

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Universität Würzburg
Lehrstuhl für Anatomie II
Vorstand: Professor Dr. med. Süleyman Ergün

Interaktion ausgewählter Mechanismen der Pemphigus-Pathogenese

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Bettina Kempf
aus Weidenberg

Würzburg, Januar 2020



Referent: Prof. Dr. med. Süleyman Ergün
Koreferent: Prof. Dr. med. Nicolas Schlegel
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2020

Die Promovendin ist Ärztin.

für Martin und Antonia

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Historische und zellbiologische Grundlagen	1
1.1.1 Epidermis	1
1.1.2 Zellskelett	2
1.1.3 Zellkontakte	2
1.1.4 Desmosomen	3
1.1.5 Desmosomale Cadherine	4
1.1.5.1 Verteilung in der Epidermis	5
1.1.5.2 Aufbau	5
1.1.5.3 Adhäsion	6
1.1.5.4 Weitere Funktionen	8
1.1.6 Erkrankungen der Haut aufgrund von Beeinträchtigungen der Desmosomen	8
1.2 Pemphigus	9
1.2.1 Epidemiologie	9
1.2.2 Klinik	10
1.2.3 Diagnostik	11
1.2.4 Therapie	12
1.3 Pathogenese des Pemphigus	14
1.3.1 Induktion der Erkrankung durch Autoantikörper	15
1.3.2 Direkte Inhibition der Desmoglein-Adhäsion	17
1.3.3 Desmoglein-Kompensationstheorie	18
1.3.4 Dsg3-Depletion und extradesmosomale Desmogleine	19
1.3.5 Signaltransduktionsabhängige Mechanismen beim Pemphigus	21
1.3.5.1 Spezifische Proteolyse	22
1.3.5.2 p38MAPK	23
1.3.5.3 Plakoglobin und c-Myc	24
1.3.5.4 EGF-Rezeptor und Src	25

Inhaltsverzeichnis

1.3.5.5 Apoptose	27
1.3.5.6 Aktin-Zytoskelett und Rho-GTPasen	28
1.3.5.7 Keratin-Zytoskelett	30
1.3.5.8 Proteinkinase C und zelluläre Rettungswege	31
1.4 Fragestellung und Zielsetzung	33
2 Material und Methoden	35
2.1 Zellkultur	35
2.2 Patientenserum	35
2.3 Testreagenzien	36
2.4 Antikörper	38
2.5 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie	38
2.6 Proteinnachweis in Keratinozyten	39
2.6.1 Gewinnung der Zellysate	39
2.6.1.1 Lysate vollständiger Zellen	40
2.6.1.2 Triton X-100-vermittelte Proteinextraktion	40
2.6.2 Proteinkonzentrationsbestimmung	41
2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
2.6.4 Western-Blot und Chemilumineszenz-Verfahren	42
2.7 Laserpinzette	43
2.7.1 Funktionsprinzip der Laserpinzette	44
2.7.2 Herstellung der Dsg3-beschichteten Mikroperlen	44
2.7.3 Anwendung der Laserpinzetten-Technik	46
2.8 Dispase-basierter Keratinozytendissoziationsversuch	46
2.9 Auswertung der Daten und grafische Darstellung	48
2.10 Verzeichnisse der verwendeten Geräte und Chemikalien	48
3 Ergebnisse	53
3.1 Zeitabfolge der PV-IgG-vermittelten Effekte auf Keratinozyten	53
3.1.1 Zellkohäsion ist bereits nach 30 Min. signifikant reduziert und nimmt danach weiter ab	53
3.1.2 Dsg3-Adhäsion sinkt innerhalb von 120 Min. stetig ab	53
3.1.3 Reorganisation von Dsg3 beginnt nach 90 Min.	54
3.1.4 Depletion tritt nach 24 Std. in der extradesmosomalen Dsg3-Fraktion auf	55
3.1.5 p38MAPK ist von 30 bis 120 Min. aktiviert	56

Inhaltsverzeichnis

3.2	Auswirkung des p38MAPK-Signalwegs auf Zelldissoziation und Dsg3-vermittelte Adhäsion	57
3.3	Rolle weiterer intrazellulärer Signalwege	59
3.3.1	Inhibition des EGFR verringert den Verlust der Dsg3-Adhäsion durch PV-IgG, reduziert aber nicht die Zelldissoziation	59
3.3.2	Caspase-Inhibition reduziert den Adhäsionsverlust von Dsg3 unter PV-IgG, hat jedoch keinen Einfluss auf die Zelldissoziation	60
3.4	Bedeutung des Aktin-Zytoskeletts	61
3.4.1	Destabilisierung des Aktin-Zytoskeletts führt zur Reorganisation von Dsg3	61
3.4.2	PV-IgG-vermittelte Dsg3-Reorganisation wird durch Aktin-Stabilisierung abgemildert	62
3.4.3	Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts verhindert den PV-IgG-vermittelten Verlust der Dsg3-Adhäsion	63
3.4.4	Interaktion des p38MAPK-Signalwegs mit dem Aktin-Zytoskelett	63
3.5	Einfluss des Differenzierungsgrades der Keratinozyten	66
3.5.1	Depletion von extradesmosomalem Dsg3 findet in weniger differenzierten Keratinozyten bereits nach zwei Std. statt	66
3.5.2	Zelldissoziation ist unabhängig vom Differenzierungsgrad der Keratinozyten und von der Depletion des extradesmosomalen Dsg3	67
3.6	Vergleich der Auswirkungen eines Dsg-spezifischen Peptids (SP) mit AK23 und PV-IgG	69
3.6.1	Die Reduktion der Zellkohäsion weist unter AK23 und SP keine signifikanten Unterschiede zu PV-IgG auf	69
3.6.2	Der Rückgang der Dsg3-Adhäsion zeigt unter AK23 und SP einen ähnlichen Verlauf wie unter PV-IgG	70
3.6.3	Partielle Depletion von Dsg3 tritt unter AK23 zum gleichen Zeitpunkt auf wie unter PV-IgG	70
3.6.4	AK23 und SP aktivieren p38MAPK wie PV-IgG nach 30 Min.	71
3.7	Modulation der Effekte von AK23 und PV-IgG durch ein Dsg-quervernetzendes Peptid (TP)	73
3.7.1	TP reduziert die Zelldissoziation	73
3.7.2	TP vermindert die Antikörper-induzierte Aktivierung von p38MAPK	74
4	Diskussion	77
4.1	Eine Dsg3-Depletion ist für die frühen Stadien der Pemphigus-Pathogenese nicht erforderlich	77
4.2	Die Depletion von extradesmosomalem Dsg3 hängt vom Differenzierungsgrad der Keratinozyten ab	78

Inhaltsverzeichnis

4.3	Der p38MAPK-Signalweg spielt eine wichtigere Rolle in der Pemphigus-Pathogenese als EGFR und Caspasen	79
4.4	p38MAPK wirkt über eine Beeinflussung des Zytoskeletts	81
4.5	Aktin beeinflusst die Verteilung und Adhäsionsstärke von Dsg3	81
4.6	Nicht-Desmoglein-Autoantikörper spielen keine wesentliche Rolle bei dem durch Pemphigus-Autoantikörper vermittelten Haftungsverlust	83
4.7	Direkte Inhibition der Dsg3-Adhäsion und intrazelluläre Signaltransduktion wirken zusammen	84
4.8	Ausblick	85
5	Zusammenfassung	87
6	Literaturverzeichnis	89
7	Anhang	115
7.1	Abkürzungsverzeichnis	115
7.2	Tabellenverzeichnis	118
7.3	Abbildungsverzeichnis	119
7.4	Publikationsverzeichnis	121
7.4.1	Originalarbeiten	121
7.4.2	Kongressbeitrag	121

1 Einleitung

1.1 Histologische und zellbiologische Grundlagen

1.1.1 Epidermis

Die Epidermis erfüllt als äußerste Hautschicht eine Vielzahl an lebenswichtigen Funktionen für den Organismus. Insbesondere bildet sie eine stabile Barriere, die den Körper vor schädigenden äußeren Einflüssen wie mechanischen und chemischen Belastungen, Dehydratation, sowie dem Eindringen von Schadstoffen und Mikroorganismen schützt. Im Fall einer Verletzung passt sie sich an die geänderten Anforderungen an und zeigt eine hohe Kapazität für eine effektive Wundheilung. (Rötzer et al., 2016; Garrod, 2010; Fuchs und Raghavan, 2002; Lüllmann-Rauch, 2003)

Die Keratinozyten, die etwa 90 % der Zellen in der Epidermis ausmachen, sind in vier Ebenen angeordnet und bilden ein mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel. Die unterste Schicht ist das aus einer einzigen Lage an zylindrischen Zellen bestehende Stratum basale. Es liegt einer Basalmembran aus extrazellulärer Matrix auf, die es von der Dermis trennt. (Lüllmann-Rauch, 2003) Im Stratum basale sitzen die proliferativen epidermalen Stammzellen, aus denen durch Mitose immer neue Keratinozyten hervorgehen. Diese teilen sich zunächst entweder weiter oder sie treten in den Prozess der terminalen Differenzierung ein, im Zuge dessen sie durch das Stratum spinosum und das Stratum granulosum nach außen bis ins oberflächliche Stratum corneum wandern. Dabei sind sie einer kontinuierlichen Transformation unterworfen. (Fuchs und Raghavan, 2002; Drenckhahn, 2004) Sie werden flacher, verlieren ihren Zellkern und bilden letztlich avitale Hornplättchen, die mit der Zeit abgeschilfert und von nachrückenden Zellen ersetzt werden. Auf diese Weise erneuert sich die Epidermis etwa alle vier Wochen. (Lüllmann-Rauch, 2003)

Neben den Keratinozyten gibt es in der Epidermis weitere Zellen, die in geringerer Anzahl vorkommen und verschiedene Funktionen übernehmen. Die aus dem Knochenmark stammenden interdigitierenden dendritischen Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr der Haut, Merkel-Zellen dienen der Rezeption von Druck und die aus der Neuralleiste eingewanderten Melanozyten bilden den Farbstoff Melanin, der in Form von Melanosomen an Keratinozyten abgegeben wird und dort dem Schutz vor UV-Strahlung dient. (Fuchs und Raghavan, 2002; Lüllmann-Rauch, 2003)

1.1.2 Zellskelett

Das Zytoskelett durchzieht als dreidimensionales Netzwerk das Zytosol und erfüllt maßgebliche Aufgaben bei der Stabilisierung der Zellen, bei Zellbewegungen, sowie bei intrazellulären Transportvorgängen (Vasioukhin et al., 2000; Bär et al., 2014; Moujaber und Stochaj, 2019). Es besteht aus drei Anteilen mit spezifischen Funktionen, dem Aktin-Zytoskelett (Gliem et al., 2010; Tsang et al., 2012a; Hall und Nobes, 2000; Vasioukhin et al., 2000), den Intermediärfilamenten (Bär et al., 2014; Seltmann et al., 2013a; Vielmuth et al., 2018c) und den Mikrotubuli (Moujaber und Stochaj, 2019).

