast. Es finden sich keine Veränderungen in der Zellmorphologie. Repräsentative Zusammenstellung aus N = 4. Modifiziert nach Sigmund et al., 2023.

7.8. Apremilast hemmt die durch PV-IgG-induzierte Keratinfilamentretraktion in vitro.

Ein weiteres wichtiges morphologisches Korrelat des Zellhaftungsverlusts in der Pathogenese von Pemphigus vulgaris ist die nach PV-IgG-Bindung eintretende Keratinretraktion (Waschke, 2008, Caldelari et al., 2001, Berkowitz et al., 2005, Schlogl et al., 2018). Um zu untersuchen, inwieweit Apremilast diesen Schritt beeinflusst, wurden Immunfärbungen gegen das Keratinzytoskelett angefertigt. Dafür wurden zum einen HaCaT-Zellen nach 24h Inkubation mit PV-IgG und Apremilast mit einem Antikörper gegen alle Zytokeratinfilamente (panCK) sowie Dsg3 eingefärbt und mit dem Konfokalmikroskop analysiert. Unter Kontrollbedingungen findet sich Dsg3 wie bereits beschrieben unverändert. Die Zytokeratinfilamente stellen sich im schmalen zytoplasmatischen Raum der HaCaTs als kräftige, von der Zellmitte zur Membran laufende Bündel, ähnlich den Speichen eines Rades, dar (Quinlan et al., 2017). Besonders deutlich erkennbar ist der Keratinfilament-Ring um den Zellkern herum (siehe Abbildung 14 A, Reihe 1-3).

Nach Behandlung mit PV-IgG lassen sich zum einen weniger und schwächer gefärbte Filamente erkennen, die in Richtung der verbliebenen Dsg3-Moleküle ziehen. Zum anderen findet sich ein größerer Abstand des oben beschriebenen Ringes von Keratinfilamenten (siehe Abbildung 14 A, Reihe 4). Beide Phänomene werden in der Literatur als Keratinretraktion beschrieben (Waschke, 2008). Auffällig ist, dass diese nach Behandlung mit Apremilast weniger prominent ist und deutlich mehr Keratinfilamentfärbung in der Nähe der Dsg3-Färbung zu sehen ist. Wie zu erwarten, fand sich auch hier wieder eine deutliche Dsg3-Depletion, die durch Apremilast nicht gemindert werden konnte (siehe Abbildung 14 A, Reihe 5-6).

Nach Behandlung mit F/R fand bestätigte sich die in der Literatur beschriebene Beobachtung, dass die Dsg3-Depletion gehemmt wird (Spindler et al., 2010). Dsg3 liegt weniger kondensiert vor und eine homogenere Färbung ist erkennbar. Die nach Apremilastbehandlung aufgetretenen Auswirkungen auf das Keratinzytoskelett stellen sich nach Behandlung mit F/R noch prominenter dar. Auffällig ist besonders die feine und geordnete Morphologie der gefärbten Filamente (siehe Abbildung 14 A, Reihe 7-8).

Um diese Beobachtung quantifizieren zu können, wurden zwei Methoden angewandt (siehe 6.16). Zunächst wurde mithilfe der Software ImageJ die Fluoreszenzintensität entlang einer senkrechten Linie von 10 μm Länge über die Zellmembran hinweg gemessen und als

Liniendiagramm vergleichbar mit einem Höhenprofil dargestellt (siehe Abbildung 14 B, D). Hier zeigt sich deutlich, dass die gegenüberliegenden Maxima der Keratinfilamentfärbung nach Inkubation mit PV-IgG signifikant weiter voneinander entfernt liegen. Nach Inkubation mit Apremilast wurde dieser Abstand wiederum signifikant verringert (siehe Abbildung 14 C). In einer zweiten Analyse wurde die Kolokalisation der Dsg3-Färbung und der von panCK mittels ImageJ gemessen. Der erhaltene Kolokalkisationskoeffizient Pearsons R wurde verglichen. Eine Korrelation von $r = 1$ würde bedeuten, dass beide Färbungen perfekt überlappen, während bei einem Koeffizienten von $r = -1$ die beiden Färbungen an keiner Stelle überlappen. Unter Anwendung dieser Methode zeigte sich, dass nach PV-IgG die Kolokalisation von Dsg3 und panCK signifikant abnimmt und dieser Effekt durch cAMP-Spiegelerhöhung gebessert wird. Auch hier zeigten sich starke Effekte nach Behandlung mit F/R gegenüber Apremilast. Während die Inkubation mit PV-IgG zu einer signifikanten Abnahme der Kolokalisation führte, war der Unterschied nach zusätzlicher Behandlung mit Apremilast nicht mehr signifikant. Zusätzliche Behandlung mit F/R resultierte in einem signifikanten Anstieg der Kolokalisation gegenüber alleiniger PV-IgG-Behandlung, sodass vergleichbare Werte wie unter Kontrollbedingungen hergestellt wurden (siehe Abbildung 14 E).

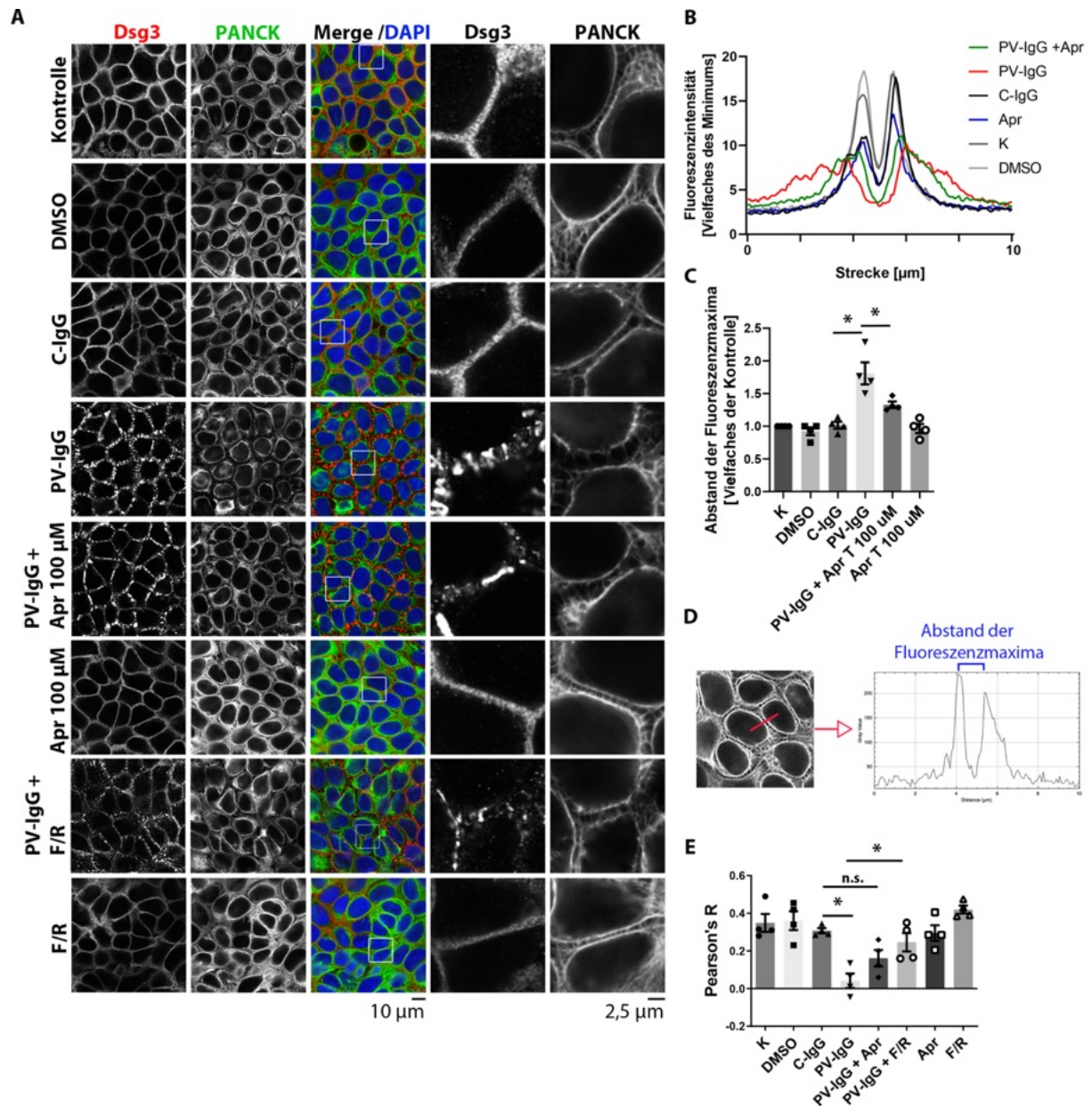


Abbildung 14: Apremilast hemmt die Keratinretraktion in HaCaT-Wildtyp-Zellen.

A Immunfluoreszenzfärbung gegen Dsg3 und panCK in HaCaT-Wildtyp-Zellen (N = 4). 24h Inkubation mit PV-IgG führt zu einer Retraktion des zentralen Zytokeratinrings und Abschwächung der Zytokeratinfärbung. Apremilast hemmt die Keratinretraktion. **B, C** Quantifizierung von (A): Das Profil der gemittelten Fluoreszenzintensitäten der panCK-Färbung (**B**) zeigte eine deutliche Verbreiterung des Abstands der Keratinfilamente (**C**) nach Behandlung mit PV-IgG, welche durch Apremilast gehemmt wird. **D** Illustration der Quantifizierungen (**B, C**). **E** Quantifizierung von (A): Der Kolokalisationskoeffizient Pearson's R gibt die Kolokalisation von Dsg3- und panCK-Färbung wieder. PV-IgG führt zu einer geringeren Kolokalisation, während Apremilast und F/R den PV-IgG vermittelten Effekt hemmen. Dargestellt ist der Mittelwert, die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. One-way ANOVA mit Bonferronikorrektur (**C, E**), * $p < 0,05$, modifiziert nach Sigmund et al., 2023.

In einem zweiten Versuchsansatz wurden HaCaTs analysiert, die YFP-Keratin-5 (CK5, engl. Yellow fluorescent protein, YFP) stabil überexprimieren. Die Zellen wurden freundlicherweise

von der Gruppe um Prof. Dr. Rudolf Leube von Prof. Dr. Reinhard Windoffer und Dr. Nicole Schwarz (Institut für Molekular- und Zellbiologie RWTH Aachen) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden nach 24h Inkubation mit PV-IgG und Apremilast zusätzlich gegen Dsg3 und DAPI gefärbt. In der mikroskopischen Analyse zeigte sich ein ähnliches Bild wie in der zuvor beschriebenen panCK-Färbung. Unter Kontrollbedingungen stellten sich die überexprimierten CK5-Fasern (hier in grün dargestellt) in typischer Morphologie dar (siehe Abbildung 15 A, Reihe 1-3). Erneut fand sich keine Hemmung der durch PV-IgG ausgelösten Dsg3-Depletion durch Apremilast (siehe Abbildung 15 A, Reihe 4-6). Die grün dargestellten Keratin-5-Filamente zogen sich nach Inkubation mit PV-IgG in Richtung des Zellkerns zurück (siehe Abbildung 15 A, Reihe 4). Nach Behandlung mit Apremilast fanden sich wieder vermehrt dicke Zytokeratinfilamente, die mit dem verbliebenen Dsg3 in Kontakt traten (siehe Abbildung 15 A, Reihe 5-6). Um diese Veränderung zu quantifizieren, wurden die Verbliebenen Filamente entlang der Zellmembran ausgezählt. Durch PV-IgG wurde die Anzahl der Filamente signifikant reduziert, Apremilast hemmte diese Reduktion und induzierte einen Zustand vergleichbar mit den Kontrollbedingungen (siehe Abbildung 15 B, C).

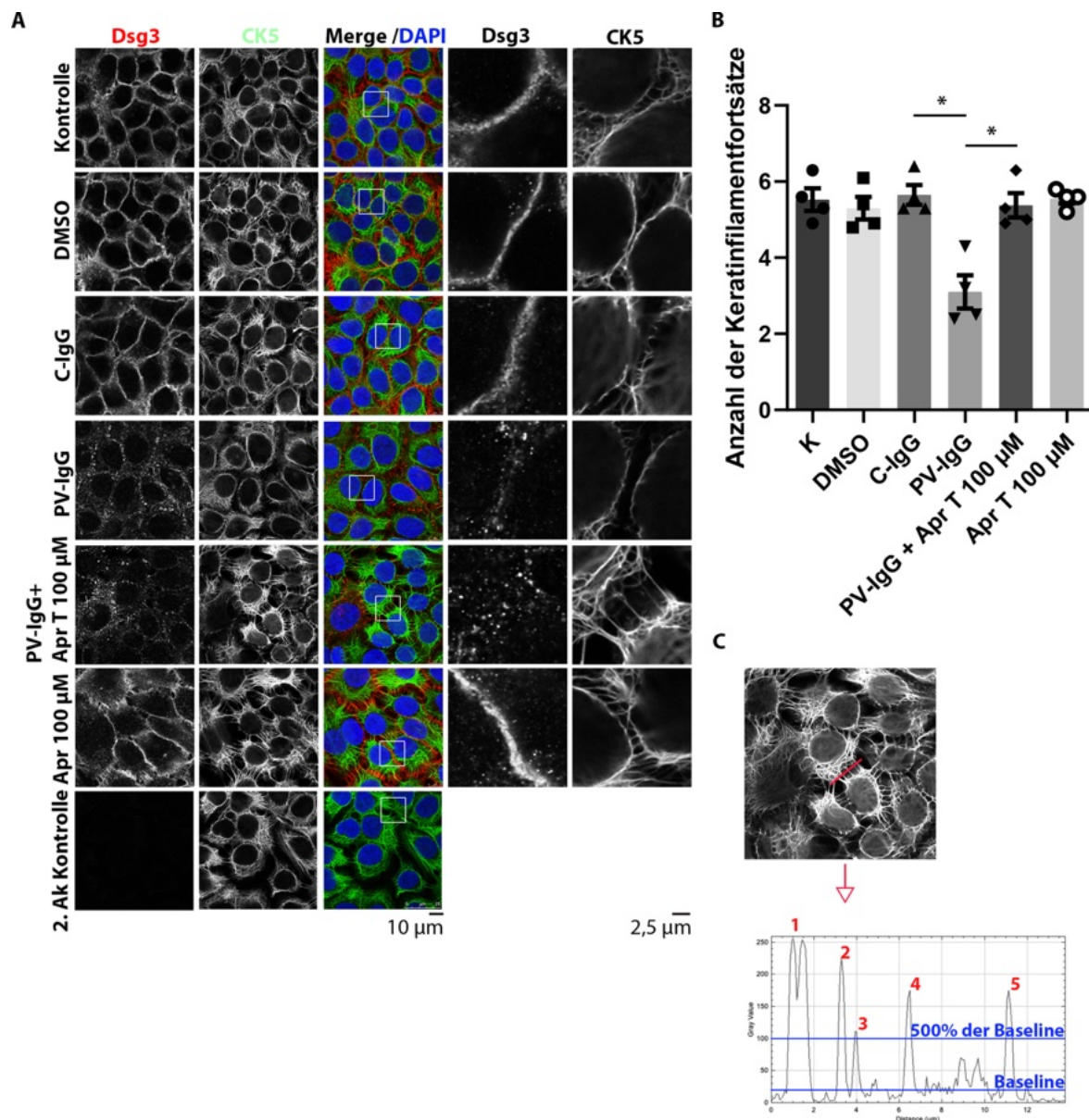


Abbildung 15: Apremilast beeinflusst die Keratinretraktion in Keratinfilament-überexprimierenden Zellen.

A Immunfluoreszenzfärbung gegen Dsg3 in CK5-YFP transfizierten HaCaT-Zellen (N = 4, Untersuchungen mit F/R: N = 2). Nach Behandlung mit PV-IgG finden sich weniger CK5-Filamente entlang der Zellmembran. Apremilast hemmt in CK5-YFP-exprimierenden Zellen die durch PV-IgG bedingte Keratinretraktion. **B** Quantifizierung aus (A). **C** Illustration der Quantifizierungen (B). Dargestellt ist der Mittelwert, die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. One-way ANOVA mit Bonferronikorrektur (B), * p < 0,05, modifiziert nach Sigmund et al., 2023.

Die beobachteten Veränderungen konnten durch Versuche von Dr. Desalegn Egu in elektronenmikroskopischen Bildern aus dem *ex vivo* Hautmodell bestätigt werden. Auch hier zeigte sich eine durch PV-IgG veränderte desmosomale Keratininsertion, die durch Apremilast signifikant gebessert werden konnte. Im selben Experiment fanden sich zudem PV-typische ultrastrukturelle Veränderungen wie eine reduzierte Desmosomengröße und -anzahl, welche

jedoch nicht von Apremilast beeinflusst werden konnten. Dafür konnte Apremilast die Spaltung von Desmosomen ebenfalls signifikant senken (Sigmund et al., 2023).

7.9. Plakoglobin wird durch eine cAMP-Spiegelerhöhung an Ser665 phosphoryliert.

Wie bereits beschrieben, wurde im Herzen ein neuer cAMP-abhängiger Mechanismus mit Auswirkungen auf die Zellhaftung entdeckt. Eine Pg-Phosphorylierung an Serin 665 wird mit gestärkter Zellhaftung und Reorganisation der Zellkontakte in Verbindung gebracht. Eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration um das ca. 50-fache mittels 1h Inkubation mit F/R führte zu einer Erhöhung der Dsg2-Einzelbindungsstärke um 10%. Es konnte gezeigt werden, dass diese Veränderungen vom Phosphorylierungsstatus von Pg an Serin 665 abhängig sind (Schinner et al., 2017).

Nach 2h Inkubation mit Apremilast fand sich auch in Keratinozyten eine signifikant erhöhte Phosphorylierung an Pg-S665 (siehe Abbildung 16 A, B).

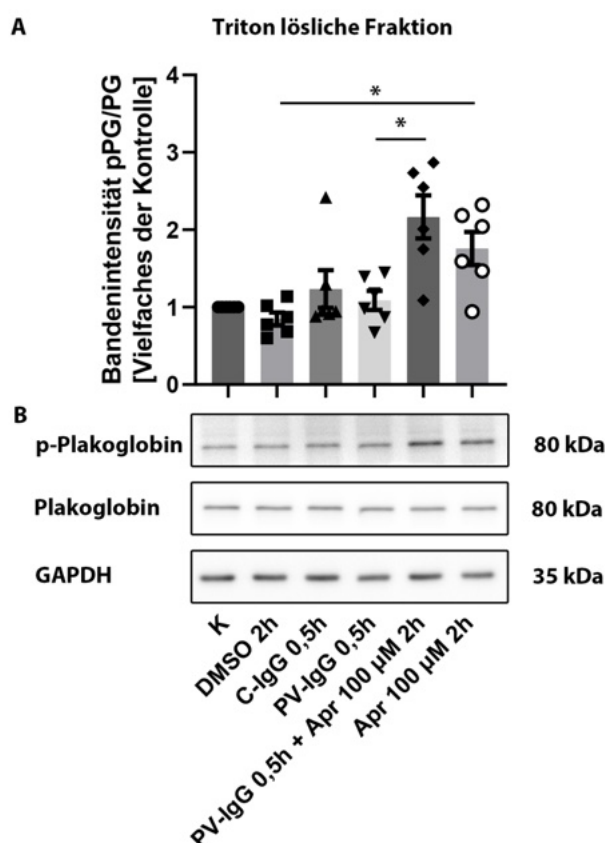


Abbildung 16: 2h Behandlung mit Apremilast führt zu einer Phosphorylierung von Pg an Serin 665.

B Repräsentativer Western Blot aus N = 6, Zellen wurden 2h mit Apremilast und 30 min. mit PV-IgG behandelt. **A** Quantifizierung von (B, N = 6). Dargestellt ist der Mittelwert, die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. One-way ANOVA mit Bonferronikorrektur (B), * p < 0,05, modifiziert nach Sigmund et al., 2023.

7.10. Rekonstruktion Plakoglobin-defizienter Zellen mit Plakoglobin-Wt und Plakoglobin-Mutante Ser665A

Um zu evaluieren, ob die Phosphorylierungsstelle an Pg ursächlich für die gestiegene Zelladhäsion sind, wurden Pg-defiziente Zellen (HaCaT *Jup*^{-/-}) stabil mit zwei verschiedenen Pg-Konstrukten (zur Verfügung gestellt von Marie-Therese Wanuske und Prof. Dr. Volker Spindler) transfiziert. Ein Konstrukt enthielt DNS von humanem Pg (Pg-Wt), versehen mit einem GFP-Tag, sowie je einem Resistenzgen gegen Kanamycin für die Selektion in prokaryotischen Zellen und einem für G418 für die Selektion in eukaryotischen Zellen. Im anderen Konstrukt wurde die Gensequenz für Pg so verändert, dass ein Serin an Stelle 665 durch Alanin ersetzt wurde, welches nicht phosphoryliert werden kann (Pg-S665A). So konnte der Einfluss der Phosphorylierung auf die Zellhaftung untersucht werden.

Pg-defiziente Zellen zeigen kein ansprechen auf PV-IgGs mehr (Caldelari et al., 2001). Dieses Ergebnis bestätigte sich im durchgeführten Keratinozytendissoziationsversuch mit Pg-defizienten Zellen, in welchen die Fragmentzahl drastisch erhöht ist. Nach Behandlung mit PV-IgGs kam es zu einem weiteren, nicht signifikanten Anstieg der Fragmentzahl von $156,8 \pm 79,4$ auf $186,7 \pm 118,4$. Zwar sank nach zusätzlicher Behandlung mit Apremilast die Fragmentzahl auf $83,6 \pm 33,6$ jedoch war diese Veränderung ebenfalls nicht signifikant (siehe Abbildung 17 A, D). In der Folge wurde das Experiment in den mit den verschiedenen Pg-Varianten rekonstruierten Zelllinien wiederholt. Hier zeigten sich in beiden Zellen keine signifikanten Unterschiede. Wider Erwarten konnte weder in den mit Wildtyp rekonstituierten noch in jenen mit phosphorylierungsdefizienter Mutante ein Effekt von Apremilast oder PV-IgG beobachtet werden (siehe Abbildung 17 B-D). Erklären ließe sich dies durch die über alle Konditionen hinweg größeren Fragmentzahlen, welche dafür sprechen, dass die Zellen funktionell nicht vollständig rekonstruiert werden konnten. Neben expressionsspezifischen Unterschieden könnte auch das C-terminal angehängte GFP-tag Proteininteraktionen und den Einbau in Desmosomen stören. Bemerkenswert ist die starke Wirkung des Lösungsmittels DMSO, welche die Fragmentzahl gegenüber der unbehandelten Kontrollbedingung deutlich absenkt. Ebenso auffallend waren jedoch auch die in den mit der phosphorylierungsdefizienten Pg-Mutante rekonstituierten Zellen höheren Fragmentzahlen im Vergleich zu den mit dem Pg-Wildtyp transfizierten.

Um diesen Effekt besser Beurteilung zu können, wurden in einem weiteren Experiment alle drei Zelllinien unter gleichen Bedingungen unbehandelt miteinander zu verglichen. In beiden

rekonstruierten Zelllinien entstanden bei immer noch sehr hoher Fragmentzahl signifikant weniger Fragmente als in der *Jup*-K.O. Linie. Zwar fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden transfizierten Zelllinien, dennoch wurde, auch unter Berücksichtigung der Einzelexperimente (veranschaulicht durch die Verbindungslinien in Abbildung 17 E) deutlich, dass mit Wt-Pg transfizierte Keratinozyten eine stärkere Zelladhäsion aufwiesen als die mit S665A-Pg transfizierten (siehe Abbildung 17 E,F).

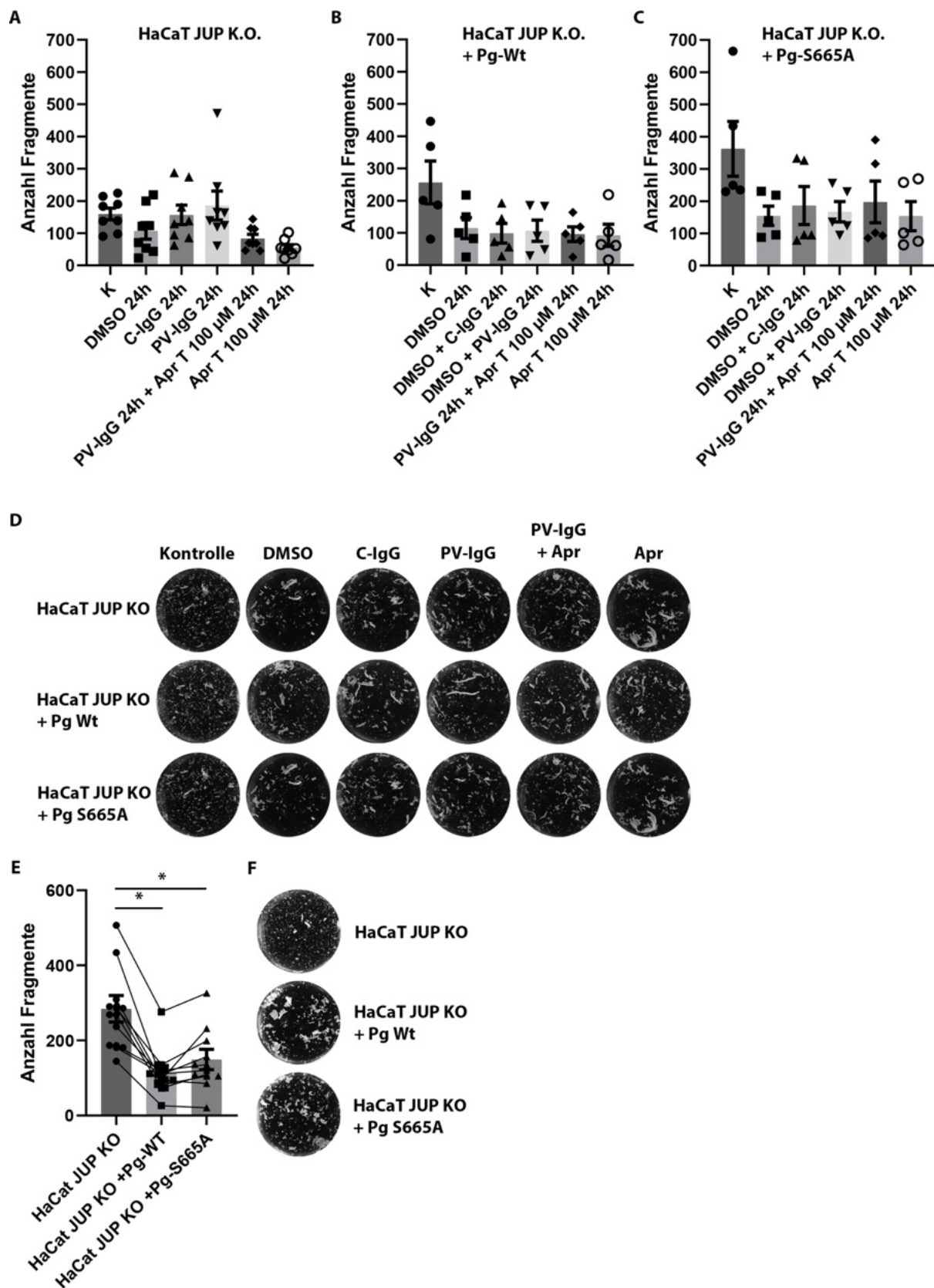


Abbildung 17: Pg-S665 beeinflusst die Zellhaftung der Keratinozyten.

A, B, C Keratinozytendissoziationsversuche verschiedener Zelllinien, jeweils mit 24h Inkubation von PV-IgG und Apremilast 100 µM. A Behandlung mit PV-IgG oder Apremilast führte in HaCaT Jup K.O.-Zellen zu keiner signifikanten Veränderung der Fragmentzahl (N = 8). B Sowohl in den mit Pg-Wt transfizierten Zellen also auch in den mit Pg-S665A transfizierten Zellen fand

sich ebenfalls keine Veränderungen der Fragmentzahlen (N = 5). **D** Repräsentative Bilder aus A, B und C. **E** Vergleich der oben untersuchten Zelllinien unter Kontrollbedingungen (N = 10). **F** Repräsentative Bilder aus E. Dargestellt ist der Mittelwert, die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. One-way ANOVA mit Bonferronikorrektur (A, B, C, E), * $p < 0,05$, modifiziert nach Sigmund et al., 2023.

7.11. Apremilast hemmt die PV-IgG-induzierte intraepidermale Spaltbildung im *ex vivo* Pemphigus-Hautmodell.

Um die Wirkung von Apremilast bei PV in humaner Haut überprüfen zu können, wurde das *ex vivo*-Hautmodell verwendet. Hierbei wird in ein Stück vitaler menschlicher Haut, der jeweils zu untersuchende Mediator und PV-IgG-Lösung injiziert und nach einer Inkubationszeit von 24 Std. ein definierter mechanischer Stress appliziert (Waschke et al., 2006). DMSO und Apremilast wurden direkt nach der Probenverarbeitung intradermal verabreicht. C-IgG und PV-IgG wurden 1h später ebenfalls intradermal verabreicht.

Die gewonnenen Hautproben wurden anschließend in Kryomedium aufgenommen, um für die Färbung weiterverarbeitet werden zu können. Ein zweiter Teil der Proben wurde für die elektronenmikroskopische Auswertung durch Dr. Desalegn Egu weiterverarbeitet.

Die Kryoschnitte wurden für die lichtmikroskopische Beurteilung mit H.E. gefärbt. Hier fanden sich nach Inkubation mit DMSO und PV-IgG langstreckige intraepidermale, suprabasale Blasen, wie sie bei PV typisch sind (siehe Abbildung 18 A). Daneben fanden sich einzeln stehende, der Basalmembran anhaftende Zellen, sogenannte „tomb-stone-cells“ (Bystryn and Grando, 2006). Nach Inkubation mit PV-IgG und Apremilast war hingegen keine Blasenbildung nachweisbar, sodass der protektive Effekt von Apremilast gegen den PV-IgG vermittelten Zellhaftungsverlust in humaner Haut bestätigt werden konnte. Um die beobachteten Effekte zu quantifizieren, wurde die Blasenlänge in drei unabhängigen Experimenten vermessen und der Mittelwert gebildet (siehe Abbildung 18 B).

Weitere Schnitte wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert. Hierbei wurden Dsg1, Dsg3, panCK, Pg und pPG analysiert. In den Färbungen für Dsg1 und Dsg3 zeigte sich unter Kontrollbedingungen die aus der Literatur bekannte Verteilung mit deutlicher Dsg1 Färbung im Stratum corneum, welche zu den basalen Schichten hin abnimmt. In umgekehrter Weise fand sich superfiziell wenig Dsg3, welches nach basal zunimmt. In der Mitte zeigte sich ein Bereich mit überlappender Färbung beider Desmogleine. In den mit PV-IgG behandelten Schnitten wurde die bekannte Dsg3-Depletion deutlich ersichtlich. Apremilast führte zu keiner Hemmung dieser. In der Dsg1-Färbung zeigte sich ebenfalls eine deutliche Umverteilung nach

Inkubation mit PV-IgG. In den beiden Färbungen gegen Dsg1 und Dsg3 wirkten die Zellgrenzen nach alleiniger Behandlung mit Apremilast jedoch homogener und dichter, sowie weniger aufgelockert. Dsg1 und Dsg3 kamen selektiver entlang der Zellmembran zur Darstellung, es fand sich weniger zytosolische Färbung als in den nicht mit Apremilast behandelten Konditionen (siehe Abbildung 18 C, Reihe 1-4).

In der Keratinfärbung stellte sich Keratin homogen gefärbt im Zytoplasma dar. Insgesamt ließen sich die Keratinfilamente methodenbedingt nicht in der gleichen Qualität wie im Zellkulturmodell anfärben. Nach Behandlung mit PV-IgG fand sich eine deutliche Schwächung der Zytokeratinfärbung. Nach Behandlung mit Apremilast stellte sich Keratin wieder vermehrt da (siehe Abbildung 18 C, Reihe 5-6).

p-Pg stellte sich in der Immunfärbung sowohl zytosolisch als auch an der Zellmembran und im Zellkern dar. Auffällig ist eine durch Apremilast bedingt vermehrte Färbung entlang der Zellgrenzen (siehe Abbildung 18 C, Reihe 7-8).

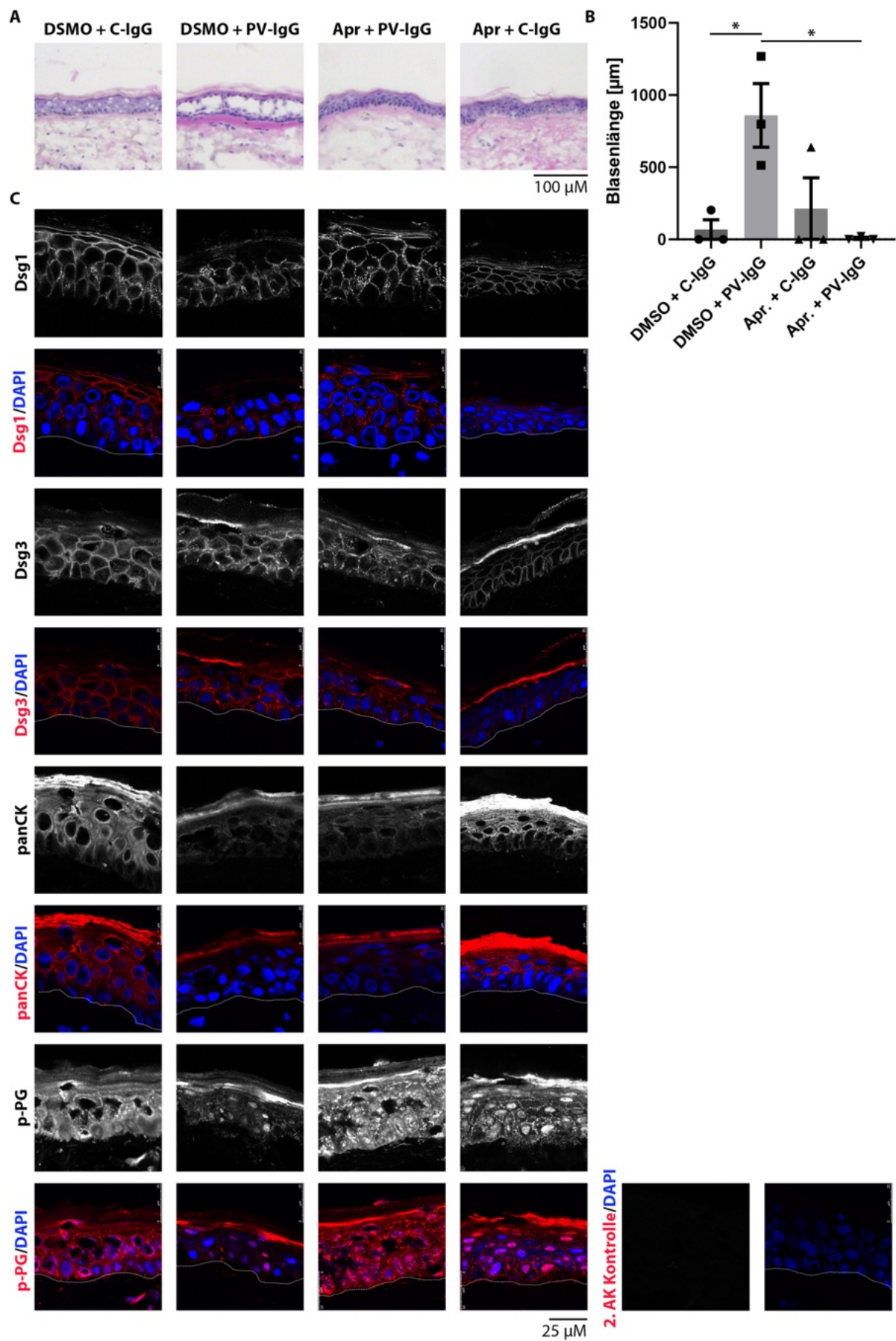


Abbildung 18: Apremilast wirkt protektiv im ex vivo Hautmodell.