Mikrotubuli bestehen aus Dimeren, die sich jeweils aus einem α - und einem β -Tubulin zusammensetzen und sich zu hohlen, langen Filamenten anordnen. Diese fungieren als Transportmechanismus für Zellorganellen und als mechanische Stützen. Zudem sind sie an der Mitose beteiligt und ermöglichen die Bewegung von Zellfortsätzen. (Moujaber und Stochaj, 2019; Lüllmann-Rauch, 2003)

Aktinfilamente (F-Aktin) sind sehr dynamisch. Die Monomere (G-Aktin) können rasch zu F-Aktin polymerisieren und auch wieder depolymerisieren, was einen bedarfsorientierten schnellen Umbau des Systems ermöglicht. Neben Stressfasern findet sich in den Keratinozyten F-Aktin netzartig in der Peripherie unter der Plasmamembran und ist dort mit Zellkontakten verbunden. (Lee und Dominguez, 2010; Parsons et al., 2010; Gliem et al., 2010; Vasioukhin et al., 2000; Tsang et al., 2012a; Waschke et al., 2006; Lüllmann-Rauch, 2003)

In Epithelien kommen Zytokeratine als spezifischer Typ von Intermediärfilamenten vor. Sie bestehen aus zusammengelagerten länglichen Molekülen und bilden ein stabiles Gerüst mit Verbindungen zu Zellkontakten und zu den weiteren Komponenten des Zellskeletts. Auch sie können bei Bedarf umgebaut werden. Im Verlauf der Differenzierung werden in den Keratinozyten unterschiedliche Arten von Tonofilamenten exprimiert. Sie bestehen in den Basalzellen aus Zytokeratin 5 und 14, ab dem Stratum spinosum dagegen aus Zytokeratin 1 und 10. (Schlögl et al., 2018; Vielmuth et al., 2018c; Lüllmann-Rauch, 2003; Drenckhahn, 2008)

1.1.3 Zellkontakte

Unter Zellkontakten versteht man einerseits Verbindungen zwischen benachbarten Zellen (Zell-Zell-Kontakte) und andererseits Verbindungen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix (Zell-Matrix-Kontakte). (Fuchs und Raghavan, 2002; Drenckhahn, 2008; Lüllmann-Rauch, 2003)

Zell-Zell-Kontakte unterscheiden sich in Bezug auf ihren Aufbau und ihre Funktion. In der menschlichen Epidermis dienen Verschlusskontakte (Tight junctions) im Stratum granulosum zur Versiegelung der Interzellularspalten zwischen den Keratinozyten. Gemeinsam mit den extrazellulären Lipiden im Stratum corneum entsteht so eine dichte Diffusionsbarriere. Kommu-

1 Einleitung

nikationskontakte (Gap junctions) ermöglichen eine funktionelle Kopplung der Keratinozyten. (Lüllmann-Rauch, 2003)

Daneben sorgen Adhärenskontakte und Desmosomen für die Stabilität der Epidermis, indem sie die Zellen mechanisch aneinander verankern. Beide Arten von Haftkontakten zeigen eine ähnliche Grundstruktur. Transmembranproteine einer Zelle binden im Extrazellularraum an die korrespondierenden Transmembranproteine der Nachbarzelle. An der Innenseite der Zellmembran sind sie über Plaque-Proteine mit dem Zellskelett verbunden, im Fall der Adhärenskontakte mit dem Aktin-Zytoskelett und im Fall der Desmosomen mit den Intermediärfilamenten. So entsteht ein stabiler dreidimensionaler Komplex, in dem Zugkräfte übertragen werden können, was die hohe mechanische Widerstandsfähigkeit des Zellverbandes gewährleistet. (Waschke, 2008; Garrod, 2010; Lüllmann-Rauch, 2003; Fuchs und Raghavan, 2002)

1.1.4 Desmosomen

Desmosomen stellen sich als diskontinuierlich an der Zellmembran verteilte punktförmige Strukturen dar (Fuchs et al., 2019; Waschke, 2008), weshalb sie auch Maculae adhaerentes genannt werden (Farquhar und Palade, 1963). Da sie einen entscheidenden Beitrag zur Zellkohäsion leisten, kommen sie besonders zahlreich in mechanisch stark beanspruchten Geweben wie der Epidermis, den Schleimhäuten und dem Myokard vor (Waschke, 2008), wo sie den Zellverband gegen Zug- und Scherkräfte stabilisieren (Fuchs et al., 2019; Garrod, 2010; Waschke, 2008; Fuchs und Raghavan, 2002).

Jedes Desmosom besteht aus mehreren im Elektronenmikroskop sichtbaren Komponenten. An den Innenseiten der Zellmembranen der beiden beteiligten Zellen liegen sich zwei elektronendichte Plaques gegenüber (Al-Amoudi et al., 2011; He et al., 2003). Sie sind parallel zueinander angeordnet und rund oder oval geformt. In die Plaques strahlen Intermediärfilamente ein. Der Interzellularspalt hat im Bereich des Desmosoms eine Breite von ca. 24 nm. In seiner Mitte befindet sich eine Schicht aus elektronendichtem Material, genannt Desmoglea. (Fuchs et al., 2019; Farquhar und Palade, 1963; North et al., 1999; He et al., 2003)

Molekularbiologisch bestehen diese Strukturen aus Proteinen, die drei Gruppen angehören. Im Interzellularspalt gehen Transmembranproteine aus der Cadherinfamilie, die Desmogleine (Dsg) und Desmocolline (Dsc), an ihren extrazellulären Domänen Verbindungen mit den Cadherinen der benachbarten Zelle ein und bilden so die elektronenmikroskopisch abgrenzbare Desmoglea im Interzellularspalt. (Al-Amoudi et al., 2011, 2007; He et al., 2003) Die Cadherine erstrecken sich durch die Zellmembran in die darunter liegenden elektronendichten Plaques und sind dort mit Plakoglobin aus der Armadillo-Proteinfamilie verbunden (Korman et al., 1989; Smith und Fuchs, 1998; Chitaev et al., 1996; Kowalczyk et al., 1997). Plakoglobin wiederum haftet an einem weiteren Plaqueprotein, Desmoplakin aus der Plakin-Familie (Kowalczyk et al., 1997), welches

1 Einleitung

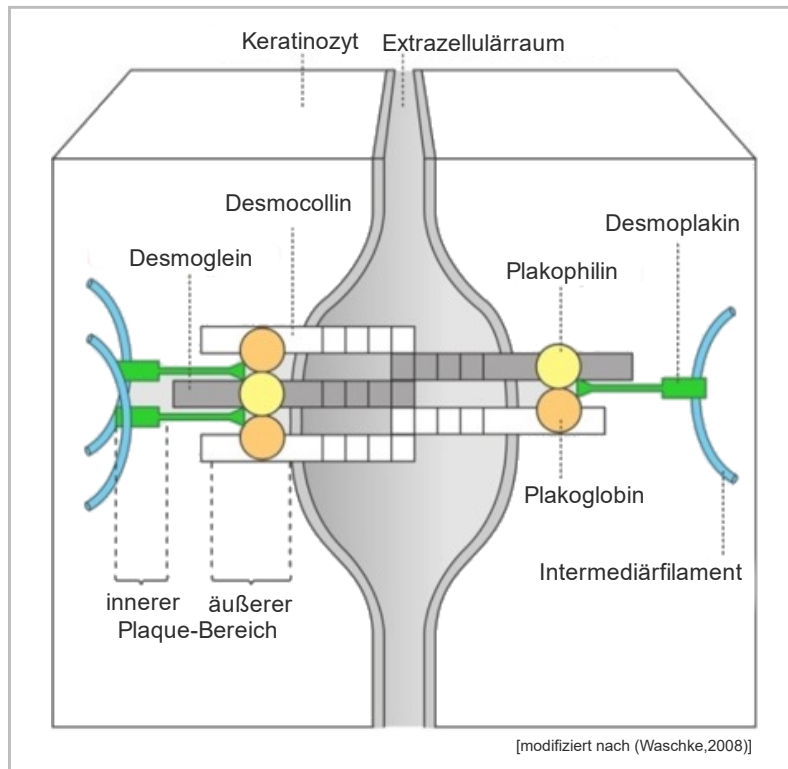


Abb. 1.1: Aufbau eines Desmosoms

Im Extrazellulärraum haften die desmosomalen Cadherine (Desmoglein und Desmocollin) zweier benachbarter Keratinozyten aneinander. Sie erstrecken sich durch die jeweilige Zellmembran ins Zytoplasma und adhären dort im äußeren Bereich der desmosomalen Plaque an Plakoglobin. Dessen Bindung an Desmoplakin wird durch Plakophilin unterstützt. Desmoplakin wiederum reicht bis in den inneren Plaquebereich, wo es mit einstrahlenden Intermediärfilamenten verknüpft ist.