A H.E.-gefärbte Kryoschnitte aus dem *ex vivo*-Modell zeigen eine Blasenbildung nach 24h Behandlung mit PV-IgG. Nach 1h Vorbehandlung mit Apremilast wurde die Blasenbildung gehemmt. **B** Quantifizierung von (A): Apremilast hemmt die Blasenbildung signifikant. **C** Immunfluoreszenzfärbung gegen Dsg1, Dsg3, pan-Cytokeratin, p-Pg. Die weiße Linie wurde eingefügt, um das Ende der Epidermisschicht zu markieren. Es wurde darauf geachtet blasenfreie Bereiche für die Immunfärbung auszuwählen. One-way ANOVA mit Bonferronikorrektur (B), * $p < 0,05$, modifiziert nach Sigmund et al., 2023.

Um die *ex vivo* gewonnene Beobachtung, dass Apremilast die Verteilung von p-Pg beeinflusst, zu überprüfen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen gegen p-Pg in HaCaT-Wildtyp Zellen durchgeführt. Hier zeigte sich, dass die Verteilung von p-Pg (S665) in den verschiedenen Kompartimenten der Zelle vom cAMP-Spiegel abhängig ist. So fand sich unter Kontrollbedingungen p-Pg vor allem im Zellkern, sowie zu geringeren Teilen zytoplasmatisch und an der Zellmembran. Nach Behandlung mit Apremilast in 10 μM oder 100 μM Dosierung hingegen lag p-Pg (S665) fast ausschließlich entlang der Zellmembran vor (siehe Abbildung 19).

Diese Ergebnisse konnten durch Frau Dr. Anna Sigmund mittels Biotinylierungsassay bestätigt werden. Auch hier zeigte sich nach Behandlung mit Apremilast in 10 μM Dosierung p-Pg (S665) in der Zellmembranfraktion gegenüber der unbehandelten Probe (Sigmund et al., 2023).

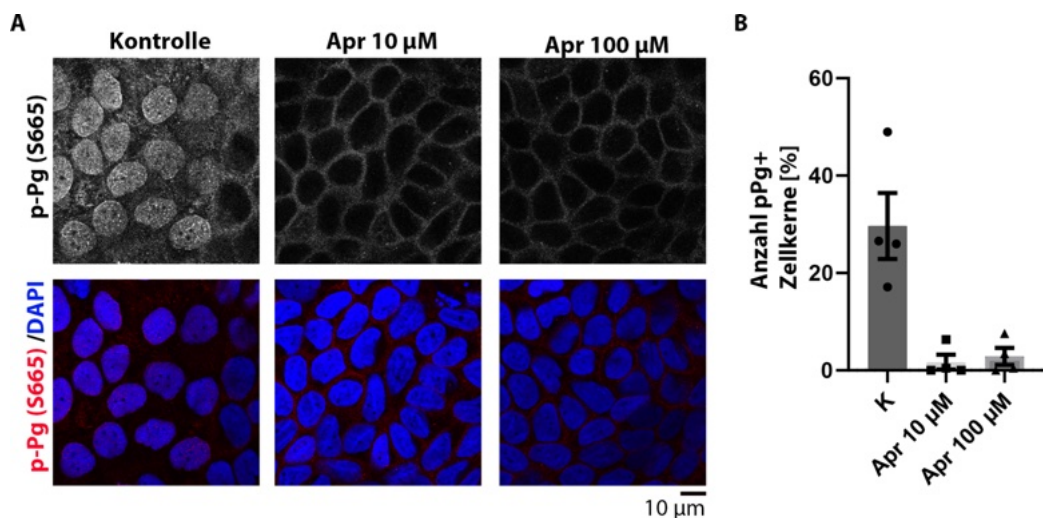


Abbildung 19: Lokalisation von Pg nach Behandlung mit Apremilast.

A In der Immunfluoreszenzfärbung gegen p-Pg (S665) in HaCaT Wildtyp Zellen zeigt sich eine deutliche Färbung von p-Pg im Zellkern, während es sich nach Behandlung mit Apremilast vermehrt an der Zellmembran und nicht im Kern darstellt. Repräsentative Bilder aus $N = 4$. **B** Quantifizierung aus (A). Dargestellt ist der Mittelwert, die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. One-way ANOVA mit Bonferronikorrektur (B), * $p < 0,05$, modifiziert nach Sigmund et al., 2023.

7.12. Ein erhöhter cAMP-Spiegel hemmt die Zellmigration in humanen Keratinozyten.

Um den Einfluss von cAMP auf Zellwachstum und Migration zu untersuchen, wurden Migrationsversuche durchgeführt.

Nach Elevation des cAMP-Spiegel mittels F/R oder Apremilast zeigte sich ein signifikanter, deutlich verlangsamer Verschluss der Wundfläche gegenüber der entsprechenden Kontrolle (DMSO für Apr, K für F/R). Da die Behandlung mit dem β -Agonisten Isoprenalin deutlich Effekte auf Keratinozytenadhäsion *in vitro* zeigte (Spindler et al., 2010), war es von Interesse, ob dem entgegengestellte ein Blockade des β -Rezeptors ebenfalls einen Effekt zeigen würde. Die Behandlung mit dem nicht-selektiven β -Blocker Propranolol zeigte jedoch keinen Einfluss auf die Migration der Keratinozyten (siehe Abbildung 20, A, B).

Da das Experiment den Einfluss von Proliferation auf den Verschluss der Wundränder ausschließt, ist es nicht möglich, zwischen Migration und Proliferation zu unterscheiden. Um dies genauer untersuchen zu können, sollten weitere Untersuchungen bezüglich des Einflusses von Apremilast und F/R auf Zellproliferation und Migration erfolgen.

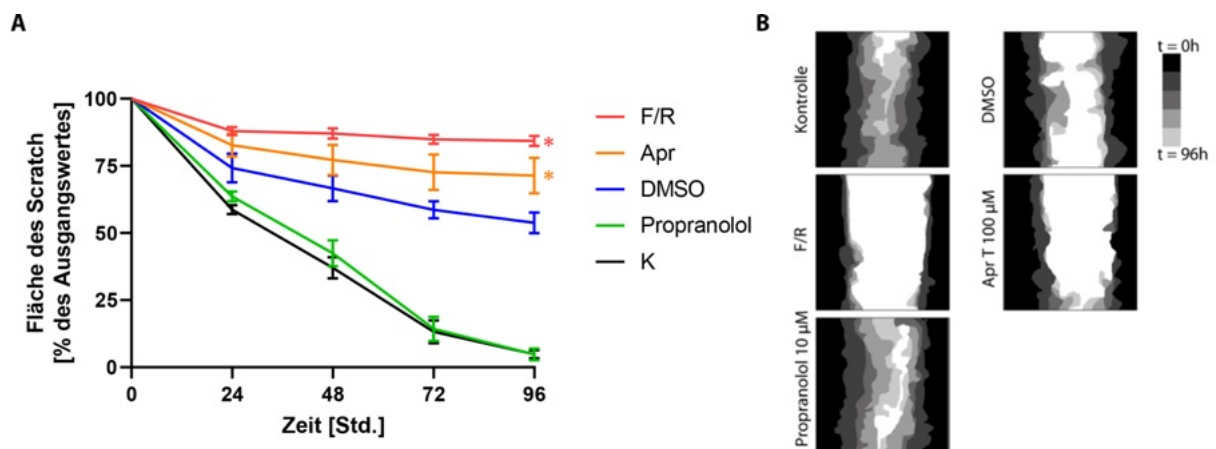


Abbildung 20: Auswirkungen des cAMP-Spiegels auf Zellmigration/-proliferation.

A, B Im Migrationsversuch zeigten HaCaT-Zellen eine Verlangsamung von Zellmigration. **B** Repräsentative Veranschaulichung der Migration. Dargestellt ist der Mittelwert, die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. One-way ANOVA mit Bonferronikorrektur (B), Vergleich F/R mit K und Apr mit DMSO, * $p < 0,05$.

8. Diskussion

8.1. Der dosisabhängige Einfluss von cAMP auf die Keratinozytenadhäsion

Abgeleitet von der Beobachtung, dass cAMP in anderen Epithelgeweben die Barriereigenschaften von Haftproteinen u.A. über eine Regulation von VE-Cadherin durch cAMP, Epac und Rac1 beeinflusst (Schlegel and Waschke, 2014, Michel and Curry, 1999), geriet auch der Einfluss von cAMP auf desmosomale Cadherine ins Interesse der Pemphigusforschung. 2010 konnte gezeigt werden, dass eine ca. 1,5-fache cAMP-Erhöhung in Keratinozyten nach Bindung von PV-IgGs einen zellinternen Rettungsmechanismus darstellen könnte und eine pharmakologische Verstärkung jener cAMP-Erhöhung um das 9-fache des Ausgangswertes protektiv gegen den durch PV-IgGs verursachten Zellhaftungsverlust wirkt (Spindler et al., 2010). Die verwendeten Mediatoren sind jedoch im Menschen aufgrund ihrer gravierenden Nebenwirkungen nicht anwendbar (Spindler et al., 2010, Vielmuth, 2014). Mit der Zulassung des Phosphodiesterasehemmers Apremilast als Therapeutikum für die Psoriasis- und Behçet-Erkrankung ergab sich daher die Fragestellung nach der Anwendbarkeit bei Pemphigus vulgaris, die in dieser Dissertation erörtert werden sollte (Gottlieb et al., 2008, Hatemi et al., 2015). Neben den immunmodulatorischen Effekten von Apremilast konnte gezeigt werden, dass Apremilast auch eine direkte Wirkung auf die Keratinozyten selbst hat und in selbigen den cAMP-Spiegel um das ca. 2,7-fache erhöht (siehe Abbildung 5). Diese cAMP-Spiegelerhöhung führt zu einer Stärkung der Zellhaftung und konnte in verschiedenen Experimenten einem durch PV-IgGs verursachten Zellhaftungsverlust entgegenwirken. Neben den hier gezeigten *in vitro*-Daten aus den Keratinozytendissoziationsversuchen, sowie Immunfluoreszenzaufnahmen und dem *ex vivo*-Hautmodell (siehe Abbildung 9, Abbildung 10, Abbildung 18) bestätigte sich dieser Eindruck auch in von Frau Dr. Sophia Engelmayer durchgeführten *in vitro*-Experimenten in primären human Keratinozyten sowie im von Frau Dr. Anna Sigmund durchgeführten *in vivo* Mausmodell (Sigmund et al., 2023).

Während sich in der Arbeit von 2010 eine Hemmung der in der PV-Pathogenese bekannten Dsg3-Depletion durch Erhöhung des cAMP-Spiegels um das ca. 9-fache nachweisen ließ (Spindler et al., 2010), scheint eine cAMP-Spiegelerhöhung durch Apremilast entgegen der Erwartungen die Dsg3-Depletion nicht zu beeinflussen (siehe Abbildung 10). Auch die in diesem Zusammenhang beschriebene Hemmung der durch PV-IgG aktivierten p38MAPK konnte durch Apremilast nicht gezeigt werden (siehe Abbildung 7 und Abbildung 9). Als Grund

hierfür kann in erster Linie der deutlich geringere Anstieg des cAMP-Spiegel herangeführt werden. So scheint es plausibel, dass der nur etwa 1/3 so starke Effekt von Apremilast Signalwege auf andere Art und Weise beeinflusst als F/R oder Isoproterenol. Gerade vor dem Hintergrund der häufig beschriebenen Kompartimentalisierung der durch cAMP regulierten Signalwege ist es schwierig, genaue Vorhersagen über den Einfluss einzelner beteiligter Signalwege anhand des gesamt-zytosolischen cAMP-Spiegels zu treffen (Houslay and Adams, 2003). Die gemessene geringere Konzentrationserhöhung des cAMP-Spiegels könnte auch Ausdruck dessen sein, dass lediglich in bestimmten Bereichen der Zelle eine Veränderung des cAMP-Spiegels stattfand. Während F/R sowohl Adenylatzyklase als auch Phosphodiesterase in synergistischer Weise beeinflusst, hemmt Apremilast lediglich letztere. 2018 wurde zudem in einer Arbeit erläutert, dass Keratinretraktion und Dsg3-Depletion zwei unabhängig voneinander ablaufende Prozesse in der Pathogenese von Pemphigus darstellen (Schlogl et al., 2018), was gut zu den dosisabhängigen Effekten von Apremilast oder der Kompartimentalisierung der cAMP-Signalwege passt. Auch die schwierige Beurteilung der p38MAPK-Aktivierung in der Western Blot-Analyse könnte ein Hindernis bei der Bestimmung der genauen Mechanismen sein. Die p38MAPK ist an zahlreichen Entwicklungsschritten beteiligt und der Differenzierungsfortschritt der Zelle beeinflusst die Signalaktivität deutlich, wie auch umweltbedingte Stressreize wie UV-Strahlung oder Temperaturschwankungen (Raingeaud et al., 1995). Generell ist die Aktivität von Signalwegen anhand von Phosphorylierungen mittels spezifischer Antikörper schwierig zu detektieren und empfindlich für äußere Einflüsse. Möglicherweise finden daher auch Signalwegsalterationen unterhalb der Nachweisgrenze der Western Blot-Analyse statt.

8.2. Apremilast hemmt die PV-IgG-induzierte Keratinretraktion

Apremilast konnte *in vitro* in humanen Keratinozyten die PV-IgG-vermittelte Retraktion des Keratinzytoskeletts hemmen. Mit Apremilast behandelte Zellen zeigten zum einen eine Reduktion des Abstandes der Zytokeratinringe. Zum anderen konnte mittels Bestimmung des Kolokalisationskoeffizienten von Dsg3- und Zytokeratinfärbung nachgewiesen werden, dass PV-IgG einerseits zu einer Abnahme der Kolokalisation führt, andererseits Apremilast diesen Effekt hemmt (siehe Abbildung 14). Außerdem verhinderte Apremilast in CK5-überexprimierenden Zellen die Abnahme der Anzahl der Keratinfilamente nach Inkubation mit PV-IgG (siehe Abbildung 15).

Die bei Pemphigus beschriebene Keratinretraktion korreliert zeitlich mit dem Zellhaftungsverlust in vitro und in vivo. Keratinretraktion und Dsg3-Internalisierung sind dabei unabhängige Phänomene, die Dsg3-Kondensation an der Membran ist wiederum mit der Keratinretraktion vergesellschaftet (Schlogl et al., 2018). Eine Hemmung der Keratinretraktion z.B. via p38MAPK oder des EGFR-Signalwegs war schon zuvor als protektiv gegen einen Zellhaftungsverlust beschrieben worden (Berkowitz et al., 2005, Berkowitz et al., 2006, Bektas et al., 2013).

Die Hemmung der Keratinretraktion konnte in dieser Arbeit jedoch nicht eindeutig mit der Aktivität der p38MAPK in Verbindungen gebracht werden. F/R, nicht jedoch Apremilast, führt zu einer cAMP-Spiegelerhöhung, die zu einer Hemmung der p38MAPK führt (Spindler et al., 2010), (Siehe Abbildung 9). Daher ergab sich die Frage nach anderweitigen Mechanismen, die den deutlichen Effekt von Apremilast auf die funktionelle Zellhaftung und die beobachteten Veränderungen im Zytoskelett erklären könnten.

8.3. Phosphorylierung an Plakoglobin-Serin 665 stärkt die Zelladhäsion von Keratinozyten

Die Anbindung der Keratinfilamente an die Desmosomen erfolgt über Proteine aus der desmosomalen Plaque. Die Zusammensetzung und die Stärke einzelner Proteininteraktionen der desmosomalen Plaque wie auch die Cadherinbindung selbst können über eine Reihe von posttranslationalen Modifikationen gesteuert werden. Dazu gehören z.B. EGFR- oder PKC α -abhängige Phosphorylierungen (Gaudry et al., 2001, Hu et al., 2001, Miravet et al., 2003, Yin et al., 2005a, Dehner et al., 2014, Kitajima et al., 1999). Daneben wird die intrazelluläre Lokalisation von Pg und β -Catenin ebenfalls über posttranslationale Modifikationen gesteuert und beeinflusst so nicht nur die desmosomale Plaque, sondern auch Zellsignalwege und Proteinexpression (Zhurinsky et al., 2000, Hu et al., 2003).

Vor dem Hintergrund des Phänomens sogenannter „positiver Adhäsotropie“ im Herzen, rückte eine neu beschriebene Phosphorylierungsstelle von Pg in den Fokus. Hier konnte gezeigt werden, dass eine cAMP-Spiegelerhöhung mittels Forskolin/Rolipram oder Isoprenalin (β -Rezeptoragonist) zu einer Phosphorylierung von Pg an Serin 655 führt und bereits nach einer Stunde positive Auswirkungen auf die Bindeeigenschaften von Dsg2 im AFM-Versuch hat (Schinner et al., 2017).