Auf diese Weise erzeugt das Desmosom eine Verbindung zwischen den Zytoskelettsystemen der nebeneinander liegenden Keratinozyten und schafft damit die Voraussetzung für den stabilen Zellverbund der Epidermis. (Waschke, 2008)

(Die Genehmigung des Verlages für den Abdruck der Abbildung liegt vor.)

an den Intermediärfilamenten des Zellskeletts verankert ist (Dehner et al., 2014; Godsel et al., 2005; Smith und Fuchs, 1998). Die Plakophiline 1-3 aus der Armadillo-Familie, die sowohl an andere Plaqueproteine als auch an Cadherine und bestimmte Keratinfilamente binden können, stabilisieren die Zelladhäsion (Fuchs et al., 2019; Hatzfeld et al., 2000; Chen et al., 2002; Bonn  et al., 2003; Smith und Fuchs, 1998; Cirillo und Prime, 2009; Godsel et al., 2005) (s. Abb. 1.1).

1.1.5 Desmosomale Cadherine

Die Transmembranproteine der Desmosomen werden in zwei Gruppen unterteilt, benannt als Desmogleine und Desmocolline (Harrison et al., 2016; Buxton et al., 1993). Bislang wurden sieben verschiedene Unterformen identifiziert: vier Desmogleine (Dsg1-4) und drei Desmocolline (Dsc1-3) (Harrison et al., 2016; Waschke, 2008), wobei die Desmocolline noch jeweils zwei durch alternatives Spleißen entstandene Isoformen a und b aufweisen (Buxton et al., 1993; Bonn  et al., 2003).

1.1.5.1 Verteilung in der Epidermis

Die desmosomalen Cadherine zeigen eine gewebs- und differenzierungsspezifische Verteilung. Während Dsg2 und Dsc2 ubiquitär in allen desmosomenhaltigen menschlichen Geweben und auch in vielen Tumoren vorkommen, sind Dsg1 und 3, sowie Dsc1 und 3 nur in mehrschichtigen Epithelien vertreten, beispielsweise in der Epidermis. (Schäfer et al., 1994; Nuber et al., 1995) Das im Jahr 2003 erstmals beschriebene Dsg4 wurde in vielen verschiedenen Geweben, unter anderem auch in der Epidermis und Mundschleimhaut nachgewiesen (Whittock und Bower, 2003; Mahoney et al., 2006).

In der Epidermis findet sich Dsg1 basal und peribasal nur in geringem Ausmaß, nach außen hin nimmt die Menge an Dsg1 in den Desmosomen jedoch deutlich zu, mit stärkster Ausprägung im Stratum granulosum (Arnemann et al., 1993; Spindler et al., 2009). Dsg2 dagegen liegt in adulter Haut vor allem in den Haarfollikeln und nur in geringen Mengen im Stratum basale vor (Arnemann et al., 1993; Hartlieb et al., 2013). Dsg3 ist vom Stratum basale bis ins untere Stratum granulosum vertreten (Arnemann et al., 1993; Mahoney et al., 2006). Dsg4 findet sich nur in den oberflächlichen epidermalen Schichten und in den Haarfollikeln (Mahoney et al., 2006). Dsc1 konnte im oberen Stratum spinosum und im Stratum granulosum, nicht aber in den tieferen Abschnitten der Epidermis nachgewiesen werden (Arnemann et al., 1993; King et al., 1995). Im Gegensatz dazu sind Dsc2 und Dsc3 in allen lebenden Schichten der Epidermis vorhanden (King et al., 1995) (s. Abb. 1.2).

Die Verteilung der desmosomalen Cadherine in der oralen Mukosa unterscheidet sich hiervon deutlich. Dsg1 und Dsg3 sind dort in allen vitalen Schichten exprimiert (Mahoney et al., 1999a), am stärksten in den oberen zwei Dritteln. Insbesondere basal ist Dsg1 jedoch in wesentlich geringerer Menge anzutreffen als Dsg3 (Shirakata et al., 1998) oder nicht nachweisbar (Egu et al., 2019). Dsg2 findet sich ausschließlich in der basalen Lage (Egu et al., 2019). Dsg4 wiederum ist dort nicht zu finden, aber in allen anderen Schichten stark vertreten (Mahoney et al., 2006). Dsc1 fehlt in der oralen Mukosa vollständig (Egu et al., 2019), wohingegen Dsc2 und Dsc3 ubiquitär nachgewiesen wurden (King et al., 1995) (s. Abb. 1.2).

1.1.5.2 Aufbau

Die Desmogleine und Desmocolline sind auf Chromosom 18 codiert (Dusek et al., 2007; King et al., 1995). Ihr Aufbau ist dem der klassischen Cadherine in den Adhärenskontakten sehr ähnlich. Sie besitzen jeweils einen N-terminalen extrazellulären Anteil, bestehend aus fünf extrazellulären Domänen (EC1-5). Dazwischen liegen Verbindungsstücke, die Ca^{2+} -Bindungsstellen aufweisen. (Harrison et al., 2016; Zenzo et al., 2012; Boggon et al., 2002) An EC5 schließt sich eine transmembranäre und an diese wiederum eine aus mehreren Anteilen bestehende intrazelluläre C-terminale Domäne an, welche an Plaqueproteine binden kann. (Dusek et al.,

1 Einleitung

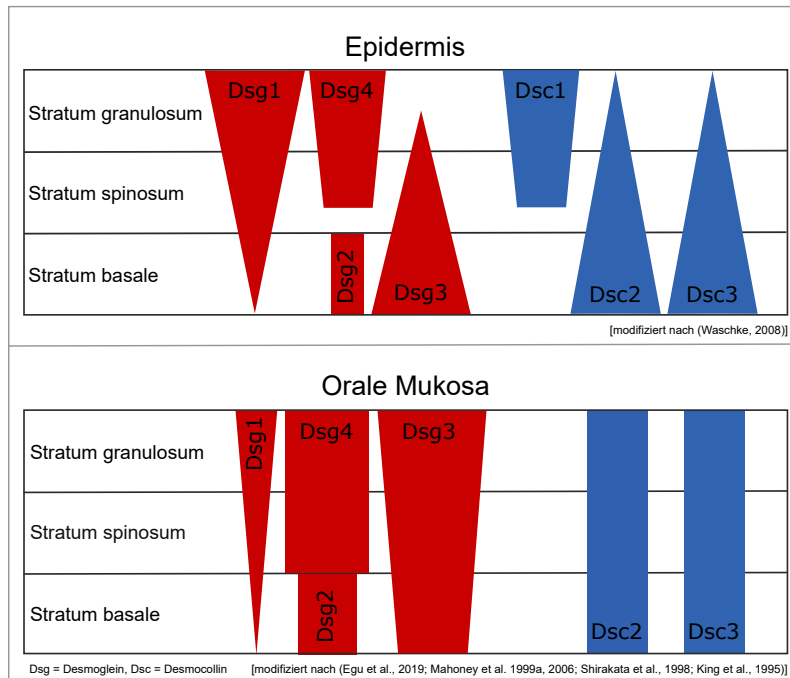


Abb. 1.2: Expressionsmuster desmosomaler Cadherine

Die vier Desmogleine (Dsg) und drei Desmocolline (Dsc) sind in den Desmosomen der Epidermis und der oralen Mukosa in unterschiedlicher Menge vorhanden und weisen zudem spezifische Verteilungsmuster innerhalb der drei lebenden Epithelschichten auf. (Waschke, 2008)

Von besonderer Bedeutung (s. Abschnitt 1.3.3) ist dabei einerseits die deutlich geringere Expression von Dsg1 in der Mukosa verglichen mit der Epidermis, sowie andererseits die Tatsache, dass Dsg3 im oberflächlichen Bereich der Epidermis kaum, in der Mukosa dagegen in allen Schichten stark exprimiert wird. Dsc1 fehlt in der oralen Mukosa vollständig. (Egu et al., 2019; Mahoney et al., 1999a, 2006; Shirakata et al., 1998; King et al., 1995)

(Die Grafik zum Expressionsmuster in der Epidermis wurde erstellt anhand einer Grafik aus (Waschke, 2008). Die Genehmigung des Verlages für den Abdruck der Abbildung liegt vor.

Die Grafik zum Expressionsmuster in der oralen Mukosa wurde erstellt anhand einer Grafik aus (Mahoney et al., 1999a). Die Genehmigung des Verlages für den Abdruck der Abbildung liegt vor. Zudem wurden Informationen aus den weiteren angegebenen Quellen einbezogen, die dort jeweils im Text genannt sind.)

2007; Green und Simpson, 2007; Whittock und Bower, 2003; Wheeler et al., 1991; Boggon et al., 2002)

1.1.5.3 Adhäsion

Die Adhäsionsfähigkeit der desmosomalen Cadherine ist, ebenso wie die der klassischen Cadherine, abhängig von der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Nie et al., 2011; Tucker et al., 2014; Chitaev und Troyanovsky, 1997; Watt et al., 1984; Syed et al., 2002; Heupel et al., 2008; Waschke et al., 2007, 2005; Windoffer et al., 2002; Marozzi et al., 1998). Beispielsweise wurde für homophile Verbindungen von Dsg1 in vitro eine maximale Adhäsionsstärke bei 1 mM Ca^{2+} festgestellt, während bei Konzentrationen von unter 0,7 mM Ca^{2+} keine nennenswerte Haftung nachweisbar war (Waschke et al., 2007; Waschke, 2008). Die niedrigste Ca^{2+} -Konzentration, unter der sich Dsc2-, Dcs3-, Dsg2- und Dsg3-Dimere in kultivierten humanen Keratinozyten zeigen ließen, lag bei 0,2 mM. Die Anzahl der Dimere stieg dabei mit ansteigender Ca^{2+} -

1 Einleitung

Konzentration ebenfalls an, was die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Verbindungen weiter untermauert. (Nie et al., 2011)

In mehreren Studien konnten sowohl homophile als auch heterophile Verbindungen zwischen Desmogleinen und Desmocollinen nachgewiesen werden. So sind homophile Kontakte sowohl für Dsg1 (Waschke et al., 2007; Heupel et al., 2008; Waschke et al., 2005; Marcozzi et al., 1998; Vielmuth et al., 2018c) als auch für Dsg2 (Vielmuth et al., 2018c; Schinner et al., 2017; Ungewiß et al., 2017; Nie et al., 2011) und Dsg3 (Amagai et al., 1994; Nie et al., 2011; Heupel et al., 2008; Vielmuth et al., 2015a, 2018c), sowie für Dsc2 (Nie et al., 2011; Syed et al., 2002; Marcozzi et al., 1998) und Dsc3 (Nie et al., 2011; Spindler et al., 2009; Vielmuth et al., 2018c) bekannt. Heterophile Verbindungen wurden zwischen Dsc1a und Dsg2 (Chitaev und Troyanovsky, 1997), Dsg1 und Dsc2a (Marcozzi et al., 1998), Dsg2 und Dsc2 (Syed et al., 2002), sowie Dsg1 und Dsc3 (Spindler et al., 2009) gefunden, ebenso wie heterophile Interaktionen von Dsg3 mit Dsg1, Dsg2 oder Dsc3 (Vielmuth et al., 2018c). Harrison et al. zeigte darüber hinaus, dass alle Desmogleine stark mit allen Desmocollinen interagieren, fand jedoch keine oder nur sehr schwache homophile Bindungen (Harrison et al., 2016). Im Gegensatz dazu stellte eine Studie von Nie et al. in lebenden Keratinozyten diverse homophile Interaktionen, jedoch keine Hinweise auf heterophile Verbindungen fest (Nie et al., 2011). Demnach liegen unterschiedliche Erkenntnisse über die jeweiligen Haftungspartner der desmosomalen Cadherine vor. Zusammengefasst scheint es, dass sowohl homophile als auch heterophile Verbindungen eine Rolle für die Stabilität der Desmosomen spielen (Vielmuth et al., 2018a; Spindler et al., 2009; Harrison et al., 2016; Marcozzi et al., 1998).

Auf welche Weise die desmosomalen Cadherine benachbarter Keratinozyten aneinander haften, ist ebenfalls noch nicht vollständig geklärt. Die äußerste extrazelluläre Domäne EC1 scheint dabei die wichtigste Funktion einzunehmen. (He et al., 2003; Waschke, 2008; Sekiguchi et al., 2001) Dort befindet sich bei den ausführlich untersuchten klassischen Cadherinen die Zelladhäsionserkennungsstelle (engl. cell adhesion recognition site: CAR) (Blaschuk et al., 1990), an der ein Strangaustausch zwischen den interagierenden Cadherinen stattfindet, bei dem insbesondere ein an Aminosäureposition 2 der EC1-Domäne lokalisierter Tryptophan-Rest (Trp2) eine wichtige Rolle spielt (Boggon et al., 2002). Auch die sehr ähnlich aufgebauten desmosomalen Cadherine besitzen korrespondierende Bereiche an ihren EC1-Domänen, die offenbar CARs entsprechen. Ein wichtiges Indiz dafür sind Studien mit kurzen Peptiden, die spezifisch an diese angenommenen CARs von Dsg1 oder Dsc1 (Tselepis et al., 1998), bzw. Dsg2, Dsg3, Dsc2 oder Dsc3 (Runswick et al., 2001) binden und dadurch die desmosomale Adhäsion blockieren können. (Tselepis et al., 1998; Runswick et al., 2001) Bei der Interaktion der Desmogleine und Desmocolline scheint im CAR-Bereich ebenfalls ein Strangaustausch unter Beteiligung von Trp2 stattzufinden (Harrison et al., 2016), der es erlaubt, sowohl Verbindungen zu den Cadherinen der Nachbarzellen (Trans-Verbindungen) als auch zu weiteren Cadherinen der

eigenen Zelle (Cis-Verbindungen) aufzubauen (He et al., 2003; Al-Amoudi et al., 2007; Harrison et al., 2016; Syed et al., 2002; Nie et al., 2011; Zenzo et al., 2012).

1.1.5.4 Weitere Funktionen

Lange Zeit wurde die Zelladhäsion als einzige Aufgabe der Desmosomen wahrgenommen. Nach und nach stellte sich allerdings in den vergangenen Jahren heraus, dass Komponenten der Desmosomen noch vielfältige weitere Funktionen erfüllen. So können sie die intrazelluläre Signaltransduktion beeinflussen und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellproliferation und -differenzierung, bei Entzündungsvorgängen und der malignen Entartung von Zellen (Samuelov und Sprecher, 2015; Müller et al., 2008; Green und Simpson, 2007), sowie bei der Morphogenese und der korrekten Anordnung unterschiedlicher Zellen in Geweben (Runswick et al., 2001). Beispielsweise fungieren Proteine der Cadherinfamilie als Membranrezeptoren, die auf extrazelluläre Veränderungen reagieren und in der Folge komplexe intrazelluläre Signalwege steuern (Müller et al., 2008) und auch desmosomale Plaque-Proteine wie Plakoglobin und Plakophilin sind an solchen Signalkaskaden beteiligt (Williamson et al., 2006; Godsel et al., 2010).

1.1.6 Erkrankungen der Haut aufgrund von Beeinträchtigungen der Desmosomen

Da die Desmosomen bei vielen Vorgängen im menschlichen Organismus eine wichtige Rolle spielen, können Störungen ihrer Funktion schwerwiegende Erkrankungen auslösen. In der Haut unterscheidet man dabei in erster Linie genetische (Genodermatosen) von erworbenen Veränderungen der Desmosomen und ihrer Komponenten. (Samuelov und Sprecher, 2015)

Die desmosomalen Genodermatosen werden durch Mutationen an Genen ausgelöst, die für Bestandteile der Desmosomen codieren. Phänotypisch kann sich diese Gruppe von Erkrankungen an der Haut, den Haaren und zusätzlich dem Herzen manifestieren. Die am häufigsten auftretenden Symptome in der Haut sind Hypotrichose oder Alopezie, Fragilität der Haut, palmo-plantare Keratodermie, sowie im Herzen die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie oder die linksventrikuläre dilatative Kardiomyopathie. Oft treten mehrere Symptome gemeinsam in verschiedenen Kombinationen auf. (Samuelov und Sprecher, 2015)

Unter den erworbenen Störungen der Desmosomen differenziert man zwischen Krankheiten mit einer infektiösen und jenen mit einer autoimmunen Genese. Zu der ersten Gruppe zählt das Staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS), das nach dem Erstbeschreiber von 1878 auch Morbus Ritter genannt wird. Es wird durch eine Infektion mit Staphylokokkus aureus ausgelöst. (Waschke, 2008; Amagai, 2003) Dieses Bakterium bildet exfoliative Toxine, die Dsg1 spalten (Hanakawa et al., 2002), wodurch es zu einer oberflächlichen Blasenbildung der Epidermis kommt (Amagai et al., 2000, 2002).

1 Einleitung

Interessanterweise ist das histologische Bild des SSSS dem einer anderen Erkrankung zum Verwechseln ähnlich. Es handelt sich dabei allerdings nicht um eine weitere Infektion, sondern um die Autoimmundermatose Pemphigus foliaceus (PF). Bei beiden Erkrankungen ist mit Dsg1 das gleiche Zielprotein betroffen, das beim PF allerdings nicht von einem bakteriellen Toxin, sondern von Autoantikörpern angegriffen wird. So erklärt sich die identische oberflächliche Blasenbildung der Epidermis. (Amagai et al., 2000; Amagai, 2009, 2003)

1.2 Pemphigus

Der vorstehend beschriebene PF zählt zu den bullösen Autoimmundermatosen, einer Gruppe von erworbenen blasenbildenden Hauterkrankungen, bei denen das Immunsystem aus bisher ungeklärter Ursache körpereigene Strukturen fälschlicherweise als fremd erkennt und versucht, diese zu zerstören. Hierzu werden je nach Krankheitsentität Antikörper (Autoantikörper) gegen verschiedene kutane Strukturproteine (Autoantigene) gebildet. (Rassner, 2007) Die Gruppe der Pemphigus-Erkrankungen ist durch eine intraepidermale Blasenbildung charakterisiert, die man histologisch als Akantholyse bezeichnet. Sie umfasst zwei Hauptformen: den Pemphigus vulgaris (PV) und den PF. Darüber hinaus gibt es weitere seltenere Subtypen, unter anderem den paraneoplastischen Pemphigus, der im Zusammenhang mit einigen malignen Tumorerkrankungen auftritt (Rassner, 2007; Kneisel und Hertl, 2011a), oder den arzneimittelinduzierten Pemphigus, der beispielsweise durch Penicillamin oder Captopril ausgelöst wird (Korman et al., 1991). Einige Varianten des Pemphigus finden sich nicht nur beim Menschen, sondern auch bei Hunden, Katzen und Pferden (Scott et al., 1983).

1.2.1 Epidemiologie

Zur Epidemiologie des Pemphigus existieren in der Literatur unterschiedliche Angaben, was sich dadurch erklären lässt, dass die Inzidenz und Prävalenz, ebenso wie die Alters- und Geschlechtsverteilung, in verschiedenen Bevölkerungsgruppen deutlich voneinander abweichen. Beispielsweise wurde in Tunesien eine unklare starke Häufung von PF unter jungen Frauen gefunden (Bastuji-Garin et al., 1995). Israel dagegen weist insgesamt eine der weltweit höchsten Raten für Pemphigus auf, wobei die Inzidenz in der jüdischen Bevölkerung dreimal so hoch ist wie in der arabischen Population unter den selben Umweltbedingungen, was den Einfluss einer genetischen Komponente nahe legt (Kridin et al., 2016). Daneben existieren seltene endemische Varianten des Pemphigus, für die unter anderem Umweltfaktoren als Auslöser angenommen werden, da sie in bestimmten Regionen vermehrt auftreten (Bollag, 2010; Diaz et al., 1989). Andererseits kommen beim Fogo selvagem, einer endemischen Form des PF (Aoki et al., 2015), ebenso wie beim nicht-endemischen Pemphigus gewisse HLA-Allele gehäuft vor (Brandesen et al.,

1 Einleitung

1997) und bis zu 71 % der gesunden Verwandten von PV-Patienten weisen zirkulierende PV-IgG auf, was wiederum auf eine zusätzliche genetische Prädisposition schließen lässt (Brandsen et al., 1997). Zusammenfassend scheint der Entstehung des Pemphigus eine Kombination aus genetischen und umweltbedingten Einflüssen zugrunde zu liegen, die bisher erst wenig erforscht ist.