Auch in Keratinozyten ließ sich *in vitro* und *ex vivo* eine Phosphorylierung an S665 durch eine cAMP-Spiegelerhöhung mittels Apremilast nachweisen. PV-IgGs alleine wiederum führten zu keiner Veränderung von pPG (Siehe Abbildung 16). Parallel konnte Apremilast dem durch PV-IgG ausgelösten Zellhaftungsverlust *in vitro*, *in vivo* und *ex vivo* entgegenwirken (siehe Abbildung 6, Abbildung 7, Abbildung 9 und Abbildung 18, (Sigmund et al., 2023)). Sowohl in den hier gezeigten Daten für Dsg3 (siehe Abbildung 11) als auch in von Frau Letyfee Steinert durchgeführten AFM-Experimenten mit Dsg1 konnte jedoch keine Stärkung der Cadherinbindungen nachgewiesen werden (Sigmund et al., 2023).

In Fortsetzung der hier gezeigten Daten wurden mittels Mausmodell mit selbiger phosphodefizienten Mutante deren Auswirkungen weiter untersucht. Es fanden sich deutliche Veränderungen der desmosomalen Proteinexpression, die mutanten Mäuse entwickelten nach mechanischer Belastung der Haut Blasen und aus der Maushaut generierte Zelllinien waren deutlich kleiner als die der Wildtypmäuse (Sigmund et al., 2023). Im Gegensatz zu den Wildtyp-Zellen zeigten die phosphodefizienten Zellen im Keratinozytendissoziationsversuch kein Ansprechen auf AK23 oder Apremilast mehr und wiesen insgesamt eine deutlich reduzierte Zelladhäsion auf. Vor allem aber fanden sich auch in der Haut der S665A-Mäuse drastische Veränderungen des Keratinozytoskeletts (Sigmund et al., 2023).

Welche Mechanismen genau hinter den bei Pemphigus zu beobachtenden ultrastrukturellen Veränderungen der Desmosomen (Größe und Anzahl, Auftreten von Spaltdesmomen und veränderte Keratininsertion) stehen, ist bis heute nicht vollständig geklärt (Stahley et al., 2016, Sokol et al., 2015, van der Wier et al., 2014, Egu et al., 2017, Saito et al., 2012, Schmitt and Waschke, 2021). In dieser Arbeit und in den Untersuchungen von Dr. Desalegn Egu konnte eine Erhöhung des cAMP-Spiegels mit Veränderungen der Keratininsertion in Verbindungen gebracht werden, ohne dass Veränderungen der p38MAPK-Aktivität beobachtet wurden. Jedoch fand sich die bereits im Herzen beschriebene Pg-Phosphorylierung. Posttranslationale Modifikationen und im speziellen die beschriebene Phosphorylierung der Plaqueproteins Pg scheinen daher maßgeblich zur Regulation der zytoskelettalen Verankerung der Desmosomen beizutragen (Vielmuth et al., 2023). In umgekehrter Weise wirkt beispielsweise eine PKC-vermittelte Phosphorylierung von Dp an S2849 negativ auf die Dp-Keratin-Interaktion (Hobbs and Green, 2012, Dehner et al., 2014).

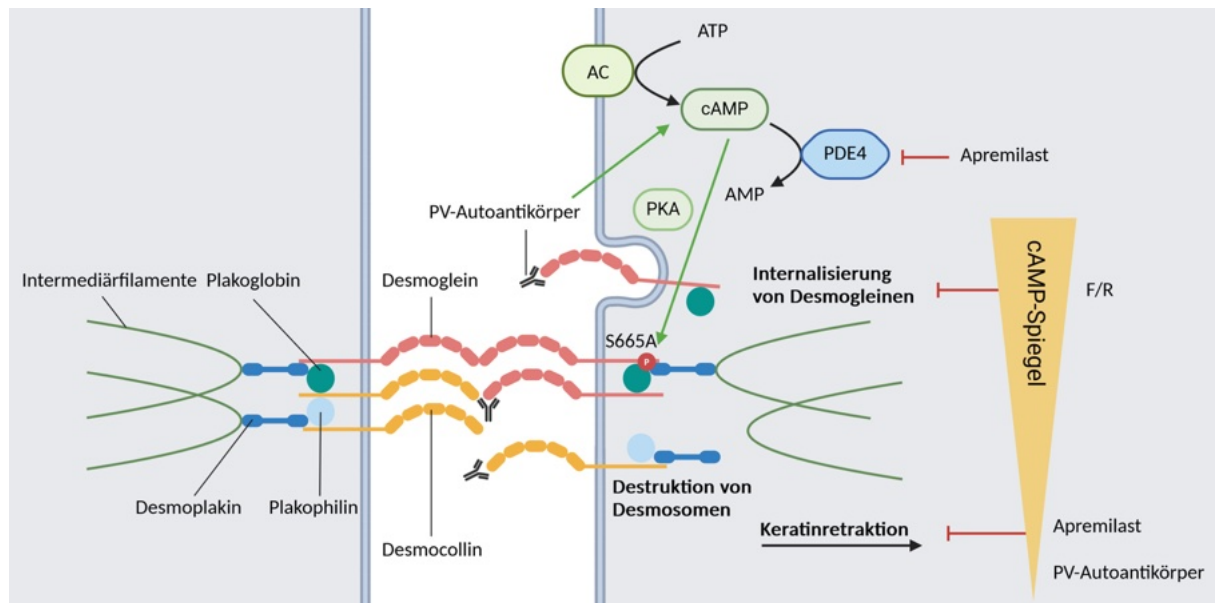


Abbildung 21: Übersicht der Wirkung von Apremilast auf die Zelladhäsion.

Eine cAMP-Spiegelerhöhung hemmt dosisabhängig verschiedene Schritte in der Pemphiguspathogenese. Eine Erhöhung um ca. 9-fache konnte die Dsg3-Depletion p38MAPK-abhängig hemmen. Eine schwächere cAMP-Spiegelerhöhung um das ca. 2,7-fache konnte die Dsg3-Depletion nicht hemmen, führte aber zu einer Hemmung der Keratinretraktion. Parallel dazu wurde eine Phosphorylierung von Pg an Serin 665 beobachtet. Modifiziert nach Waschke and Spindler, 2014 und Sigmund et al., 2023, mit BioRender.com erstellt.

8.4. Die Rolle von Plakoglobin bei Pemphigus

Frühere Untersuchungen beschrieben bereits eine zentrale Rolle von Pg in der Pathogenese von Pemphigus. So konnte gezeigt werden, dass die Depletion der Hauptproteine von Desmosomen, die Keratinretraktion und der Zellhaftungsverlust Plakoglobin-abhängige Prozesse sind (Caldelari et al., 2001, de Bruin et al., 2007). Über seine Funktion als Regulator des Tcf/LEF-Signalwegs (engl.: „T-cell-factor/lymphoid enhancer factor“) hemmt Pg unter anderem die Expression von c-Myc (Pelengaris et al., 1999). C-Myc wiederum fördert die Proliferation von Keratinozyten und dessen Expression wird mit zunehmender Ausdifferenzierung der Keratinozyten und Stärkung der Zell-Zell-Kontakte gehemmt (Kolly et al., 2005). Der Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweg (PI3K) und die Glykogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK3 β) führen zur Ubiquitylierung von Pg und somit zu dessen proteolytischen Abbau und nehmen so indirekt Einfluss auf die c-Myc-Expression (Calautti et al., 2005, Williamson et al., 2006).

Bei PV und nach Behandlung mit AK23, nicht jedoch bei PF oder anderen bullösen Autoimmundermatosen konnte eine Hochregulation von c-Myc beobachtet werden. Begleitend war die Zahl an Ki67 in den basalen Zellschichten diffus hochreguliert, ein typisches

Zeichen hyperproliferativer Epidermis, welches sich z.B. bei Psoriasis finden lässt (Williamson et al., 2006, Williamson et al., 2007a, Williamson et al., 2007b, Schulze et al., 2012). Eine Hemmung von c-Myc oder GSK3 β konnte im neonatalen Pemphigus-Mausmodell Blasenbildung unterdrücken (Williamson et al., 2006).

In einer Arbeit mit Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass cAMP ein positiver Regulator von c-Myc-mRNA-Spiegeln ist, wenn diese durch andere Wachstumssignale wie z.B. EGFR stimuliert wurden (Ran et al., 1986). In B-Zell-Lymphom-Zellen zeigte sich hingegen eine deutliche Suppression der c-Myc-Expression nach Elevation des cAMP-Spiegels mit F/R. Gleichzeitig fördert erhöhtes c-Myc die Expression der PDE4 (Ethiraj et al., 2022, Nam et al., 2019). Die vorliegenden Ergebnisse zum Einfluss von cAMP auf Pg und dessen Phosphorylierung, sowie Translokation in den Zellkern geben daher Anlass zu weiteren Untersuchungen bezüglich der Wechselwirkungen zwischen Pg, cAMP-abhängigem Signalling und dem Einfluss von PV-IgGs auf Veränderungen im Differenzierungsprozess von Keratinozyten.

8.5. Ursachen der cAMP-Spiegelerhöhung bei Pemphigus und ihre Auswirkungen auf die Zelladhäsion

Von weiterem Interesse für die Forschung an Desmosomen und im speziellen bei PV ist zudem, Erklärungen für die genauen Mechanismen zwischen Antikörperbindung an desmosomale Cadherine und Signalwegsalterationen und im speziellen von cAMP-vermittelten-Signalwegen zu finden.

Interessanterweise führte die in dieser Untersuchung verwendete PV-IgG-Fraktion weder zu einer Aktivierung der p38MAPK noch zu einer signifikanten Elevation des cAMP-Spiegels (siehe Abbildung 5, C, Abbildung 9, E-H), welche für andere PV-IgG gezeigt werden konnte (Spindler et al., 2010). Dennoch wirkte die pharmakologische Elevation des cAMP-Spiegels protektiv gegen den Zellhaftungsverlust. In einer Nachfolgearbeit von diesem Projekt konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung des cAMP-Spiegels sowohl abhängig von der individuellen Zusammensetzung der PV-Autoantikörperfraktion als auch abhängig von der Expression von Dsg3 ist (Engelmayer, 2024).

Die bereits zuvor beschriebene Kompartimentalisierung von cAMP könnte hierbei eine große Rolle spielen. Die Konzentration von Effektoren und Signalwegsenzymen in unmittelbarer Nähe, z.B. an Zellstrukturproteine zu sogenannten „Signalosomen“ gebunden, erlaubt eine

auf subzelluläre Kompartimente beschränkte Kommunikation mittels löslicher Moleküle (Fertig and Baillie, 2018, Hayes and Brunton, 1982, Conti et al., 2014). Im Falle von cAMP-Signalwegen sind das Enzyme aus der Gruppe der Phosphodiesterasen und der Adenylatcyclasen, welche wiederum selbst in ihrer Aktivität, z.B. durch die auch bei Pemphigus wichtigen Kinasen ERK und PKC α , komplex reguliert werden (Taskén and Aandahl, 2004, Egu et al., 2019). Deren Lokalisation ist über die vielen Interaktionsmöglichkeiten der Signalmoleküle und desmosomalen Plaqueproteine selbst oder über Bindeproteine (AKAPs) weitreichend beschrieben und kann auch gegensätzliche Effekte einer cAMP-Spiegelerhöhung in derselben Zelle erklären (Houslay and Adams, 2003, Vielmuth et al., 2023).

Wie schon in den Untersuchungen zu F/R waren auch die nach Apremilast auftretenden Veränderungen abhängig von der Aktivität der PKA. Durch zusätzliche Hemmung der PKA mit H89 verlor Apremilast seinen protektiven Effekt auf den PV-IgG-induzierten Zellhaftungsverlust (Spindler et al., 2010, Sigmund et al., 2023). Dazu passend waren auch die im Herzen beobachteten Effekte auf Dsg2 PKA-abhängig (Schinner et al., 2017).

Spannend ist in diesem Zusammenhang auch die große Variabilität der Antigene, die sich in den IgG-Fractionen von PemphiguspatientInnen finden lassen. So wurden unter anderem pathogene, im Mausmodell Akantholyse-induzierende Antikörper gegen G-Protein-gekoppelte Azetylcholinrezeptoren gefunden (Grando, 2000). Jedoch konnte auch für monoklonale Antikörper gegen Dsg3 wie zum Beispiel AK23 gezeigt werden, dass sie Signalwege beeinflussen. Besonders interessant ist hierbei auch die Beobachtung, dass in einem Experiment nur IgG-Fractionen von mukösen oder mukokutanen PemphiguspatientInnen, also jene, welche auch Antikörper gegen Dsg3 enthielten, den cAMP-Spiegel erhöhten. AK23 hingegen führte zu keiner Erhöhung des cAMP-Spiegels (Walter et al., 2017).

Die besondere Rolle von Plaqueproteinen, die über ihre Funktion als Strukturproteinen hinaus selbst Effektoren von Signalwegen und an der Bildung von Signalosomen beteiligt sind, wurde hinreichend beschrieben (Caldelari et al., 2001, Zhurinsky et al., 2000, Spindler et al., 2014). Die in dieser Arbeit beschriebenen Auswirkungen einer cAMP-Spiegelerhöhung auf das Zytoskelett und die Phosphorylierung von Pg samt Translokation zwischen Zellkern und Membran fügt sich dabei gut in das beschriebene Bild ein. Weitere Untersuchungen bezüglich der Lokalisation und Interaktion der beteiligten Signalmoleküle im physiologischen Zustand

und von durch PV-Antikörpern hervorgerufene Veränderungen stellen spannende Fragestellung für Folgeprojekte dar.

8.6. Apremilast als Therapieoption bei Pemphigus

Seit Einführung der Immunsuppressiva, im Besonderen der Cortisonderivate, konnte die anfangs drastische Mortalität von Pemphigus deutlich gesenkt werden (Fritsch, 2009). Gleichzeitig geht die dauerhafte Einnahme von Immunsuppressiva mit zum Teil erheblichen Nebenwirkungen einher. Dennoch stellen präzisere Immunsuppressiva weiterhin den bisher einzigen kausalen Therapieansatz bei Autoantikörper-vermittelten Autoimmunerkrankungen wie Pemphigus dar. Eine gezielte B-Zell-Depletion, wie sie schon heute dank Rituximab und dessen Weiterentwicklungen durchgeführt wird, verspricht für einen Großteil der PatientInnen Remission (Joly et al., 2017). Neuere Entwicklungen werden versuchen, nur die pathogenen, autoantikörperproduzierenden Zellen oder ihre Aktivatoren aus dem Pool der T-Zellen zu depletieren (Ellebrecht et al., 2016, Pollmann et al., 2018). Dennoch erreichen nicht alle PatientInnen Remission und der zeitliche Abstand bis zum Einsetzen einer adäquaten immunsuppressiven Therapie wird von starken Nebenwirkungen begleitet. In beiden Fällen könnte die topische oder systemische Anwendung von Apremilast klinisch vorteilhaft sein. Bezüglich der potenziellen Symptomlinderung gilt es besonders in Betracht zu ziehen, dass Apremilast auch nach dem Binden von PV-IgG an desmosomale Proteine wirkt und daher auch während verstärkter Krankheitsaktivität Abhilfe verschaffen könnte.

Zusätzlich unterstützt wird dies durch die Beschreibung eines ersten positiven Fallberichts einer 62-jährigen an chronischem, nicht-responsiven PV erkrankten Patientin. Die 2015 erstmalig diagnostizierte Patientin war zuvor ohne Erfolg mit Azathioprin, Mycophenolat-Mofetil, Dapsone und intravenösen Immunglobulinen, sowie mehrfach versuchter Dosisreduktion systemischer Glucocorticoide unter 20 bis 30 mg und einer versuchten Kombitherapie mit Rituximab, Mycophenolat-Mofetil und Prednison behandelt worden (Meier et al., 2020). Mangels weiterer klinisch erprobter Alternativen und aufgrund vielversprechender präklinischer Daten von PDE4-Inhibition bei Autoantikörper-vermittelten Immunerkrankungen (Koga et al., 2016) und der Daten zum protektiven Effekt von cAMP bei PV (Spindler et al., 2010) wurde ein Behandlungsversuch mit Apremilast begonnen. Die Gabe von 2x 30 mg Apremilast erfolgte in Kombination mit 20 mg Prednison (Ausschleichschema auf 7,5 mg in Woche 32) und 2 mg Mycophenolat-Mofetil (Meier et al., 2020). Die Autoren

der Studie haben in diesem Zusammenhang die aus der Zulassungsstudie bekannten Effekte auf das Immunsystem untersucht. Sie konnten nach 32-wöchiger Behandlung neben einer auffälligen klinischen Verbesserung, die sich auch im ABSI-Score widerspiegelte, einen Abfall der PV-IgG-Titer sowie eine Hochregulation regulatorischer T-Zellen nachweisen (Meier et al., 2020). Gerade die lange Vorgeschichte immunsuppressiver Therapien mit ausbleibendem Erfolg jedoch zeigt, dass auch ein direkter Einfluss auf die Zellhaftung zum Therapieerfolg beigetragen haben könnte.

In Zusammenschau von in unserer Studie präsentierten, präklinischen, vom Immunsystem unabhängigen Daten und dem zuletzt berichteten klinischen Erfolg aus dem Fallbericht, sowie den zwei voneinander unabhängigen Erklärungsansätzen für den Behandlungserfolg, sollte die Wirkung von Apremilast bei PV weiter untersucht werden, um das Medikament ggf. einem größeren Patientenkollektiv zuführen zu können.