In Deutschland betrug die Prävalenz des PV im Jahr 2014 94,8 pro Million Einwohner, die des PF lag bei 10,0 pro Million Einwohner (Hübner et al., 2016). Beide Erkrankungen treten am häufigsten im mittleren Lebensalter auf (Kneisel und Hertl, 2011a). Zwischen 1989 und 1997 wurde in zwei deutschen Regionen eine jährliche Inzidenz des PV von 0,98 pro Million Einwohner festgestellt, nach Alterskorrektur ohne signifikanten Unterschied zwischen Männern und Frauen. Interessant ist dabei, dass die Inzidenz bei in Deutschland lebenden Ausländern mit Herkunft aus mediterranen Regionen neunfach höher ist als bei Einheimischen, was abermals auf das Vorliegen von bisher nicht genauer identifizierten Risikofaktoren schließen lässt. (Hahn-Ristic et al., 2002)

1.2.2 Klinik

PV beginnt oft in der Mukosa, wo sich Erosionen ausbilden. Meistens ist die Mundhöhle betroffen, aber auch die Speiseröhre, die Atemwege und die anogenitalen Schleimhäute können beteiligt sein. (Rassner, 2007; Kneisel und Hertl, 2011a) Ein Befall der Augen, der sich am häufigsten als Konjunktivitis äußert, ist ebenfalls möglich (Vielmuth et al., 2016). Anschließend kommt es in etwa der Hälfte der Fälle (Schmidt et al., 2015) zu einer Beteiligung des Integuments. Dort entstehen schlabbe Blasen, die in der Regel rasch aufreißen und Erosionen und Krusten hinterlassen (s. Abb. 1.3). Aber auch der umgekehrte Verlauf mit Beginn an der Epidermis und nachfolgender Beteiligung der Mukosa ist möglich. (Schmidt et al., 2000)

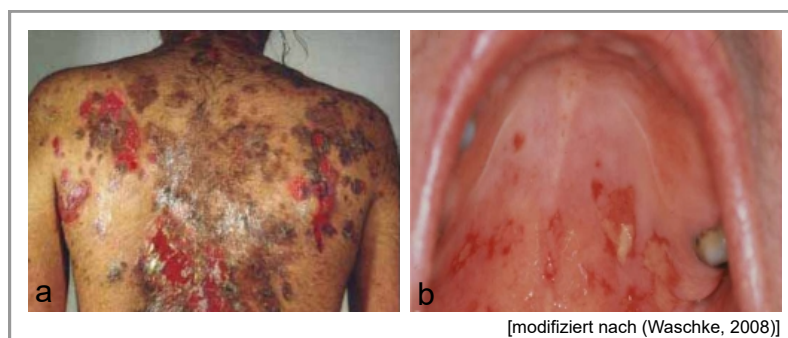


Abb. 1.3: Klinisches Bild des Pemphigus vulgaris

PV beginnt meist mit Läsionen in der Mundhöhle (b), kann aber auch andere Schleimhäute betreffen (Rassner, 2007). Die mukokutane Variante des PV weist zusätzlich auch eine Beteiligung der Haut (a) mit schlabben epidermalen Blasen und Erosionen auf (Waschke, 2008). (Die Genehmigung des Verlages für den Abdruck der Abbildungen liegt vor.)

1 Einleitung

Patienten leiden an Schmerzen im Bereich der Herde, sowie einem reduzierten Ernährungsstatus, da die Nahrungsaufnahme durch die Veränderungen an der Mundschleimhaut beeinträchtigt ist. Weitere mögliche Komplikationen stellen Sekundärinfektionen bis hin zur Sepsis dar. Die Läsionen verheilen ohne Narbenbildung. (Rassner, 2007)

Beim PF entwickeln sich schlaffe Blasen, die sich schnell eröffnen und zu Erosionen und schuppenden Läsionen werden (s. Abb. 1.4) (Schmidt et al., 2000). Vor allem Kopf und Stamm, mit dem Schwerpunkt auf seborrhoischen Arealen, sind betroffen (Kempf et al., 2015). Die Schleimhäute sind beim PF im Gegensatz zum PV stets ausgespart (Waschke, 2008).



Abb. 1.4: Klinisches Bild des Pemphigus foliaceus

Die Abbildung zeigt ein Hautareal am Rücken eines PF-Patienten. Gut erkennbar sind flache schlaffe Blasen und die typischen, teils verkrusteten Erosionen, die nach deren Ruptur zurückbleiben. Beim PF sind die Schleimhäute nicht betroffen. (Waschke, 2008; Schmidt et al., 2000) (Die Genehmigung des Verlages für den Abdruck der Abbildung liegt vor.)

1.2.3 Diagnostik

Zur Diagnosestellung des Pemphigus ist eine ausführliche Anamnese unerlässlich, insbesondere mit Angaben zur Lokalisation der Beschwerden an der Haut und den Schleimhäuten, Gewichtsverlust, Medikamenteneinnahme und ethnischem Hintergrund. Anschließend folgt die körperliche Untersuchung mit Inspektion der Haut, der Mundhöhle, sowie der nasalen und anogenitalen Schleimhäute und der Nägel. (Schmidt et al., 2015) Ein typisches diagnostisches Zeichen des Pemphigus ist das positive Nikolski-Phänomen, das der Dermatologe Pyotor Vasilyewich Nikolsky 1896 erstmals speziell für den PF beschrieb. Es zeigt eine geschwächte Verbindung zwischen Epidermisschichten an. Die obere Schicht kann im Bereich der Blasen und darüber hinaus manuell von der tieferen Schicht abgelöst werden, zudem kann bereits durch geringe Reibung auf scheinbar unauffälligen Hautarealen ebenfalls eine Ablösung der oberflächlichen Epidermisanteile hervorgerufen werden. Heute wird das Nikolski-Zeichen auch zur Diagnose des PV und anderer blasenbildender Hauterkrankungen angewendet. (Doubleday, 1987)

Histologisch zeigt sich beim Pemphigus eine Akantholyse, das heißt eine durch den Verlust der Zellhaftung hervorgerufene Spaltbildung in der Epidermis, die beim PV suprabasal und beim

1 Einleitung

PF im Stratum granulosum lokalisiert ist (Schmidt et al., 2000; Waschke, 2008; Kneisel und Hertl, 2011b) (s. Abb. 1.5).

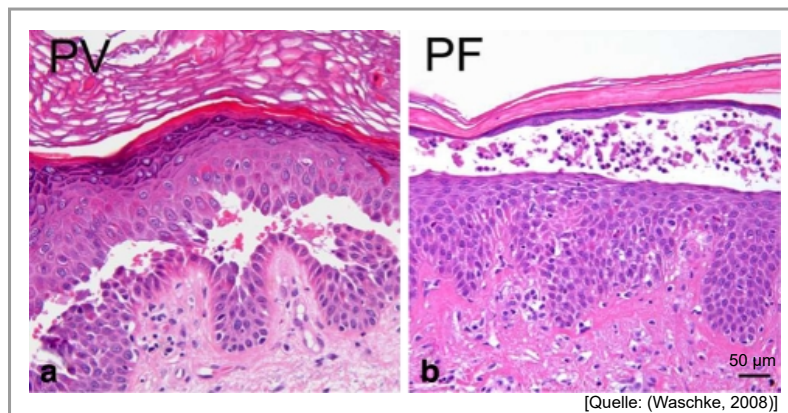


Abb. 1.5: Histologie von Pemphigus vulgaris und foliaceus

Pemphigus vulgaris (PV) und Pemphigus foliaceus (PF) können meist anhand ihrer histologischen Bilder erkannt werden. Zwar weisen beide Formen der Erkrankung eine pathologische Spaltbildung in der Epidermis auf, jedoch ist diese in unterschiedlichen Schichten lokalisiert. Die Gegenüberstellung der Hämatoxylin-Eosin-Färbungen zeigt, dass der Spalt beim PV unmittelbar suprabasal (a), beim PF dagegen oberflächlich im Stratum granulosum liegt (b). (Waschke, 2008)

(Die Genehmigung des Verlages für den Abdruck der Abbildungen liegt vor.)

In einer periläsional entnommenen Gewebeprobe werden mittels direkter Immunfluoreszenzmikroskopie interzellulär abgelagerte Autoantikörper dargestellt (Schmidt et al., 2015; Kempf et al., 2015; Kneisel und Hertl, 2011b). Die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie (IIF), für die in der Regel Affenösophagus als Substrat dient, weist zirkulierende Autoantikörper nach. Mittels ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay) zur Detektion von anti-Dsg1- und anti-Dsg3-Antikörpern ist eine sichere Unterscheidung zwischen PV und PF möglich. So liegen beim PV in der Regel Antikörper gegen Dsg3 vor, anti-Dsg1-Antikörper können ebenfalls auftreten oder fehlen. Beim PF sind überwiegend Immunglobuline gegen Dsg1, nicht aber gegen Dsg3 vorhanden. (Schmidt et al., 2015; Kneisel und Hertl, 2011b) IIF und ELISA erlauben eine quantitative Abschätzung der Menge an zirkulierenden Autoantikörpern. Da die Antikörper-Titer oft mit der Krankheitsaktivität korrelieren, ist so eine serologische Überwachung der Krankheitsaktivität im Verlauf möglich. (Lenz et al., 1999; Schmidt et al., 2015; Ishii et al., 1997; Kneisel und Hertl, 2011b) Aufgrund der geringeren Untersucherabhängigkeit und der besseren Korrelation der Titer mit der Krankheitsaktivität, ist der ELISA der IIF überlegen (Schmidt et al., 2015; Ishii et al., 1997).