8.7. Der Einfluss von cAMP auf den Zellzyklus und Gewebedifferenzierung

Die Ergebnisse aus dem Wundheilungsversuch zeigen, dass cAMP auch an der Regulation von Migrationsprozessen beteiligt ist (siehe Abbildung 20). Da dafür eine präzise Steuerung der Zellhaftung von Nöten ist, um so zu ermöglichen, dass sich Zellen aus bestehenden Verbänden lösen, sind auch Zellkontakte hierbei von entscheidender Bedeutung. Cadherine und Desmosomen dienen neben ihrer Funktion als Haftproteine auch als Mechanosensoren und registrieren so ihre Umwelt (Muller et al., 2008, Waschke and Spindler, 2014). Im klinischen Kontext sind diese Prozesse bei Wundheilungsprozessen und Entzündungsgeschehen, aber auch bei invasivem Wachstum und Metastasierung von großem Interesse. Für Dsg3 und die p38MAPK konnte gezeigt werden, dass sie die Migration von Keratinozyten und Wundheilung beeinflussen (Rötzer et al., 2016). Auch andere bei Pemphigus relevante Signalwege wie PKC und EGFR sind über die Steuerung der Adhäsivität der Desmosomen an der Regulation von Wundheilungsprozessen beteiligt (Thomason et al., 2012, Lambert et al., 2010). Der Einfluss von cAMP auf Zellteilung und Migration ist abhängig vom Entwicklungsstatus der Zellen, sodass cAMP je nach dem Zellproliferation hemmen oder fördern kann (Stork and Schmitt, 2002).

Die zuvor beschriebenen Signalprozesse um Pg, β -Catenin und c-Myc zeigen, dass Pg an diesen Prozessen beteiligt sein könnte. Pg steuert unter anderem die Integration von Umweltreizen und Pg-defiziente Zellen können eine Reihe von Signalwegen nicht mehr integrieren und

hyperproliferieren, umgekehrt führt Überexpression zu gehemmter Proliferation und Apoptose. β -Catenin hingegen fördert die Zellproliferation und Tumorentwicklung. Auf diese Weise wirken beide Proteine in gegensätzlicher Weise auf die Zellproliferation (Yin et al., 2005b, Yin et al., 2005a, Williamson et al., 2006, Charpentier et al., 2000). Im Gegensatz zu z.B. Tyrosinkinase-gekoppelten Rezeptoren wirken Cadherine und Plaqueproteine nicht direkt über enzymatische Aktivität auf Signalprozesse, sondern steuern diese über ihre Lokalisation und das Binden von Signalwegsenzymen (Spindler et al., 2014, Muller et al., 2008).

Diese Arbeit unterstreicht die Bedeutung einer erstmals im Herzen neu entdeckten Phosphorylierungsstelle von Pg, die direkten Einfluss auf die Zellhaftung hat (Schinner et al., 2017). Welchen Einfluss die beschriebene Phosphorylierungsstelle und cAMP auf Zellproliferation und Migrationsprozesse hat sollte daher Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

8.8. Ausblick: Apremilast als Therapeutikum bei hyperproliferativen Erkrankungen

Aus den oben genannten Beobachtungen leitet sich die Frage ab, inwieweit Apremilast auch bei anderen dermatologischen Erkrankungen Anwendung erfahren könnte. In erster Linie gilt es, den direkten Einfluss auf Keratinozyten weiter zu untersuchen. Da cAMP direkte Auswirkungen auf die Migration von Zellen hat (siehe Abbildung 20), könnten auch bei der in der Zulassungsstudie untersuchten hyperproliferativen Erkrankung Psoriasis vulgaris vom Immunsystem unabhängige Effekte für den Behandlungserfolg relevant sein. Bisher beruft sich Zulassung von Apremilast lediglich auf dessen Einfluss auf die Steuerung des Immunsystems (Schafer et al., 2010, Papp et al., 2012). Zudem wurde eine Erhöhte Co-Inzidenz von Pemphigus und Psoriasis beschrieben, was als Hinweis für die Existenz von gemeinsamen prädisponierenden Faktoren gewertet werden könnte (Kridin et al., 2020).

Ein weiteres potenzielles Anwendungsgebiet könnte die seltene Variante Pemphigus vegetans sein. Bei dieser Erkrankung haben die Läsionen hyperproliferativ-vegetierenden Charakter und es wird eine ausgeprägte Papillomatose beschrieben (Fritsch, 2009).

9. Literaturverzeichnis

- AKAT, K., MENNEL, H. D., KREMER, P., GASSLER, N., BLECK, C. K. & KARTENBECK, J. 2003. Molecular characterization of desmosomes in meningiomas and arachnoidal tissue. *Acta Neuropathol*, 106, 337-47.
- AL-AMOUDI, A., DIEZ, D. C., BETTS, M. J. & FRANGAKIS, A. S. 2007. The molecular architecture of cadherins in native epidermal desmosomes. *Nature*, 450, 832-7.
- ALBERTS, B. J., ALEXANDER, LEWIS, JULIAN; MORGAN, DAVID; RAFF, MARTIN; ROBERTS, KEITH; WALTER, PETER 2015. *Molecular biology of the cell* New York, Norton & Company.
- AMAGAI, M. 1995. Adhesion molecules. I: Keratinocyte-keratinocyte interactions; cadherins and pemphigus. *J Invest Dermatol*, 104, 146-52.
- AMAGAI, M., KARPATI, S., PRUSSICK, R., KLAUS-KOVTUN, V. & STANLEY, J. R. 1992. Autoantibodies against the amino-terminal cadherin-like binding domain of pemphigus vulgaris antigen are pathogenic. *J Clin Invest*, 90, 919-26.
- AMAGAI, M., KLAUS-KOVTUN, V. & STANLEY, J. R. 1991. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell*, 67, 869-77.
- AMAGAI, M., TSUNODA, K., ZILLIKENS, D., NAGAI, T. & NISHIKAWA, T. 1999. The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile. *J Am Acad Dermatol*, 40, 167-70.
- AMBER, K. T., VALDEBRAN, M. & GRANDO, S. A. 2018. Non-Desmoglein Antibodies in Patients With Pemphigus Vulgaris. *Front Immunol*, 9, 1190.
- AOYAMA, Y., NAGAI, M. & KITAJIMA, Y. 2010. Binding of pemphigus vulgaris IgG to antigens in desmosome core domains excludes immune complexes rather than directly splitting desmosomes. *Br J Dermatol*, 162, 1049-55.
- BEKTAS, M., JOLLY, P. S., BERKOWITZ, P., AMAGAI, M. & RUBENSTEIN, D. S. 2013. A pathophysiologic role for epidermal growth factor receptor in pemphigus acantholysis. *J Biol Chem*, 288, 9447-56.
- BERKOWITZ, P., DIAZ, L. A., HALL, R. P. & RUBENSTEIN, D. S. 2008. Induction of p38MAPK and HSP27 phosphorylation in pemphigus patient skin. *J Invest Dermatol*, 128, 738-40.
- 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. *J Biol Chem*, 280, 23778-84.
- BERKOWITZ, P., HU, P., WARREN, S., LIU, Z., DIAZ, L. A. & RUBENSTEIN, D. S. 2006. p38MAPK inhibition prevents disease in pemphigus vulgaris mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 12855-60.
- BEUTNER, E. H. & JORDON, R. E. 1964. DEMONSTRATION OF SKIN ANTIBODIES IN SERA OF PEMPHIGUS VULGARIS PATIENTS BY INDIRECT IMMUNOFLUORESCENT STAINING. *Proc Soc Exp Biol Med*, 117, 505-10.
- BINNIG, G., QUATE, C. F. & GERBER, C. 1986. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett*, 56, 930-933.
- BLANPAIN, C. & FUCHS, E. 2009. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 207-17.
- BOS, J. L. 2006. Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. *Trends Biochem Sci*, 31, 680-6.
- BOUKAMP, P., PETRUSSEVSKA, R. T., BREITKREUTZ, D., HORNING, J., MARKHAM, A. & FUSENIG, N. E. 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol*, 106, 761-71.

- BRAGULLA, H. H. & HOMBERGER, D. G. 2009. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *J Anat*, 214, 516-59.
- BRASCH, J., HARRISON, O. J., HONIG, B. & SHAPIRO, L. 2012. Thinking outside the cell: how cadherins drive adhesion. *Trends Cell Biol*, 22, 299-310.
- BROOKE, M. A., NITOIU, D. & KELSELL, D. P. 2012. Cell-cell connectivity: desmosomes and disease. *J Pathol*, 226, 158-71.
- BURMESTER, I. A. K., FLASWINKEL, S., THIES, C. S., KASPRICK, A., KAMAGUCHI, M., BUMILLER-BINI, V., EMTENANI, S., FELDMANN, N., KRIDIN, K., SCHMIDT, E., VAN BEEK, N., ZILLIKENS, D., HAMMERS, C. M., HUNDT, J. E. & LUDWIG, R. J. 2020. Identification of novel therapeutic targets for blocking acantholysis in pemphigus. *Br J Pharmacol*, 177, 5114-5130.
- BYSTRYN, J.-C. & STEINMAN, N. M. 1996. The Adjuvant Therapy of Pemphigus: An Update. *Archives of Dermatology*, 132, 203-212.
- BYSTRYN, J. C. & GRANDO, S. A. 2006. A novel explanation for acantholysis in pemphigus vulgaris: the basal cell shrinkage hypothesis. *J Am Acad Dermatol*, 54, 513-6.
- BYSTRYN, J. C. & RUDOLPH, J. L. 2005. Pemphigus. *Lancet*, 366, 61-73.
- CALAUTTI, E., LI, J., SAONCELLA, S., BRISSETTE, J. L. & GOETINCK, P. F. 2005. Phosphoinositide 3-kinase signaling to Akt promotes keratinocyte differentiation versus death. *J Biol Chem*, 280, 32856-65.
- CALDELARI, R., DE BRUIN, A., BAUMANN, D., SUTER, M. M., BIERKAMP, C., BALMER, V. & MÜLLER, E. 2001. A Central Role for the Armadillo Protein Plakoglobin in the Autoimmune Disease Pemphigus Vulgaris. *Journal of Cell Biology*, 153, 823-834.
- CALKINS, C. C., SETZER, S. V., JENNINGS, J. M., SUMMERS, S., TSUNODA, K., AMAGAI, M. & KOWALCZYK, A. P. 2006. Desmoglein endocytosis and desmosome disassembly are coordinated responses to pemphigus autoantibodies. *J Biol Chem*, 281, 7623-34.
- CAPALDO, C. T., FARKAS, A. E. & NUSRAT, A. 2014. Epithelial adhesive junctions. *F1000Prime Rep*, 6, 1.
- CHARPENTIER, E., LAVKER, R. M., ACQUISTA, E. & COWIN, P. 2000. Plakoglobin suppresses epithelial proliferation and hair growth in vivo. *J Cell Biol*, 149, 503-20.
- CHENG, X., JI, Z., TSALKOVA, T. & MEI, F. 2008. Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 40, 651-62.
- CONTI, M., MIKA, D. & RICHTER, W. 2014. Cyclic AMP compartments and signaling specificity: role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Gen Physiol*, 143, 29-38.
- DE BRUIN, A., CALDELARI, R., WILLIAMSON, L., SUTER, M. M., HUNZIKER, T., WYDER, M. & MULLER, E. J. 2007. Plakoglobin-dependent disruption of the desmosomal plaque in pemphigus vulgaris. *Exp Dermatol*, 16, 468-75.
- DEHNER, C., ROTZER, V., WASCHKE, J. & SPINDLER, V. 2014. A desmoplakin point mutation with enhanced keratin association ameliorates pemphigus vulgaris autoantibody-mediated loss of cell cohesion. *Am J Pathol*, 184, 2528-36.
- DELVA, E., TUCKER, D. K. & KOWALCZYK, A. P. 2009. The desmosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1, a002543.
- DI ZENZO, G., ZAMBRUNO, G. & BORRADORI, L. 2012. Endemic pemphigus foliaceus: towards understanding autoimmune mechanisms of disease development. *J Invest Dermatol*, 132, 2499-502.
- DIDONA, D., PAOLINO, G., DI ZENZO, G., DIDONA, B., PAMPENA, R., DI NICOLA, M. R. & MERCURI, S. R. 2022. Pemphigus Vulgaris: Present and Future Therapeutic Strategies. *Dermatol Pract Concept*, 12, e2022037.

- DUNN, K. W., KAMOCKA, M. M. & MCDONALD, J. H. 2011. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Am J Physiol Cell Physiol*, 300, C723-42.
- DUSEK, R. L., GODSEL, L. M. & GREEN, K. J. 2007. Discriminating roles of desmosomal cadherins: beyond desmosomal adhesion. *J Dermatol Sci*, 45, 7-21.
- EBNER, A., WILDLING, L., KAMRUZZAHAN, A. S., RANKL, C., WRUSS, J., HAHN, C. D., HÖLZL, M., ZHU, R., KIENBERGER, F., BLAAS, D., HINTERDORFER, P. & GRUBER, H. J. 2007. A new, simple method for linking of antibodies to atomic force microscopy tips. *Bioconjug Chem*, 18, 1176-84.
- EGU, D. T., KUGELMANN, D. & WASCHKE, J. 2019. Role of PKC and ERK Signaling in Epidermal Blistering and Desmosome Regulation in Pemphigus. *Front Immunol*, 10, 2883.
- EGU, D. T., SCHMITT, T., ERNST, N., LUDWIG, R. J., FUCHS, M., HIERMAIER, M., MOZTARZADEH, S., MORON, 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. *J Invest Dermatol*.
- EGU, D. T., SCHMITT, T. & WASCHKE, J. 2022. Mechanisms Causing Acantholysis in Pemphigus-Lessons from Human Skin. *Front Immunol*, 13, 884067.
- EGU, D. T., WALTER, E., SPINDLER, V. & WASCHKE, J. 2017. Inhibition of p38MAPK signalling prevents epidermal blistering and alterations of desmosome structure induced by pemphigus autoantibodies in human epidermis. *Br J Dermatol*, 177, 1612-1618.
- ELLEBRECHT, C. T., BHOJ, V. G., NACE, A., CHOI, E. J., MAO, X., CHO, M. J., DI ZENZO, G., LANZAVECCHIA, A., SEYKORA, J. T., COTSARELIS, G., MILONE, M. C. & PAYNE, A. S. 2016. Reengineering chimeric antigen receptor T cells for targeted therapy of autoimmune disease. *Science*, 353, 179-84.
- EMING, R., HENNERICI, T., BACKLUND, J., FELICIANI, C., VISCONTI, K. C., WILLENBORG, S., WOHDE, J., HOLMDAHL, R., SONDERSTRUP, G. & HERTL, M. 2014. Pathogenic IgG antibodies against desmoglein 3 in pemphigus vulgaris are regulated by HLA-DRB1*04:02-restricted T cells. *J Immunol*, 193, 4391-9.
- ENGELMAYER, S. 2024. Pemphigus Diss.
- ETHIRAJ, P., SASI, B., HOLDER, K. N., LIN, A. P., QIU, Z., JAAFAR, C., ELKHALILI, A., DESAI, P., SAKSENA, A., RITTER, J. P. & AGUIAR, R. C. T. 2022. Cyclic-AMP signalling, MYC and hypoxia-inducible factor 1alpha intersect to regulate angiogenesis in B-cell lymphoma. *Br J Haematol*, 198, 349-359.
- FERTIG, B. A. & BAILLIE, G. S. 2018. PDE4-Mediated cAMP Signalling. *J Cardiovasc Dev Dis*, 5.
- FISCHMEISTER, R. 2006. Is cAMP good or bad? Depends on where it's made. *Circ Res*, 98, 582-4.
- FRANKE, W. W. 2009. Discovering the molecular components of intercellular junctions--a historical view. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1, a003061.
- FRITSCH, P. 2009. *Dermatologie & Venerologie für das Studium*, Heidelberg, Springer Medizin Verlag.
- FUCHS, M., RADEVA, M. Y., SPINDLER, V., VIELMUTH, F., KUGELMANN, D. & WASCHKE, J. 2023. Cytoskeletal anchorage of different Dsg3 pools revealed by combination of hybrid STED/SMFS-AFM. *Cell Mol Life Sci*, 80, 25.
- GARROD, D. & KIMURA, T. E. 2008. Hyper-adhesion: a new concept in cell-cell adhesion. *Biochem Soc Trans*, 36, 195-201.
- GARROD, D. R., MERRITT, A. J. & NIE, Z. 2002. Desmosomal cadherins. *Curr Opin Cell Biol*, 14, 537-45.