1.2.4 Therapie

Pemphigus ist eine schwere, potenziell tödliche Erkrankung. In der sogenannten „Prä-Steroid-Ära“ lag die Mortalität der Patienten bei ca. 71 % (Carson et al., 1996). Damals war keine effektive Therapie bekannt, es erfolgten lediglich Behandlungsversuche, beispielsweise mit

1 Einleitung

Chinin, Arsen oder Quecksilber (Gray, 1922). Mit der Einführung der Kortikosteroide als systemische immunsuppressive Therapie sank die Letalität erheblich auf zunächst ca. 21 % (Carson et al., 1996). Problematisch sind jedoch die vielen unerwünschten Arzneimittelwirkungen wie erhöhtes Infektionsrisiko, Osteoporose, erhöhte Blutzuckerwerte, Gewichtszunahme, arterielle Hypertonie, Katarakt und Glaukom. Es wird daher empfohlen, die systemischen Kortikoide mit einem immunsuppressiven Agens wie Azathioprin, Mycophenolat-Mofetil, Mycophenolsäure, Cyclophosphamid, Methotrexat oder Dapson zu kombinieren, was eine deutliche Reduktion der Steroiddosis ermöglicht. (Eming et al., 2015; Hooten et al., 2014) Zwar sind auch diese adjuvanten Immunsuppressiva nicht frei von unerwünschten Wirkungen, jedoch treten diese deutlich seltener auf und sind meist nur mild ausgeprägt. In wenigen Fällen kommt es dennoch zu schwereren Nebenwirkungen, wie Hepatotoxizität, Neutropenie, Anämie oder Infektionen. (Hooten et al., 2014)

Im Jahr 2003 erfolgte die erste erfolgreiche Behandlung eines PV-Patienten mit Rituximab, einem monoklonalen Antikörper gegen das Oberflächenantigen CD20 auf B-Zellen (Herrmann et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass diese gezielte Immuntherapie in der Lage ist, die Antikörpertiter bei Pemphigus-Patienten zu senken, die Klinik erheblich zu verbessern und die Kortikosteroiddosis zu reduzieren (Müller et al., 2010; Herrmann et al., 2003). Allerdings ist auch die Anwendung von Rituximab nicht frei von Nebenwirkungen (Hooten et al., 2014).

Eine weitere Behandlungsoption stellt die intravenöse Injektion von hoch dosierten Immunglobulinen (IVIg) gesunder Spender dar (Eming, 2015; Arredondo et al., 2005), deren Wirkung auf mehreren Effekten wie der Blockade von Fc-Rezeptoren inflammatorischer Zellen, der Induktion eines Autoantikörper-Katabolismus, der Blockade von B-Zellen (Getsios et al., 2010) sowie der Verhinderung des Zelltods (Arredondo et al., 2005) beruht. In den meisten Fällen ergibt sich ein gutes Therapieansprechen mit Reduktion der Kortikoiddosis. Die Nebenwirkungen sind in der Regel mild und selbstlimitierend, was IVIg zu einer guten und sicheren Therapiealternative macht, die jedoch durch die hohen Kosten beeinträchtigt ist. (Baum et al., 2006)

Seit den 70er-Jahren wurden erfolgreich Plasmapheresen durchgeführt, bei denen das Blutplasma der Pemphigus-Patienten ausgetauscht und damit auch die Autoantikörper entfernt wurden (Mazzi et al., 2003). In den vergangenen Jahren ersetzte man die Plasmapherese durch die spezifischere und nebenwirkungsärmere Methode der Immunapherese. Hierbei werden die Antikörper aus dem Plasma entfernt und dieses anschließend dem Patienten zurück infundiert, was den Vorteil bietet, dass keine Plasmabestandteile substituiert werden müssen und größere Plasmamengen behandelt werden können. Das gute klinische Ansprechen und die deutliche Reduktion der immunsuppressiven Medikamente machen die Immunapherese zu einer möglichen Therapieoption beim Pemphigus. (Schmidt et al., 2003) Ihr Einsatz bleibt bislang allerdings auf wenige komplizierte Krankheitsfälle beschränkt (Eming et al., 2015), da die unspezifische Entfernung vieler verschiedener Immunglobuline die Gefahr einer Hypogammaglobulinämie

1 Einleitung

mit riskanter Schwächung des Immunsystems mit sich bringt. Um diese negativen Effekte zu verhindern, wird derzeit an neuen Adsorbentien geforscht, die ausschließlich anti-Dsg1- oder anti-Dsg3-Antikörper aus dem Plasma entfernen. Es konnten bereits sehr effektive Prototypen eingesetzt werden, mit deren Hilfe *in vitro* und *in vivo* in neonatalen Mäusen die pathogenen Auswirkungen der PV- und PF-IgG aufgehoben wurden. Zukünftige klinische Studien sollen nun die Anwendbarkeit und Effektivität der spezifischen Immunadsorption an PV-Patienten untersuchen. (Hofrichter et al., 2018)

Darüber hinaus sind weitere Studien erforderlich, um die zielgerichteten Therapien des Pemphigus miteinander und mit den herkömmlichen immunsuppressiven Therapien zu vergleichen. Aktuell bleibt die Kombination von Kortikosteroiden und einem immunsuppressiven Adjuvans laut der aktuellen Leitlinie der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft von 2015 die primär empfohlene Behandlungsstrategie. Rituximab, IVIG oder Immunapherese werden als Second-Line-Therapien bei besonders schwerer Symptomatik, Therapieresistenz, starken Nebenwirkungen oder Kontraindikationen gegen Kortikosteroide empfohlen. (Eming et al., 2015)

Aufgrund der weiterhin erforderlichen breiten Verwendung der Kortikosteroide in der Therapie des Pemphigus stellen die damit assoziierten, teils gravierenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen auch heute noch ein großes Problem dar (Mourellou et al., 1995) und sind größtenteils für die verbliebene Mortalitätsrate von 5-10 % verantwortlich (Mazzi et al., 2003). Es ist deshalb ein starkes Bestreben der aktuellen Forschungstätigkeiten, neue gezieltere und nebenwirkungsärmerere Therapiemöglichkeiten zu finden. Voraussetzung dafür ist jedoch ein besseres Verständnis der Pathomechanismen, die das Krankheitsbild des Pemphigus auslösen.

1.3 Pathogenese des Pemphigus

Bis heute sind die zellulären Abläufe, die beim Pemphigus zur Akantholyse führen, nur in Teilen aufgeklärt. Verschiedene Theorien sind im Umlauf und bieten eine Grundlage für kontroverse Debatten zwischen ihren jeweiligen Vertretern. So wird beispielsweise diskutiert, welche der verschiedenen, bei Pemphigus-Patienten nachgewiesenen Autoantikörper entscheidende Auswirkungen haben (Amagai et al., 2006; Grando et al., 2001; Stanley et al., 2001), ob die Haftung der Desmogleine durch sie direkt inhibiert wird (Shimizu et al., 2004; Tsunoda et al., 2003; Heupel et al., 2008) und in welchem Maße intrazelluläre Signalwege von ihnen beeinflusst werden (Waschke und Spindler, 2014; Spindler und Waschke, 2014). Die Funktion der unterschiedlichen Desmogleinfraktionen (Cirillo et al., 2006; Oktarina et al., 2011; Calkins et al., 2006) und die Rolle des Zytoskeletts (Bystryn und Grando, 2006; Müller et al., 2007) bedürfen ebenfalls noch einer genaueren Betrachtung. Zudem ist nur teilweise geklärt, in welcher Reihenfolge die bisher bekannten Prozesse genau ablaufen und wie sie sich gegenseitig beeinflussen (Spindler und Waschke, 2018).

1 Einleitung

Sicher ist, dass es sich beim Pemphigus um eine äußerst komplexe Erkrankung handelt und dass die Ergründung der zellulären Mechanismen, die klinisch die epidermale und mukosale Blasenbildung hervorrufen, eine große Herausforderung darstellt. Im folgenden wird ein Überblick über den aktuellen Forschungsstand und die wichtigsten Konzepte zur Pathogenese des Pemphigus gegeben.

1.3.1 Induktion der Erkrankung durch Autoantikörper

Im Jahr 1964 wiesen Beutner und Jordon im Serum von Pemphigus-Patienten erstmals Antikörper gegen mindestens eine interzellulär gelegene Struktur in der Epidermis nach (Beutner und Jordon, 1964). Weiterführende Studien zeigten, dass IgG aus dem Pemphigus-Serum an die Zelloberflächen gesunder menschlicher Haut binden und eine Akantholyse auslösen können, wobei eine Beteiligung des Komplementsystems ausgeschlossen wurde (Michel und Ko, 1977). Die in vitro sichtbare suprabasale Akantholyse ist histologisch nicht von derjenigen bei Patienten zu unterscheiden (Schiltz und Michel, 1976). In vivo sind die Autoantikörper in der Lage, nach passivem Transfer auf neonatale Mäuse bei diesen eine Pemphigus-Erkrankung mit typischen Hautläsionen zu induzieren (Anhalt et al., 1982).

Die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie an Maus-Keratinocyten identifizierte Desmosomen als Bindungsstelle der Autoantikörper (Jones et al., 1984) und in Western-Blot-Experimenten stellte sich heraus, dass Antikörper von PV- und PF-Patienten an zwei verschiedene desmosomale Antigene binden (Hashimoto et al., 1990). Als PF-Antigen wurde Dsg1 erkannt. Das Haupt-Antigen bei PV ist Dsg3, das deshalb zunächst als Pemphigus vulgaris-Antigen (PVA) bezeichnet wurde (Hashimoto et al., 1990). Aufgrund seiner Struktur konnte es in die Proteinfamilie der Cadherine eingeordnet werden (Amagai et al., 1991). Es zeigte sich, dass vor allem Antikörper gegen das aminoternale Ende (EC1-2) des PVA/Dsg3 pathogen sind und eine Akantholyse in neonatalen Mäusen verursachen (Amagai et al., 1992).