- GAUDRY, C. A., PALKA, H. L., DUSEK, R. L., HUEN, A. C., KHANDEKAR, M. J., HUDSON, L. G. & GREEN, K. J. 2001. Tyrosine-phosphorylated plakoglobin is associated with desmogleins but not desmoplakin after epidermal growth factor receptor activation. *J Biol Chem*, 276, 24871-80.
- GONZALEZ, G. A. & MONTMINY, M. R. 1989. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell*, 59, 675-80.
- GOTTLIEB, A. B., STROBER, B., KRUEGER, J. G., ROHANE, P., ZELDIS, J. B., HU, C. C. & KIPNIS, C. 2008. An open-label, single-arm pilot study in patients with severe plaque-type psoriasis treated with an oral anti-inflammatory agent, apremilast. *Curr Med Res Opin*, 24, 1529-38.
- GRADA, A., OTERO-VINAS, M., PRIETO-CASTRILLO, F., OBAGI, Z. & FALANGA, V. 2017. Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. *J Invest Dermatol*, 137, e11-e16.
- GRANDO, S. A. 2000. Autoimmunity to keratinocyte acetylcholine receptors in pemphigus. *Dermatology*, 201, 290-5.
- GREEN, K. J., JAIGANESH, A. & BROUSSARD, J. A. 2019. Desmosomes: Essential contributors to an integrated intercellular junction network. *F1000Res*, 8.
- GREEN, K. J. & SIMPSON, C. L. 2007. Desmosomes: new perspectives on a classic. *J Invest Dermatol*, 127, 2499-515.
- GUMBINER, B. M. 1996. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*, 84, 345-57.
- HANS-FILHO, G., AOKI, V., BITTNER, N. R. H. & BITTNER, G. C. 2018. Fogo selvagem: endemic pemphigus foliaceus. *An Bras Dermatol*, 93, 638-650.
- HARMAN, K. E., SEED, P. T., GRATIAN, M. J., BHOGAL, B. S., CHALLACOMBE, S. J. & BLACK, M. M. 2001. The severity of cutaneous and oral pemphigus is related to desmoglein 1 and 3 antibody levels. *Br J Dermatol*, 144, 775-80.
- HARRIS, T. J. & TEPASS, U. 2010. Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 502-14.
- HARRISON, O. J., BRASCH, J., LASSO, G., KATSAMBA, P. S., AHLSEN, G., HONIG, B. & SHAPIRO, L. 2016. Structural basis of adhesive binding by desmocollins and desmogleins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 7160-5.
- HATEMI, G., MELIKOGLU, M., TUNC, R., KORKMAZ, C., TURGUT OZTURK, B., MAT, C., MERKEL, P. A., CALAMIA, K. T., LIU, Z., PINEDA, L., STEVENS, R. M., YAZICI, H. & YAZICI, Y. 2015. Apremilast for Behcet's syndrome--a phase 2, placebo-controlled study. *N Engl J Med*, 372, 1510-8.
- HAYES, J. S. & BRUNTON, L. L. 1982. Functional compartments in cyclic nucleotide action. *J Cyclic Nucleotide Res*, 8, 1-16.
- HE, W., COWIN, P. & STOKES, D. L. 2003. Untangling desmosomal knots with electron tomography. *Science*, 302, 109-13.
- HEBERT, V., BOULARD, C., HOUIVET, E., DUVERT LEHEMBRE, S., BORRADORI, L., DELLA TORRE, R., FELICIANI, C., FANIA, L., ZAMBRUNO, G., CAMAIONI, D. B., DIDONA, B., MARINOVIC, B., SCHMIDT, E., SCHUMACHER, N., HUNEFELD, C., SCHANZ, S., KERN, J. S., HOFMANN, S., BOUYEURE, A. C., PICARD-DAHAN, C., PROST-SQUARCIONI, C., CAUX, F., ALEXANDRE, M., INGEN-HOUSZ-ORO, S., BAGOT, M., TANCREDE-BOHIN, E., BOUAZIZ, J. D., FRANCK, N., VABRES, P., LABEILLE, B., RICHARD, M. A., DELAPORTE, E., DUPUY, A., D'INCAN, M., QUEREUX, G., SKOWRO, F., PAUL, C., LIVIDEANU, C. B., BEYLOT-BARRY, M., DOUTRE, M. S., AVENEL-AUDRAN, M., BEDANE, C., BERNARD, P., MACHET, L., MAILLARD, H., JULLIEN, D., DEBARBIEUX, S., SASSOLAS, B., MISERY, L., ABASQ, C.,

- DEREURE, O., LAGOUTTE, P., FERRANTI, V., WERTH, V. P., MURRELL, D. F., HERTL, M., BENICHO, J., JOLY, P., FRENCH STUDY GROUP ON AUTOIMMUNE BULLOUS SKIN, D., AUTOIMMUNE BULLOUS SKIN DISEASE TASK FORCE OF THE EUROPEAN ACADEMY OF, D. & VENEREOLOGY 2019. Large International Validation of ABSIS and PDAI Pemphigus Severity Scores. *J Invest Dermatol*, 139, 31-37.
- HEGAZY, M., PERL, A. L., SVOBODA, S. A. & GREEN, K. J. 2022. Desmosomal Cadherins in Health and Disease. *Annu Rev Pathol*, 17, 47-72.
- HERRMANN, H. & AEBI, U. 2016. Intermediate Filaments: Structure and Assembly. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8.
- HEUPEL, W. M., ZILLIKENS, D., DRENCKHAHN, D. & WASCHKE, J. 2008. Pemphigus vulgaris IgG directly inhibit desmoglein 3-mediated transinteraction. *J Immunol*, 181, 1825-34.
- HIERMAIER, M., KLIEWE, F., SCHINNER, C., STUDLE, C., MALY, I. P., WANUSKE, M. T., ROTZER, V., ENDLICH, N., VIELMUTH, F., WASCHKE, J. & SPINDLER, V. 2021. The Actin-Binding Protein alpha-Adducin Modulates Desmosomal Turnover and Plasticity. *J Invest Dermatol*, 141, 1219-1229 e11.
- HOBBS, R. P. & GREEN, K. J. 2012. Desmoplakin regulates desmosome hyperadhesion. *J Invest Dermatol*, 132, 482-5.
- HOFRICHTER, M., DWORSCHAK, J., EMTENANI, S., LANGENHAN, J., WEISS, F., KOMOROWSKI, L., ZILLIKENS, D., STOCKER, W., PROBST, C., SCHMIDT, E. & GOLETZ, S. 2018. Immunoabsorption of Desmoglein-3-Specific IgG Abolishes the Blister-Inducing Capacity of Pemphigus Vulgaris IgG in Neonatal Mice. *Front Immunol*, 9, 1935.
- HOUSLAY, M. D. & ADAMS, D. R. 2003. PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem J*, 370, 1-18.
- HOUSLAY, M. D., BAILLIE, G. S. & MAURICE, D. H. 2007. cAMP-Specific phosphodiesterase-4 enzymes in the cardiovascular system: a molecular toolbox for generating compartmentalized cAMP signaling. *Circ Res*, 100, 950-66.
- HOUSLAY, M. D., SCHAFER, P. & ZHANG, K. Y. 2005. Keynote review: phosphodiesterase-4 as a therapeutic target. *Drug Discov Today*, 10, 1503-19.
- HSU, D. Y., BRIEVA, J., SINHA, A. A., LANGAN, S. M. & SILVERBERG, J. I. 2016. Comorbidities and inpatient mortality for pemphigus in the U.S.A. *Br J Dermatol*, 174, 1290-8.
- HU, P., BERKOWITZ, P., O'KEEFE, E. J. & RUBENSTEIN, D. S. 2003. Keratinocyte adherens junctions initiate nuclear signaling by translocation of plakoglobin from the membrane to the nucleus. *J Invest Dermatol*, 121, 242-51.
- HU, P., O'KEEFE, E. J. & RUBENSTEIN, D. S. 2001. Tyrosine phosphorylation of human keratinocyte beta-catenin and plakoglobin reversibly regulates their binding to E-cadherin and alpha-catenin. *J Invest Dermatol*, 117, 1059-67.
- HUDEMANN, C., EXNER, Y., POLLMANN, R., SCHNEIDER, K., ZAKRZEWICZ, A., FELDHOFF, S., SCHMIDT, T., SPINDLER, V., RAFEI-SHAMSABADI, D., VOLLNER, F., WASCHKE, J., TIKKANEN, R., HERTL, M. & EMING, R. 2023. IgG against the Membrane-Proximal Portion of the Desmoglein 3 Ectodomain Induces Loss of Keratinocyte Adhesion, a Hallmark in Pemphigus Vulgaris. *J Invest Dermatol*, 143, 254-263 e3.
- HUDEMANN, C., MAGLIE, R., LLAMAZARES-PRADA, M., BECKERT, B., DIDONA, D., TIKKANEN, R., SCHMITT, T., HASHIMOTO, T., WASCHKE, J., HERTL, M. & EMING, R. 2022. Human Desmocollin 3-Specific IgG Antibodies Are Pathogenic in a Humanized HLA Class II Transgenic Mouse Model of Pemphigus. *J Invest Dermatol*, 142, 915-923 e3.
- HUTTER, J. L. & BECHHOEFER, J. 1993. Calibration of atomic-force microscope tips. *Review of Scientific Instruments*, 64, 1868-1873.

- ISHII, K., HARADA, R., MATSUO, I., SHIRAKATA, Y., HASHIMOTO, K. & AMAGAI, M. 2005. In vitro keratinocyte dissociation assay for evaluation of the pathogenicity of anti-desmoglein 3 IgG autoantibodies in pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol*, 124, 939-46.
- IWATSUKI, K., HAN, G. W., FUKUTI, R., OHTSUKA, M., KIKUCHI, S., AKIBA, H. & KANEKO, F. 1999. Internalization of constitutive desmogleins with the subsequent induction of desmoglein 2 in pemphigus lesions. *Br J Dermatol*, 140, 35-43.
- JACOB, J. T., COULOMBE, P. A., KWAN, R. & OMARY, M. B. 2018. Types I and II Keratin Intermediate Filaments. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 10.
- JOLLY, P. S., BERKOWITZ, P., BEKTAS, M., LEE, H. E., CHUA, M., DIAZ, L. A. & RUBENSTEIN, D. S. 2010. p38MAPK signaling and desmoglein-3 internalization are linked events in pemphigus acantholysis. *J Biol Chem*, 285, 8936-41.
- JOLY, P., MAHO-VAILLANT, M., PROST-SQUARCIONI, C., HEBERT, V., HOUIVET, E., CALBO, S., CAILLOT, F., GOLINSKI, M. L., LABEILLE, B., PICARD-DAHAN, C., PAUL, C., RICHARD, M. A., BOUAZIZ, J. D., DUVERT-LEHEMBRE, S., BERNARD, P., CAUX, F., ALEXANDRE, M., INGEN-HOUSZ-ORO, S., VABRES, P., DELAPORTE, E., QUEREUX, G., DUPUY, A., DEBARBIEUX, S., AVENEL-AUDRAN, M., D'INCAN, M., BEDANE, C., BENETON, N., JULLIEN, D., DUPIN, N., MISERY, L., MACHET, L., BEYLOT-BARRY, M., DEREURE, O., SASSOLAS, B., VERMEULIN, T., BENICHO, J., MUSETTE, P. & FRENCH STUDY GROUP ON AUTOIMMUNE BULLOUS SKIN, D. 2017. First-line rituximab combined with short-term prednisone versus prednisone alone for the treatment of pemphigus (Ritux 3): a prospective, multicentre, parallel-group, open-label randomised trial. *Lancet*, 389, 2031-2040.
- KASPERKIEWICZ, M., ELLEBRECHT, C. T., TAKAHASHI, H., YAMAGAMI, J., ZILLIKENS, D., PAYNE, A. S. & AMAGAI, M. 2017. Pemphigus. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 17026.
- KAWASAKI, Y., AOYAMA, Y., TSUNODA, K., AMAGAI, M. & KITAJIMA, Y. 2006. Pathogenic monoclonal antibody against desmoglein 3 augments desmoglein 3 and p38 MAPK phosphorylation in human squamous carcinoma cell line. *Autoimmunity*, 39, 587-90.
- KIENBERGER, F., PASTUSHENKO, V. P., KADA, G., GRUBER, H. J., RIENER, C., SCHINDLER, H. & HINTERDORFER, P. 2000. Static and Dynamical Properties of Single Poly(Ethylene Glycol) Molecules Investigated by Force Spectroscopy. *Single Molecules*, 1, 123-128.
- KIRFEL, J., MAGIN, T. M. & REICHEL, J. 2003. Keratins: a structural scaffold with emerging functions. *Cell Mol Life Sci*, 60, 56-71.
- KITAJIMA, Y. 2013. New insights into desmosome regulation and pemphigus blistering as a desmosome-remodeling disease. *Kaohsiung J Med Sci*, 29, 1-13.
- KITAJIMA, Y. 2014. 150(th) anniversary series: Desmosomes and autoimmune disease, perspective of dynamic desmosome remodeling and its impairments in pemphigus. *Cell Commun Adhes*, 21, 269-80.
- KITAJIMA, Y., AOYAMA, Y. & SEISHIMA, M. 1999. Transmembrane signaling for adhesive regulation of desmosomes and hemidesmosomes, and for cell-cell detachment induced by pemphigus IgG in cultured keratinocytes: involvement of protein kinase C. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 4, 137-44.
- KLEIN, D. C., STROH, C. M., JENSENIUS, H., VAN ES, M., KAMRUZZAHAN, A. S., STAMOULI, A., GRUBER, H. J., OOSTERKAMP, T. H. & HINTERDORFER, P. 2003. Covalent immobilization of single proteins on mica for molecular recognition force microscopy. *Chemphyschem*, 4, 1367-71.
- KNEISEL, A. & HERTL, M. 2011a. Autoimmune bullous skin diseases. Part 1: Clinical manifestations. *J Dtsch Dermatol Ges*, 9, 844-56; quiz 857.

- KNEISEL, A. & HERTL, M. 2011b. Autoimmune bullous skin diseases. Part 2: diagnosis and therapy. *J Dtsch Dermatol Ges*, 9, 927-47.
- KOCH, P. J., MAHONEY, M. G., ISHIKAWA, H., PULKKINEN, L., UITTO, J., SHULTZ, L., MURPHY, G. F., WHITAKER-MENEZES, D. & STANLEY, J. R. 1997. Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris. *J Cell Biol*, 137, 1091-102.
- KOGA, H., RECKE, A., VIDARSSON, G., PAS, H. H., JONKMAN, M. F., HASHIMOTO, T., KASPRICK, A., GHORBANALIPOOR, S., TENOR, H., ZILLIKENS, D. & LUDWIG, R. J. 2016. PDE4 Inhibition as Potential Treatment of Epidermolysis Bullosa Acquisita. *J Invest Dermatol*, 136, 2211-2220.
- KOLLY, C., SUTER, M. M. & MULLER, E. J. 2005. Proliferation, cell cycle exit, and onset of terminal differentiation in cultured keratinocytes: pre-programmed pathways in control of C-Myc and Notch1 prevail over extracellular calcium signals. *J Invest Dermatol*, 124, 1014-25.
- KOPPERUD, R., KRAKSTAD, C., SELHEIM, F. & DOSKELAND, S. O. 2003. cAMP effector mechanisms. Novel twists for an 'old' signaling system. *FEBS Lett*, 546, 121-6.
- KOWALCZYK, A. P. & GREEN, K. J. 2013. Structure, function, and regulation of desmosomes. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 116, 95-118.
- KRIDIN, K. 2018. Pemphigus group: overview, epidemiology, mortality, and comorbidities. *Immunol Res*, 66, 255-270.
- KRIDIN, K., LUDWIG, R. J., DAMIANI, G. & COHEN, A. D. 2020. Increased Risk of Pemphigus among Patients with Psoriasis: A Large-scale Cohort Study. *Acta Derm Venereol*, 100, adv00293.
- KRIDIN, K., SAGI, S. Z. & BERGMAN, R. 2017a. Mortality and Cause of Death in Patients with Pemphigus. *Acta Derm Venereol*, 97, 607-611.
- KRIDIN, K., ZELBER-SAGI, S. & BERGMAN, R. 2017b. Pemphigus Vulgaris and Pemphigus Foliaceus: Differences in Epidemiology and Mortality. *Acta Derm Venereol*, 97, 1095-1099.
- KROGER, C., LOSCHKE, F., SCHWARZ, N., WINDOFFER, R., LEUBE, R. E. & MAGIN, T. M. 2013. Keratins control intercellular adhesion involving PKC-alpha-mediated desmoplakin phosphorylation. *J Cell Biol*, 201, 681-92.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- LAMBERT, S., FRANKART, A. & POUMAY, Y. 2010. p38 MAPK-regulated EGFR internalization takes place in keratinocyte monolayer during stress conditions. *Arch Dermatol Res*, 302, 229-33.
- LANGAN, S. M., SMEETH, L., HUBBARD, R., FLEMING, K. M., SMITH, C. J. & WEST, J. 2008. Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris--incidence and mortality in the UK: population based cohort study. *BMJ*, 337, a180.
- LEE, H. E., BERKOWITZ, P., JOLLY, P. S., DIAZ, L. A., CHUA, M. P. & RUBENSTEIN, D. S. 2009. Biphasic activation of p38MAPK suggests that apoptosis is a downstream event in pemphigus acantholysis. *J Biol Chem*, 284, 12524-32.
- LI, M., DANG, D., XI, N., WANG, Y. & LIU, L. 2017. Nanoscale imaging and force probing of biomolecular systems using atomic force microscopy: from single molecules to living cells. *Nanoscale*, 9, 17643-17666.
- LÜLLMANN-RAUCH, R. 2015. *Taschenbuch Histologie*, Stuttgart, Thieme.