Ein weiterer Hinweis auf die Pathogenität der Autoantikörper ist der neonatale Pemphigus, bei dem durch die transplazentare Übertragung von IgG schwangerer Pemphigus-Patientinnen eine vorübergehende Pemphigus-Erkrankung des Kindes ausgelöst werden kann, die sich vollständig zurückbildet, sobald das Neugeborene die Antikörper abgebaut hat (Merlob et al., 1986; Carvalho et al., 2019).

Zusätzlich zu den anti-Desmoglein-Antikörpern finden sich bei Pemphigus-Erkrankten noch mehrere weitere Autoantikörper, deren Relevanz kontrovers diskutiert wird (Grando et al., 2001; Stanley et al., 2001; Amagai et al., 2006; Chernyavsky et al., 2007; Kalantari-Dehaghi et al., 2013; Nguyen et al., 2000b; Spindler et al., 2018; Amber et al., 2018). So kommen Antikörper gegen andere Bestandteile der Desmosomen, wie beispielsweise die Cadherine Dsc1 (Kalantari-Dehaghi et al., 2013; Dmochowski et al., 1993), Dsc2 (Dmochowski et al., 1993) und Dsc3

1 Einleitung

(Rafei et al., 2011; Kalantari-Dehaghi et al., 2013; Kamiya et al., 2016) oder die Plaqueproteine Plakophilin (Kalantari-Dehaghi et al., 2013) und Plakoglobin (Pelacho et al., 2004) vor. Zudem wurde nach der Entdeckung des vierten Desmogleins Dsg4 festgestellt, dass einige Dsg1-Autoantikörper auch mit Dsg4 interagieren, wobei eine wesentliche pathogene Rolle dieser Untergruppe jedoch ausgeschlossen werden konnte (Nagasaka et al., 2004).

Auch Immunglobuline, die nicht gegen desmosomale Komponenten sondern gegen andere körpereigene Antigene gerichtet sind, treten im Serum von Pemphigus-Erkrankten auf (Chernyavsky et al., 2007; Kalantari-Dehaghi et al., 2013). Beispielsweise finden sich einige unspezifische Autoantikörper wie ANA (antinukleäre Antikörper) oder ASMA (engl. anti-smooth muscle antibodies) bei PV- und PF-Patienten häufiger als bei Gesunden (Beldi et al., 2012), jedoch bislang ohne Nachweis einer Pathogenität. Weiterhin wurden im Serum von Pemphigus-Erkrankten Antikörper gegen Acetylcholin-(ACh-)Rezeptoren (Kalantari-Dehaghi et al., 2013) wie z.B. Pemphaxin (PX) (Nguyen et al., 2000a), sowie jüngst auch gegen antimitchondriale Antigene (Marchenko et al., 2010; Chernyavsky et al., 2015) entdeckt. Dabei fand sich allerdings kein einheitliches Antikörperprofil, sondern von Patient zu Patient unterschiedlichste Kombinationen der verschiedenen Immunglobuline (Kalantari-Dehaghi et al., 2013; Marchenko et al., 2010; Chernyavsky et al., 2015), was eine entscheidende Rolle dieser Antikörper fraglich erscheinen lässt.

Es ist zwar nicht ausgeschlossen, dass einzelne nicht-Desmoglein-Autoantikörper einen additiven Effekt in der Pathogenese des Pemphigus haben könnten (Kalantari-Dehaghi et al., 2013), was in der „Multiple Hit“-Hypothese ausgedrückt wird. Diese postuliert, dass ein Zusammenspiel von Antikörpern gegen mehrere verschiedene desmosomale und nicht-desmosomale Antigene einen Menschen an Pemphigus erkranken lässt (Pan et al., 2011; Grando et al., 2001). Für Antikörper gegen Dsc3 konnte eine pathogene Rolle identifiziert werden (Rafei et al., 2011), allerdings sind überzeugende Nachweise für eine signifikante Bedeutung der nicht gegen desmosomale Antigene gerichteten Autoantikörper bisher spärlich und deuten eher eine additive Wirkung an (Nguyen et al., 2000a).

Auch eine Arbeitsgruppe, die zeigte, dass IgG-freies Serum von PV-Patienten *in vitro* einige Pemphigus-ähnliche Veränderungen in Keratinozyten auslöst, konnte bisher nicht darlegen, ob diese Beobachtung auch für die Pathogenese des Pemphigus *in vivo* eine Rolle spielt. (Lanza et al., 2011)

Im Gegensatz dazu ist schon allein die Applikation von AK23, eines 2003 erstmals generierten monoklonalen anti-Dsg3-Antikörpers, in der Lage, einen PV-Phänotyp in Mäusen auszulösen (Tsunoda et al., 2003; Schulze et al., 2012), Dsg3 von der Zelloberfläche zu depletieren (Yamamoto et al., 2007; Hartlieb et al., 2013) und mehrere an der Pathogenese des Pemphigus beteiligte intrazelluläre Signalwege zu aktivieren (Kawasaki et al., 2006; Schulze et al., 2012). Zudem wurde nachgewiesen, dass aus Patientenserum per Immunadsorption gewonnene spezifische anti-Dsg3-IgG alleine, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in neonatalen Mäusen pathogen sind. Das

verbliebene, von Dsg3-Antikörpern befreite PV-Serum hatte dagegen bei dieser Arbeitsgruppe keinerlei Effekt. (Hofrichter et al., 2018) Nach dem aktuellen Forschungsstand kann daher weiterhin davon ausgegangen werden, dass die anti-Desmoglein-IgG, unabhängig von der Existenz weiterer Autoantikörper, die entscheidenden Auslöser des Pemphigus darstellen (Stanley et al., 2001).

1.3.2 Direkte Inhibition der Desmoglein-Adhäsion

Die pathogenen Antikörper von PV- und PF-Patienten binden vorwiegend an die extrazellulären Abschnitte der Desmosomen (Shimizu et al., 1995, 2004; Zenzo et al., 2012) und dort überwiegend an die am weitesten von der Zellmembran entfernten EC1-Domänen von Dsg1 und 3 (Sekiguchi et al., 2001), an denen sich die für die Adhäsion der Desmogleine wichtigen mutmaßlichen Zelladhäsionserkennungsstellen (CAR) befinden (Sekiguchi et al., 2001; Tselepis et al., 1998; Runswick et al., 2001; Zenzo et al., 2012). Es liegt daher nahe, dass die Bindung der IgG eine sterische Hinderung an den CAR verursacht, die die Interaktion der Desmogleine benachbarter Keratinozyten und damit die Zelladhäsion stört.

Diese direkte Inhibition konnte für Dsg3 tatsächlich *in vitro* sowohl in zellfreien Systemen, als auch an lebenden kultivierten Keratinozyten gezeigt werden (Vielmuth et al., 2015b, 2018b). Zudem fanden sich in einem PV-Maus-Modell Hinweise auf eine Störung der Dsg3-Adhäsion durch direkte Inhibition (Shimizu et al., 2004). Weiteren Auftrieb erfuhr die Hypothese dadurch, dass der monoklonale anti-Dsg3-Antikörper AK23 bei Mäusen zu einem PV-Phänotyp mit typischer Histologie führte (Tsunoda et al., 2003) und in zellfreier Umgebung, ebenso wie PV-IgG, die homophile Haftung von Dsg3 direkt hemmte (Heupel et al., 2008; Walter et al., 2017).

2009 stellten Heupel et al. ein Peptid (Single Peptid: SP) her, das an eine immunologisch wichtige Region der EC1-Domänen von Dsg1 und Dsg3 bindet und *in vitro* zur direkten Inhibition der Kohäsion beider Desmogleine in der Lage ist. Durch die Verknüpfung zweier SP mittels eines flexiblen Linkers entstand ein Tandem Peptid (TP), das die durch PV-IgG bedingte direkte Inhibition der Dsg3-Adhäsion abschwächte (Heupel et al., 2009b) und *in vivo* bei neonatalen Mäusen die Blasenbildung durch Antikörper verringerte (Spindler et al., 2013).

Die direkte Blockade der Dsg3-Adhäsion kann demnach eine wichtige Rolle beim PV spielen (Vielmuth et al., 2015b; Spindler et al., 2018). Sie alleine reicht jedoch vermutlich nicht aus, um zur Keratinretraktion (Caldelari et al., 2001) und zum vollständigen Haftungsverlust (Vielmuth et al., 2015b) zu führen. So konnte *in vitro* ein zuvor nachgewiesener, durch PV-IgG induzierter Haftungsverlust von Keratinozyten nicht mehr nachgewiesen werden, wenn der Ablauf intrazellulärer Signalkaskaden durch Inkubation bei 4 °C verhindert wurde (Calkins et al., 2006). Die Signaltransduktion ist demnach für die Pathogenese des PV unverzichtbar und scheint beim PF sogar noch wichtiger zu sein, da für Dsg1 keine direkte Blockade der homophilen Adhäsion

1 Einleitung

nachweisbar war (Heupel et al., 2008; Waschke et al., 2005; Walter et al., 2017; Vielmuth et al., 2018b). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass die verschiedenen Antikörpermuster bei PF, mukosalem und mukokutanem PV teils unterschiedliche Signalwege auslösen, was die Relevanz der Signaltransduktion für die Krankheitsausprägung bekräftigt und darüber hinaus eine mögliche Erklärung für die verschiedenen klinischen Phänotypen der Pemphigus-Varianten bietet (Walter et al., 2017; Spindler und Waschke, 2018).