- LÜLLMANN-RAUCH, R. & ASAN, E. 2019. Zellenlehre. In: LÜLLMANN-RAUCH, R. & ASAN, E. (eds.) *Taschenlehrbuch Histologie*. 6., vollständig überarbeitete Auflage ed.: Georg Thieme Verlag.
- MAHONEY, M. G., HU, Y., BRENNAN, D., BAZZI, H., CHRISTIANO, A. M. & WAHL, J. K., 3RD 2006. Delineation of diversified desmoglein distribution in stratified squamous epithelia: implications in diseases. *Exp Dermatol*, 15, 101-9.
- MAHONEY, M. G., WANG, Z., ROTHENBERGER, K., KOCH, P. J., AMAGAI, M. & STANLEY, J. R. 1999. Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. *J Clin Invest*, 103, 461-8.
- MALIK, A. M., TUPCHONG, S., HUANG, S., ARE, A., HSU, S. & MOTAPARTHI, K. 2021. An Updated Review of Pemphigus Diseases. *Medicina (Kaunas)*, 57.
- MAO, X., SANO, Y., PARK, J. M. & PAYNE, A. S. 2011. p38 MAPK activation is downstream of the loss of intercellular adhesion in pemphigus vulgaris. *J Biol Chem*, 286, 1283-91.
- MASCARÓ, J. M., JR., ESPAÑA, A., LIU, Z., DING, X., SWARTZ, S. J., FAIRLEY, J. A. & DIAZ, L. A. 1997. Mechanisms of acantholysis in pemphigus vulgaris: role of IgG valence. *Clin Immunol Immunopathol*, 85, 90-6.
- MEIER, K., HOLSTEIN, J., SOLIMANI, F., WASCHKE, J. & GHORESCHI, K. 2020. Case Report: Apremilast for Therapy-Resistant Pemphigus Vulgaris. *Front Immunol*, 11, 588315.
- MICHEL, C. C. & CURRY, F. E. 1999. Microvascular permeability. *Physiol Rev*, 79, 703-61.
- MICHELS, C., BUCHTA, T., BLOCH, W., KRIEG, T. & NIESSEN, C. M. 2009. Classical cadherins regulate desmosome formation. *J Invest Dermatol*, 129, 2072-5.
- MIRAVET, S., PIEDRA, J., CASTANO, J., RAURELL, I., FRANCI, C., DUNACH, M. & GARCIA 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. *Mol Cell Biol*, 23, 7391-402.
- MOCH, M., HERBERICH, G., AACH, T., LEUBE, R. E. & WINDOFFER, R. 2013. Measuring the regulation of keratin filament network dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 10664-9.
- MULLER, E. J., WILLIAMSON, L., KOLLY, C. & SUTER, M. M. 2008. Outside-in signaling through integrins and cadherins: a central mechanism to control epidermal growth and differentiation? *J Invest Dermatol*, 128, 501-16.
- NAM, J., KIM, D. U., KIM, E., KWAK, B., KO, M. J., OH, A. Y., PARK, B. J., KIM, Y. W., KIM, A., SUN, H., JUNG, Y., LEE, J. H., SHIN, H. J., PARK, I., SONG, D. K., JEONG, J. Y., LEE, Y. H. & KIM, S. W. 2019. Disruption of the Myc-PDE4B regulatory circuitry impairs B-cell lymphoma survival. *Leukemia*, 33, 2912-2923.
- NEKRASOVA, O. & GREEN, K. J. 2013. Desmosome assembly and dynamics. *Trends Cell Biol*, 23, 537-46.
- NIE, Z., MERRITT, A., ROUHI-PARKOUHI, M., TABERNERO, L. & GARROD, D. 2011. Membrane-impermeable cross-linking provides evidence for homophilic, isoform-specific binding of desmosomal cadherins in epithelial cells. *J Biol Chem*, 286, 2143-54.
- OHZONO, A., SOGAME, R., LI, X., TEYE, K., TSUCHISAKA, A., NUMATA, S., KOGA, H., KAWAKAMI, T., TSURUTA, D., ISHII, N. & HASHIMOTO, T. 2015. Clinical and immunological findings in 104 cases of paraneoplastic pemphigus. *Br J Dermatol*, 173, 1447-52.
- OKTARINA, D. A., VAN DER WIER, G., DIERCKX, G. F., JONKMAN, M. F. & PAS, H. H. 2011. IgG-induced clustering of desmogleins 1 and 3 in skin of patients with pemphigus fits with the desmoglein nonassembly depletion hypothesis. *Br J Dermatol*, 165, 552-62.

- OMARY, M. B. 2009. "IF-pathies": a broad spectrum of intermediate filament-associated diseases. *J Clin Invest*, 119, 1756-62.
- OVERDUIN, M., TONG, K. I., KAY, C. M. & IKURA, M. 1996. ¹H, ¹⁵N and ¹³C resonance assignments and monomeric structure of the amino-terminal extracellular domain of epithelial cadherin. *J Biomol NMR*, 7, 173-89.
- PAPP, K., CATHER, J. C., ROSOPH, L., SOFEN, H., LANGLEY, R. G., MATHESON, R. T., HU, C. & DAY, R. M. 2012. Efficacy of apremilast in the treatment of moderate to severe psoriasis: a randomised controlled trial. *Lancet*, 380, 738-46.
- PELENGARIS, S., LITTLEWOOD, T., KHAN, M., ELIA, G. & EVAN, G. 1999. Reversible activation of c-Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion. *Mol Cell*, 3, 565-77.
- POLLMANN, R., SCHMIDT, T., EMING, R. & HERTL, M. 2018. Pemphigus: a Comprehensive Review on Pathogenesis, Clinical Presentation and Novel Therapeutic Approaches. *Clin Rev Allergy Immunol*, 54, 1-25.
- QUINLAN, R. A., SCHWARZ, N., WINDOFFER, R., RICHARDSON, C., HAWKINS, T., BROUSSARD, J. A., GREEN, K. J. & LEUBE, R. E. 2017. A rim-and-spoke hypothesis to explain the biomechanical roles for cytoplasmic intermediate filament networks. *J Cell Sci*, 130, 3437-3445.
- RAINGEAUD, J., GUPTA, S., ROGERS, J. S., DICKENS, M., HAN, J., ULEVITCH, R. J. & DAVIS, R. J. 1995. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem*, 270, 7420-6.
- RAN, W., DEAN, M., LEVINE, R. A., HENKLE, C. & CAMPISI, J. 1986. Induction of c-fos and c-myc mRNA by epidermal growth factor or calcium ionophore is cAMP dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 8216-20.
- RASSNER, G. 2009. *Dermatologie : Lehrbuch und Atlas*, Munich, Urban & Fischer.
- RENART, J., REISER, J. & STARK, G. R. 1979. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76, 3116-3120.
- 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, 301-310.
- SAITO, M., STAHLEY, S. N., CAUGHMAN, C. Y., MAO, X., TUCKER, D. K., PAYNE, A. S., AMAGAI, M. & KOWALCZYK, A. P. 2012. Signaling dependent and independent mechanisms in pemphigus vulgaris blister formation. *PLoS One*, 7, e50696.
- SAJDA, T. & SINHA, A. A. 2018. Autoantibody Signaling in Pemphigus Vulgaris: Development of an Integrated Model. *Front Immunol*, 9, 692.
- SALOPEK, T. G., LOGSETTY, S. & TREDGET, E. E. 2002. Anti-CD20 chimeric monoclonal antibody (rituximab) for the treatment of recalcitrant, life-threatening pemphigus vulgaris with implications in the pathogenesis of the disorder. *J Am Acad Dermatol*, 47, 785-8.
- SARDANA, K., GARG, V. K. & AGARWAL, P. 2013. Is there an emergent need to modify the desmoglein compensation theory in pemphigus on the basis of Dsg ELISA data and alternative pathogenic mechanisms? *Br J Dermatol*, 168, 669-74.
- SARIISIK, E., POPOV, C., MULLER, J. P., DOCHEVA, D., CLAUSEN-SCHAUMANN, H. & BENOIT, M. 2015. Decoding Cytoskeleton-Anchored and Non-Anchored Receptors from Single-Cell Adhesion Force Data. *Biophys J*, 109, 1330-3.

- SATO, M., AOYAMA, Y. & KITAJIMA, Y. 2000. Assembly pathway of desmoglein 3 to desmosomes and its perturbation by pemphigus vulgaris-IgG in cultured keratinocytes, as revealed by time-lapsed labeling immunoelectron microscopy. *Lab Invest*, 80, 1583-92.
- SAWANT, M., SCHWARZ, N., WINDOFFER, R., MAGIN, T. M., KRIEGER, J., MUCKE, N., OBARA, B., JANKOWSKI, V., JANKOWSKI, J., WALLY, V., LETTNER, T. & LEUBE, R. E. 2018. Threonine 150 Phosphorylation of Keratin 5 Is Linked to Epidermolysis Bullosa Simplex and Regulates Filament Assembly and Cell Viability. *J Invest Dermatol*, 138, 627-636.
- SCHAFER, P. H., PARTON, A., GANDHI, A. K., CAPONE, L., ADAMS, M., WU, L., BARTLETT, J. B., LOVELAND, M. A., GILHAR, A., CHEUNG, Y. F., BAILLIE, G. S., HOUSLAY, M. D., MAN, H. W., MULLER, G. W. & STIRLING, D. I. 2010. Apremilast, a cAMP phosphodiesterase-4 inhibitor, demonstrates anti-inflammatory activity in vitro and in a model of psoriasis. *Br J Pharmacol*, 159, 842-55.
- SCHINNER, C., VIELMUTH, F., ROTZER, V., HIERMAIER, M., RADEVA, M. Y., CO, T. K., HARTLIEB, E., SCHMIDT, A., IMHOF, A., MESSOUDI, A., HORN, A., SCHLIPP, A., SPINDLER, V. & WASCHKE, J. 2017. Adrenergic Signaling Strengthens Cardiac Myocyte Cohesion. *Circ Res*, 120, 1305-1317.
- SCHLEGEL, N., MEIR, M., HEUPEL, W. M., HOLTHOFER, B., LEUBE, R. E. & WASCHKE, J. 2010. Desmoglein 2-mediated adhesion is required for intestinal epithelial barrier integrity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 298, G774-83.
- SCHLEGEL, N. & WASCHKE, J. 2014. cAMP with other signaling cues converges on Rac1 to stabilize the endothelial barrier- a signaling pathway compromised in inflammation. *Cell Tissue Res*, 355, 587-96.
- SCHLOGL, E., RADEVA, M. Y., VIELMUTH, F., SCHINNER, C., WASCHKE, J. & SPINDLER, V. 2018. Keratin Retraction and Desmoglein3 Internalization Independently Contribute to Autoantibody-Induced Cell Dissociation in Pemphigus Vulgaris. *Front Immunol*, 9, 858.
- SCHMIDT, E., BRÖCKER, E. B. & ZILLIKENS, D. 2000. [Pemphigus. Loss of desmosomal cell-cell contact]. *Hautarzt*, 51, 309-18.
- SCHMIDT, E., GOEBELER, M. & ZILLIKENS, D. 2009. Rituximab in severe pemphigus. *Ann N Y Acad Sci*, 1173, 683-91.
- SCHMIDT, E., KASPERKIEWICZ, M. & JOLY, P. 2019. Pemphigus. *The Lancet*, 394, 882-894.
- SCHMIDT, E., STICHERLING, M., SÁRDY, M., EMING, R., GOEBELER, M., HERTL, M., HOFMANN, S. C., HUNZELMANN, N., KERN, J. S., KRAMER, H., NAST, A., ORZECOWSKI, H. D., PFEIFFER, C., SCHUSTER, V., SITARU, C., ZIDANE, M., ZILLIKENS, D. & WORM, M. 2020. S2k-Leitlinie zur Therapie des Pemphigus vulgaris/foliaceus und des bullösen Pemphigoids: 2019 Update. *J Dtsch Dermatol Ges*, 18, 516-527.
- SCHMIDT, E. & ZILLIKENS, D. 2013. Pemphigoid diseases. *Lancet*, 381, 320-32.
- SCHMIDT, T., WILLENBORG, S., HUNIG, T., DEEG, C. A., SONDERSTRUP, G., HERTL, M. & EMING, R. 2016. Induction of T regulatory cells by the superagonistic anti-CD28 antibody D665 leads to decreased pathogenic IgG autoantibodies against desmoglein 3 in a HLA-transgenic mouse model of pemphigus vulgaris. *Exp Dermatol*, 25, 293-8.
- SCHMITT, T., EGU, D. T., WALTER, E., SIGMUND, A. M., EICHKORN, R., YAZDI, A., SCHMIDT, E., SÁRDY, M., EMING, R., GOEBELER, M. & WASCHKE, J. 2021. Ca(2+) signalling is critical for autoantibody-induced blistering of human epidermis in pemphigus. *Br J Dermatol*, 185, 595-604.
- SCHMITT, T., HUDEMANN, C., MOZTARZADEH, S., HERTL, M., TIKKANEN, R. & WASCHKE, J. 2023. Dsg3 epitope-specific signalling in pemphigus. *Front Immunol*, 14, 1163066.

- SCHMITT, T. & WASCHKE, J. 2021. Autoantibody-Specific Signalling in Pemphigus. *Front Med (Lausanne)*, 8, 701809.
- SCHULTZ, H. Y., DIAZ, L. A., SIROIS, D. A., WERTH, V. P. & GRANDO, S. A. 2011. Generating consensus research goals and treatment strategies for pemphigus and pemphigoid: The 2010 JC Bystryn Pemphigus and Pemphigoid Meeting. *J Invest Dermatol*, 131, 1395-9.
- SCHULZE, K., GALICHET, A., SAYAR, B. S., SCOTHERN, A., HOWALD, D., ZYMAN, H., SIFFERT, M., ZENHAUSERN, D., BOLLI, R., KOCH, P. J., GARROD, D., SUTER, M. M. & MULLER, E. J. 2012. An adult passive transfer mouse model to study desmoglein 3 signaling in pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol*, 132, 346-55.
- SEKIGUCHI, M., FUTEI, Y., FUJII, Y., IWASAKI, T., NISHIKAWA, T. & AMAGAI, M. 2001. Dominant Autoimmune Epitopes Recognized by Pemphigus Antibodies Map to the N-Terminal Adhesive Region of Desmogleins. *The Journal of Immunology*, 167, 5439-5448.
- SHAFRAZ, O., RUBSAM, M., STAHLEY, S. N., CALDARA, A. L., KOWALCZYK, A. P., NIESSEN, C. M. & SIVASANKAR, S. 2018. E-cadherin binds to desmoglein to facilitate desmosome assembly. *Elife*, 7.
- SHAPIRO, L., FANNON, A. M., KWONG, P. D., THOMPSON, A., LEHMANN, M. S., GRÜBEL, G., LEGRAND, J. F., ALS-NIELSEN, J., COLMAN, D. R. & HENDRICKSON, W. A. 1995. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature*, 374, 327-37.
- SHAPIRO, L. & WEIS, W. I. 2009. Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1, a003053.
- 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. *Front Immunol*, 11, 581370.
- SIGMUND, A. M., WINKLER, M., ENGELMAYER, S., KUGELMANN, D., EGU, D. T., STEINERT, L. S., FUCHS, M., HIERMAIR, M., RADEVA, M. Y., BAYERBACH, F. C., BUTZ, E., KOTSCHI, S., HUDEMANN, C., HERTL, M., YERUVA, S., SCHMIDT, E., YAZDI, A. S., GHORESCHI, K., VIELMUTH, F. & WASCHKE, J. 2023. Apremilast prevents blistering in human epidermis and stabilizes keratinocyte adhesion in pemphigus. *Nat Commun*, 14, 116.
- SINHA, A. A. & SAJDA, T. 2018. The Evolving Story of Autoantibodies in Pemphigus Vulgaris: Development of the "Super Compensation Hypothesis". *Front Med (Lausanne)*, 5, 218.
- SOKOL, E., KRAMER, D., DIERCKS, G. F. H., KUIPERS, J., JONKMAN, M. F., PAS, H. H. & GIEPMANS, B. N. G. 2015. Large-Scale Electron Microscopy Maps of Patient Skin and Mucosa Provide Insight into Pathogenesis of Blistering Diseases. *J Invest Dermatol*, 135, 1763-1770.
- SPINDLER, V., DEHNER, C., HUBNER, S. & WASCHKE, J. 2014. Plakoglobin but not desmoplakin regulates keratinocyte cohesion via modulation of p38MAPK signaling. *J Invest Dermatol*, 134, 1655-1664.
- SPINDLER, V., DRENCKHAHN, D., ZILLIKENS, D. & WASCHKE, J. 2007. Pemphigus IgG causes skin splitting in the presence of both desmoglein 1 and desmoglein 3. *Am J Pathol*, 171, 906-16.
- SPINDLER, V., EMING, R., SCHMIDT, E., AMAGAI, M., GRANDO, S., JONKMAN, M. F., KOWALCZYK, A. P., MULLER, E. J., PAYNE, A. S., PINCELLI, C., SINHA, A. A., SPRECHER, E., ZILLIKENS, D., HERTL, M. & WASCHKE, J. 2018. Mechanisms Causing Loss of Keratinocyte Cohesion in Pemphigus. *J Invest Dermatol*, 138, 32-37.
- SPINDLER, V., HEUPEL, W. M., EFTHYMIADIS, A., SCHMIDT, E., EMING, R., RANKL, C., HINTERDORFER, P., MULLER, T., DRENCKHAHN, D. & WASCHKE, J. 2009. Desmocollin

- 3-mediated binding is crucial for keratinocyte cohesion and is impaired in pemphigus. *J Biol Chem*, 284, 30556-64.
- SPINDLER, V., ROTZER, V., DEHNER, C., KEMPF, B., GLIEM, M., RADEVA, M., HARTLIEB, E., HARMS, G. S., SCHMIDT, E. & WASCHKE, J. 2013. Peptide-mediated desmoglein 3 crosslinking prevents pemphigus vulgaris autoantibody-induced skin blistering. *J Clin Invest*, 123, 800-11.
- SPINDLER, V., VIELMUTH, F., SCHMIDT, E., RUBENSTEIN, D. S. & WASCHKE, J. 2010. Protective endogenous cyclic adenosine 5'-monophosphate signaling triggered by pemphigus autoantibodies. *J Immunol*, 185, 6831-8.
- SPINDLER, V. & WASCHKE, J. 2018. Pemphigus-A Disease of Desmosome Dysfunction Caused by Multiple Mechanisms. *Front Immunol*, 9, 136.
- STAHLEY, S. N., WARREN, M. F., FELDMAN, R. J., SWERLICK, R. A., MATTHEYSES, A. L. & KOWALCZYK, A. P. 2016. Super-Resolution Microscopy Reveals Altered Desmosomal Protein Organization in Tissue from Patients with Pemphigus Vulgaris. *J Invest Dermatol*, 136, 59-66.
- STANLEY, J. R. & AMAGAI, M. 2006. Pemphigus, bullous impetigo, and the staphylococcal scalded-skin syndrome. *N Engl J Med*, 355, 1800-10.
- STANLEY, J. R., KOULU, L., KLAUS-KOVTUN, V. & STEINBERG, M. S. 1986. A monoclonal antibody to the desmosomal glycoprotein desmoglein I binds the same polypeptide as human autoantibodies in pemphigus foliaceus. *J Immunol*, 136, 1227-30.
- STENN, K. S., LINK, R., MOELLMANN, G., MADRI, J. & KUKLINSKA, E. 1989. Dispase, a neutral protease from *Bacillus polymyxa*, is a powerful fibronectinase and type IV collagenase. *J Invest Dermatol*, 93, 287-90.
- STORK, P. J. & SCHMITT, J. M. 2002. Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol*, 12, 258-66.
- TASKÉN, K. & AANDAHL, E. M. 2004. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev*, 84, 137-67.
- TASKEN, K. A., COLLAS, P., KEMMNER, W. A., WITCZAK, O., CONTI, M. & TASKEN, K. 2001. Phosphodiesterase 4D and protein kinase a type II constitute a signaling unit in the centrosomal area. *J Biol Chem*, 276, 21999-2002.
- THOMASON, H. A., COOPER, N. H., ANSELL, D. M., CHIU, M., MERRIT, A. J., HARDMAN, M. J. & GARROD, D. R. 2012. Direct evidence that PKC α positively regulates wound re-epithelialization: correlation with changes in desmosomal adhesiveness. *J Pathol*, 227, 346-56.
- THOMASON, H. A., SCOTHERN, A., MCHARG, S. & GARROD, D. R. 2010. Desmosomes: adhesive strength and signalling in health and disease. *Biochem J*, 429, 419-33.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. & GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 4350-4.
- TSANG, S. M., 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. *Exp Cell Res*, 318, 2269-83.
- TSUNODA, K., OTA, T., AOKI, M., YAMADA, T., NAGAI, T., NAKAGAWA, T., KOYASU, S., NISHIKAWA, T. & AMAGAI, M. 2003. Induction of Pemphigus Phenotype by a Mouse Monoclonal Antibody Against the Amino-Terminal Adhesive Interface of Desmoglein 3. *The Journal of Immunology*, 170, 2170-2178.

- VAN DER WIER, G., JONKMAN, M. F., PAS, H. H. & DIERCKS, G. F. 2012. Ultrastructure of acantholysis in pemphigus foliaceus re-examined from the current perspective. *Br J Dermatol*, 167, 1265-71.
- VAN DER WIER, G., PAS, H. H., KRAMER, D., DIERCKS, G. F. H. & JONKMAN, M. F. 2014. Smaller desmosomes are seen in the skin of pemphigus patients with anti-desmoglein 1 antibodies but not in patients with anti-desmoglein 3 antibodies. *J Invest Dermatol*, 134, 2287-2290.
- VELDMAN, C., STAUBER, A., WASSMUTH, R., UTER, W., SCHULER, G. & HERTL, M. 2003. Dichotomy of autoreactive Th1 and Th2 cell responses to desmoglein 3 in patients with pemphigus vulgaris (PV) and healthy carriers of PV-associated HLA class II alleles. *J Immunol*, 170, 635-42.
- VIELMUTH, F. 2014. *Die Rolle von cAMP bei Pemphigus vulgaris*.
- VIELMUTH, F., HARTLIEB, E., KUGELMANN, D., WASCHKE, J. & SPINDLER, V. 2015a. Atomic force microscopy identifies regions of distinct desmoglein 3 adhesive properties on living keratinocytes. *Nanomedicine*, 11, 511-20.
- VIELMUTH, F., RADEVA, M. Y., YERUVA, S., SIGMUND, A. M. & WASCHKE, J. 2023. cAMP: A master regulator of cadherin-mediated binding in endothelium, epithelium and myocardium. *Acta Physiol (Oxf)*, e14006.
- VIELMUTH, F., SPINDLER, V. & WASCHKE, J. 2018a. Atomic Force Microscopy Provides New Mechanistic Insights into the Pathogenesis of Pemphigus. *Front Immunol*, 9, 485.
- VIELMUTH, F., WALTER, E., FUCHS, M., RADEVA, M. Y., BUECHAU, F., MAGIN, T. M., SPINDLER, V. & WASCHKE, J. 2018b. Keratins Regulate p38MAPK-Dependent Desmoglein Binding Properties in Pemphigus. *Front Immunol*, 9, 528.
- VIELMUTH, F., WANUSKE, M. T., RADEVA, M. Y., HIERMAIER, M., KUGELMANN, D., WALTER, E., BUECHAU, F., MAGIN, T. M., WASCHKE, J. & SPINDLER, V. 2018c. Keratins Regulate the Adhesive Properties of Desmosomal Cadherins through Signaling. *J Invest Dermatol*, 138, 121-131.
- VIELMUTH, F., WASCHKE, J. & SPINDLER, V. 2015b. Loss of Desmoglein Binding Is Not Sufficient for Keratinocyte Dissociation in Pemphigus. *J Invest Dermatol*, 135, 3068-3077.
- VODO, D., SARIG, O. & SPRECHER, E. 2018. The Genetics of Pemphigus Vulgaris. *Front Med (Lausanne)*, 5, 226.
- WALTER, E., VIELMUTH, F., ROTKOPF, L., SARDY, M., HORVATH, 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. *Sci Rep*, 7, 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. *Front Immunol*, 10, 1128.
- WANUSKE, M. T., BRANTSCHEN, D., SCHINNER, C., STUDLE, C., WALTER, E., HIERMAIER, M., VIELMUTH, F., WASCHKE, J. & SPINDLER, V. 2021. Clustering of desmosomal cadherins by desmoplakin is essential for cell-cell adhesion. *Acta Physiol (Oxf)*, 231, e13609.
- WASCHKE, J. 2008. The desmosome and pemphigus. *Histochem Cell Biol*, 130, 21-54.
- WASCHKE, J., BRUGGEMAN, P., BAUMGARTNER, W., ZILLIKENS, D. & DRENCKHAHN, D. 2005. Pemphigus foliaceus IgG causes dissociation of desmoglein 1-containing junctions without blocking desmoglein 1 transinteraction. *J Clin Invest*, 115, 3157-65.
- WASCHKE, J. & SPINDLER, V. 2014. Desmosomes and extradesmosomal adhesive signaling contacts in pemphigus. *Med Res Rev*, 34, 1127-45.

- WASCHKE, J., SPINDLER, V., BRUGGEMAN, P., ZILLIKENS, D., SCHMIDT, G. & DRENCKHAHN, D. 2006. Inhibition of Rho A activity causes pemphigus skin blistering. *J Cell Biol*, 175, 721-7.
- WELSCH, U., KUMMER, W. & DELLER, T. 2022. *Histologie : Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie : das Lehrbuch / Ulrich Welsch, Wolfgang Kummer, Thomas Deller*, München, Elsevier.
- WILLIAMSON, L., HUNZIKER, T., SUTER, M. M. & MULLER, E. J. 2007a. Nuclear c-Myc: a molecular marker for early stage pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol*, 127, 1549-55.
- WILLIAMSON, L., RAESS, N. A., CALDELARI, R., ZAKHER, A., DE BRUIN, A., POSTHAUS, H., BOLLI, R., HUNZIKER, T., SUTER, M. M. & MULLER, E. J. 2006. Pemphigus vulgaris identifies plakoglobin as key suppressor of c-Myc in the skin. *EMBO J*, 25, 3298-309.
- WILLIAMSON, L., SUTER, M. M., OLIVRY, T., WYDER, M. & MULLER, E. J. 2007b. Upregulation of c-Myc may contribute to the pathogenesis of canine pemphigus vulgaris. *Vet Dermatol*, 18, 12-7.
- WINDOFFER, R., BORCHERT-STUHLTRÄGER, M. & LEUBE, R. E. 2002. Desmosomes: interconnected calcium-dependent structures of remarkable stability with significant integral membrane protein turnover. *J Cell Sci*, 115, 1717-32.
- WOLL, S., WINDOFFER, R. & LEUBE, R. E. 2007. p38 MAPK-dependent shaping of the keratin cytoskeleton in cultured cells. *J Cell Biol*, 177, 795-807.
- YAN, L., WANG, J. M. & ZENG, K. 2012. Association between HLA-DRB1 polymorphisms and pemphigus vulgaris: a meta-analysis. *Br J Dermatol*, 167, 768-77.
- YERUVA, S., KEMPF, E., EGU, D. T., FLASWINKEL, H., KUGELMANN, D. & WASCHKE, J. 2020. Adrenergic Signaling-Induced Ultrastructural Strengthening of Intercalated Discs via Plakoglobin Is Crucial for Positive Adhesiotropy in Murine Cardiomyocytes. *Front Physiol*, 11, 430.
- YERUVA, S. & WASCHKE, J. 2023. Structure and regulation of desmosomes in intercalated discs: Lessons from epithelia. *J Anat*, 242, 81-90.
- YIN, T., GETSIOS, S., CALDELARI, R., GODSEL, L. M., KOWALCZYK, A. P., MULLER, E. J. & GREEN, K. J. 2005a. Mechanisms of plakoglobin-dependent adhesion: desmosome-specific functions in assembly and regulation by epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*, 280, 40355-63.
- YIN, T., GETSIOS, S., CALDELARI, R., KOWALCZYK, A. P., MULLER, E. J., JONES, J. C. & GREEN, K. J. 2005b. Plakoglobin suppresses keratinocyte motility through both cell-cell adhesion-dependent and -independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 5420-5.
- YIN, T. & GREEN, K. J. 2004. Regulation of desmosome assembly and adhesion. *Semin Cell Dev Biol*, 15, 665-77.
- YULIS, M., KUSTERS, D. H. M. & NUSRAT, A. 2018. Cadherins: cellular adhesive molecules serving as signalling mediators. *J Physiol*, 596, 3883-3898.
- ZHURINSKY, J., SHTUTMAN, M. & BEN-ZE'EV, A. 2000. Plakoglobin and beta-catenin: protein interactions, regulation and biological roles. *J Cell Sci*, 113 (Pt 18), 3127-39.

10. Anhang

10.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gliederung der Epidermis und vereinfachte Darstellung der Verteilung desmosomaler Proteine.	11
Abbildung 2: A Struktureller Aufbau eines Desmosoms. B Elektronenmikroskopische Darstellung eines Desmosoms.	14
Abbildung 3: Pathomechanismen bei Pemphigus vulgaris.	30
Abbildung 4: Illustration der Funktionsweise des Rasterkraftmikroskops (AFM)	57
Abbildung 5: Apremilast erhöht den cAMP-Spiegel in Keratinozyten.	64
Abbildung 6: Dosisabhängige Stärkung der Zelladhäsion durch Apremilast.	64
Abbildung 7: Apremilast wirkt protektiv gegen AK23-vermittelten Haftungsverlust in Keratinozyten ohne Einfluss auf die Aktivität der p38MAPK zu nehmen.	66
Abbildung 8: Immunfluoreszenzdarstellung von Dsg3 und Aktin nach 24h Inkubation von AK23 und Apremilast. Repräsentative Zusammenstellung aus N = 4.	67
Abbildung 9: Apremilast wirkt protektiv gegen PV-IgG-vermittelten Haftungsverlust in Keratinozyten.	69
Abbildung 10: Apremilast nimmt keinen Einfluss auf die Dsg3-Depletion durch PV-IgG.	71
Abbildung 11: Die Einzelmolekülbindungseigenschaften von Dsg3 werden von Apremilast nicht beeinflusst.	73
Abbildung 12: Apremilast nimmt keinen Einfluss auf die Dsc3- und E-Cadherin-Expression in HaCaT-Wildtyp-Zellen.	75
Abbildung 13: Apremilast nimmt keinen Einfluss auf die Dsg2-Expression in HaCaT-Wildtyp-Zellen.	76
Abbildung 14: Apremilast hemmt die Keratinretraktion in HaCaT-Wildtyp-Zellen.	79
Abbildung 15: Apremilast beeinflusst die Keratinretraktion in Keratinfilament-überexprimierenden Zellen.	81
Abbildung 16: 2h Behandlung mit Apremilast führt zu einer Phosphorylierung von Pg an Serin 665.	82
Abbildung 17: Pg-S665 beeinflusst die Zellhaftung der Keratinozyten.	85
Abbildung 18: Apremilast wirkt protektiv im <i>ex vivo</i> Hautmodell.	88
Abbildung 19: Lokalisation von Pg nach Behandlung mit Apremilast.	89
Abbildung 20: Auswirkungen des cAMP-Spiegels auf Zellmigration/-proliferation.	90
Abbildung 21: Übersicht der Wirkung von Apremilast auf die Zelladhäsion.	95

10.2. Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
Abb.	Abbildung
AFM	Rasterkraftmikroskopie (engl.: „Atomic force microscopy“)
ANOVA	einfaktorielle Varianzanalyse (engl.: „Analysis of variance“)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Cy2	Carbocyanin
Cy3	Indocarbocyanin
Cy5	Indodicarbocyanin
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. „deoxyribonucleic acid“)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
Dp	Desmoplakin
DPX	DPX Einschlussmittel für die Histologie
Dsc	Desmocollin
Dsg	Desmoglein
DTT	Dithiothreitol
ECL	verstärkte Chemilumineszenz (engl. „Enhanced chemiluminescence“)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (engl. „Epidermal growth factor receptor“)
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
EPAC	cAMP-aktiviertes Austauschprotein (engl. „Exchange protein directly activated by cAMP“)
FCS	Fetales Kälberserum (engl. „fetal calf serum“)
F/R	Forskolin/Rolipram
Fc	kristallisierbares Antikörperfragment (engl. „fragment frystallisable“)
gam	Ziege-anti-Maus-Fc (engl. „Goat anti-mouse“)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
garb	Ziege-anti-Kaninchen-Fc (engl. „Goat anti-rabbit“)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
G418	Geneticin
HBSS	Hanks gepufferte Salzlösung (engl.: „Hank’s balanced salt solution“)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HCl	Salzsäure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Jup	Plakoglobingen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton

KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
NaCl	Natriumchlorid
NaCNBH ₃	Natriumcyanoborhydrid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaF	Natriumfluorid
NaOH	Natriumhydroxid
NGS	normales Ziegenserum (engl.: „Normal goat serum“)
NPG	N-Propylgallat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PEG	Polyethylenglykol
Pg	Plakoglobin, γ-Catenin
Pg-KO	PG-Defizienz (engl. „PG knock out“)
PKA	Proteinkinase A
PKCα	Proteinkinase Cα
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pox	Peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. „rotations per minute“)
S	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. „Sodium dodecyl sulfate“)
SEM	Standardfehler (engl. „Standard error of the mean“)
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween
TEMED	Tetramethylethyldiamin
WB	Western Blot-Analyse
Wt	Wildtyp

11. Danksagung

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Herr Prof. Dr. Jens Waschke und meiner Betreuerin Frau Dr. Franziska Hartig-Vielmuth, die meine Motivation zu einem Einstieg in die Wissenschaft und dieser Doktorarbeit geweckt haben. Sie haben zum einen das Promotionsprojekt konzipiert und mich zum anderen über all die Jahre stets freundlich, herzlich und hilfsbereit als Ansprechpartner und Mentorin begleitet.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen weiteren wissenschaftlichen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Anatomischen Anstalt der LMU bedanken, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen und mich an ihren wissenschaftlichen Kenntnissen Teil haben lassen. Hierbei sind v.A. Herr Dr. Michael Fuchs, Frau Dr. Anna Sigmund, Frau Dr. Mariya Radeva, Herr Dr. Sunil Yeruva, Frau Dr. Daniela Kugelman und Herr Dr. Desalegn Egu zu nennen. Mein besonderer Dank gilt zudem Frau Dr. Sophia Engelmayer, die nach mir das Projekt in ihrer eigenen Dissertation fortgeführt hat und mit der ich gemeinsam Höhen und Tiefen der Laborarbeit durchleben durfte.

Ohne die fantastische Unterstützung unserer technischen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern wäre diese Arbeit ebenfalls nicht möglich gewesen. Hierbei möchte ich mich neben Frau Martina Hitzenbichler, Frau Sabine Mühlisimer und Herrn Kilian Skowranek vor allem bei Frau Andrea Wehmayer bedanken, die mir die ersten Schritte in einem medizinischen Labor beigebracht hat.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freundinnen und Freunden bedanken, die mir während der intensiven Zeit in der Forschung, aber auch davor und danach und generell immer im Leben die Kraft, Mut und Energie geben, das zu tun was ich möchte.

12. Affidavit

			
Eidesstattliche Versicherung			

Winkler, Markus

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

„cAMP-abhängige Signalkomplexe bei Pemphigus vulgaris“

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

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

Berlin, 25.01.2026

Ort, Datum

Markus Winkler

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

14. Publikationsliste

- 2022 **Apremilast prevents blistering in human epidermis and stabilizes keratinocyte adhesion in pemphigus.**
Sigmund AM, **Winkler M**, Engelmayer S, et al., Nat Commun. 2023 Jan 9;14(1):116. doi: 10.1038/s41467-022-35741-0. PMID: 36624106; PMCID: PMC9829900.
- 2022 **Mural Wnt/ β -catenin signaling regulates Lama2 expression to promote neurovascular unit maturation.**
Biswas S, Shahriar S, Giangreco NP, Arvanitis P, **Winkler M**, Tatonetti NP, Brunken WJ, Cutforth T, Agalliu D. Development. 2022 Sep 1;149(17):dev200610. doi: 10.1242/dev.200610. Epub 2022 Sep 13. PMID: 36098369.
- 2021 **Management lessons through an interactive online discussion about hospital management during the COVID-19 pandemic.**
Leunig A., **Winkler M.**, Gernert JA., Graupe T., Dimitriadis K. GMS J Med Educ. 2021 Jan 28;38(1):Doc25. doi: 10.3205/zma001421. PMID: 33659630; PMCID: PMC7899108.