1.3.3 Desmoglein-Kompensationstheorie

Mit der Frage, wie die jeweiligen Dsg1- und Dsg3-Antikörperprofile von PV und PF-Patienten zu den unterschiedlichen klinischen und histologischen Bildern passen, setzen sich mehrere Hypothesen auseinander. Eine der frühen Erklärungen nach Identifikation der Autoantigene war die 1999 eingeführte Desmoglein-Kompensationstheorie, die auf der unterschiedlichen Verteilung der desmosomalen Cadherine in den Schichten der Haut und der Schleimhäute beruht (s. Abb. 1.2 in Abschnitt 1.1.5.1). Diese besagt, dass ein Verlust der Funktion von Dsg1 oder Dsg3 wechselseitig durch das jeweils andere Adhäsionsmolekül kompensiert werden kann, sofern dieses in der jeweiligen Schicht in ausreichender Menge vorhanden ist (Pan et al., 2011; Mahoney et al., 1999a; Ishii et al., 2005). So wird erklärt, warum PF-Patienten, die Autoantikörper gegen Dsg1, nicht aber gegen Dsg3 aufweisen, keine mukosalen Läsionen bilden (Amagai et al., 1999). Das in allen Schichten der Mukosa stark exprimierte Dsg3 reicht demnach aus, um den Funktionsverlust des Dsg1 auszugleichen (Shirakata et al., 1998). In der Epidermis ist Dsg3 dagegen nur in den tieferen Schichten vorhanden, weshalb es beim PF zu der oberflächlichen epidermalen Akantholyse kommt. (Mahoney et al., 1999a; Amagai, 2003)

Der mukosa-dominante Phänotyp des PV, bei dem Antikörper gegen Dsg3, aber nicht gegen Dsg1 vorliegen (Amagai et al., 1999; Ding et al., 1997), zeigt ausgeprägte Symptome an der Mukosa, wo das insbesondere basal nur in geringen Mengen vorhandene Dsg1 nicht zur Aufrechterhaltung der Zelladhäsion ausreicht (Mahoney et al., 1999a; Shirakata et al., 1998). Hautläsionen finden sich bei diesen Patienten jedoch nicht (Hahn et al., 2000) oder nur in sehr geringem Ausmaß (Amagai et al., 1999), da das in allen epidermalen Schichten vorkommende Dsg1 ausreicht, um eine Blasenbildung zu verhindern. Nur wenn PV-Patienten zusätzlich zu den Dsg3- auch Dsg1-Antikörper aufweisen, was bei mehr als der Hälfte der PV-Patienten der Fall ist (Ding et al., 1999; Eyre und Stanley, 1988; Ishii et al., 1997; Hahn et al., 2000), kommt es zum Bild des mukokutanen PV mit suprabasaler epidermaler Blasenbildung, da Dsg1 dann nicht mehr den Funktionsverlust von Dsg3 kompensiert. (Mahoney et al., 1999a)

Unterstützt wird die Desmoglein-Kompensationstheorie durch eine Untersuchung an neugeborenen Kindern von Müttern mit PF. Bei den Säuglingen kam es zwar zu einer Bindung der transplazentar übertragenen mütterlichen anti-Dsg1-IgG an die Keratinozyten, jedoch wurde

1 Einleitung

keine PF-Symptomatik ausgelöst. In der Epidermis von Neugeborenen ist Dsg3, anders als in der von Erwachsenen, auch in den oberflächlichen Schichten vertreten, woraus geschlossen wird, dass es dort den Verlust der Haftung des Dsg1 kompensiert und die subcorneale Blasenbildung verhindert. (Wu et al., 2000)

Auch konnte gezeigt werden, dass eine ektopische Expression von Dsg2 in den oberflächlichen Epidermisschichten transgener Mäuse die durch PF-IgG induzierte Blasenbildung deutlich reduziert (Brennan et al., 2010) und dass Dsg2 (Hartlieb et al., 2014), ebenso wie Dsg1 (Ishii et al., 2005) einen Dsg3-Haftungsverlust in kultivierten Keratinozyten kompensieren kann. In einem weiteren Mausmodell zeigten sich nach Ausschaltung von Dsg3 ausgeprägte orale Läsionen wie beim PV. Hautblasen traten dagegen nur unter starkem mechanischem Stress auf, passend zu einer Kompensation des fehlenden Dsg3 in der Epidermis durch andere desmosomale Cadherine. (Ganeshan et al., 2010)

Auf den ersten Blick stellt die Dsg-Kompensationstheorie somit scheinbar ein umfassendes Konzept für den Zusammenhang zwischen den verschiedenen Autoantikörperprofilen und Phänotypen des Pemphigus dar. Bei genauerer Betrachtung finden sich jedoch Lücken in der Hypothese. (Pan et al., 2011) Sie erklärt beispielsweise nicht, warum die Spaltbildung beim mukokutanen PV mit gleichzeitiger Einschränkung der Dsg1- und der Dsg3-Funktion nur suprabasal und nicht, wie zu erwarten wäre, in allen Schichten der Epidermis stattfindet (Spindler et al., 2007; Spindler und Waschke, 2018). Zudem wurden Pemphigus-Fälle nachgewiesen, bei denen das Antikörpermuster nicht mit Klinik und Histologie übereinstimmt (Müller et al., 2002; Walter et al., 2017; Carew und Wagner, 2014). Es handelt sich dabei zwar um Einzelfälle, dennoch zeigen diese, dass komplexere Mechanismen für die verschiedenen klinischen und histologischen Ausprägungen der Unterformen des Pemphigus verantwortlich sind (Müller et al., 2002; Walter et al., 2017; Carew und Wagner, 2014), beispielsweise eine unterschiedliche Expression von Rezeptoren und Zytoskelettbestandteilen (Bystryn und Grando, 2006), verschiedene extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen mit dementsprechend reiferen und unreiferen Desmosomen (Spindler et al., 2011) oder eine unterschiedliche Relevanz beteiligter Signalwege in den verschiedenen Schichten der Epidermis (Pretel et al., 2009; Spindler et al., 2007).

1.3.4 Dsg3-Depletion und extradesmosomale Desmogleine

Zwei Auswirkungen der Antikörper sind die Reorganisation der Dsg3-Verteilung und die anschließende Aufnahme von der Oberfläche in die Keratinozyten (Calkins et al., 2006; Spindler et al., 2011). So zeigte sich in Zellkulturen eine Reduktion der Dsg3-Menge nach der Applikation von PV-IgG (Calkins et al., 2006; Jennings et al., 2011), ebenso wie nach der Zugabe eines monoklonalen anti-Dsg3-Antikörpers (Yamamoto et al., 2007). Bereits eine Depletion von Dsg3 um ca. 50 % war in vitro begleitet von einer Abnahme der Zelladhäsion (Yamamoto et al., 2007).

1 Einleitung

In vivo war bei Mäusen nach Injektion von PV-IgG und bei gleichzeitiger suprabasaler Blasenbildung die Menge an Dsg3 um ca. 30 % reduziert (Shu et al., 2007). Passend dazu wurde unter Bedingungen, die eine Depletion von Dsg3 in der Epidermis blockierten, auch die kutane Blasenbildung neonataler Mäuse verhindert (Spindler et al., 2011). In der Haut von PV-Patienten fand sich zudem weniger Dsg3 als in der von Gesunden (Shu et al., 2007).

Die Entfernung von Dsg3 von der Zelloberfläche geschieht durch Endozytose, wobei Komplexe aus Dsg3, PV-IgG und Plakoglobin internalisiert und anschließend in Lysosomen abgebaut werden (Calkins et al., 2006). Diese Endozytose ist abhängig von Cholesterol (Vielmuth et al., 2015b; Stahley et al., 2014) und von der Tyrosinkinaseaktivität, Indikatoren für einen über Lipidflöße (engl. „lipid rafts“) vermittelten Internalisierungsprozess (Delva et al., 2008).

Obwohl die Dsg3-Depletion als wesentlicher Bestandteil der Pemphigus-Pathogenese anerkannt und etabliert ist, steht bislang nicht fest, ob es sich um einen frühen Mechanismus handelt, der die Akantholyse primär auslöst, oder um einen später einsetzenden Prozess, der einen bereits begonnenen Adhäsionsverlust weiter verstärkt (Waschke, 2008). Zudem hat sich herausgestellt, dass unterschiedliche Dsg3-Fractionen existieren, die sich in Bezug auf die Depletion verschieden verhalten (Jolly et al., 2010; Yamamoto et al., 2007; Aoyama und Kitajima, 1999; Jennings et al., 2011).

Man unterscheidet dabei primär die in Desmosomen integrierten Cadherine von weiteren, diffus an der Zellmembran verteilten Dsg3-Molekülen (Bédane et al., 1996; Vielmuth et al., 2015a; Sato et al., 2000). Deren Existenz hatte sich bereits vor mehreren Jahrzehnten dadurch gezeigt, dass sich die interzelluläre Ablagerung der Autoantikörper von Pemphigus vulgaris-Patienten nicht auf die Desmosomen beschränkte (Wolff und Schreiner, 1997; Jones et al., 1986). Erst seit wenigen Jahren wird allerdings verstärkt ein Augenmerk darauf gelegt, die Unterschiede des extradesmosomalen und desmosomalen Dsg3 und ihre jeweilige Funktion in der Pemphigus-Pathogenese aufzuklären.

Einerseits könnte es sich bei den frei in der Zellmembran befindlichen Dsg3 um neu gebildete Cadherine handeln, die bereitgestellt werden um in die Desmosomen eingebaut zu werden, ein Prozess der demnach beim Pemphigus von den Autoantikörpern gestört wird (Cirillo et al., 2006; Sato et al., 2000). Die daraus resultierende Theorie besagt, dass extradesmosomale Dsg durch die Bindung von PV-IgG endozytiert werden (Mao et al., 2009; Jennings et al., 2011; Sato et al., 2000) und somit nicht mehr in Desmosomen integriert werden können (Oktarina et al., 2011). Da sich die desmosomalen Cadherine in einem stetigen dynamischen Gleichgewicht befinden (Gloushankova et al., 2003), mit einer hohen Fluktuation durch Abbau der bestehenden und Einbau neuer Cadherine (Windoffer et al., 2002), würde eine fehlende Rekrutierung neu synthetisierter Desmogleine von der Zellmembran mit der Zeit zu Desmoglein-depletierten Desmosomen führen (Oktarina et al., 2011; Sato et al., 2000). Im Gegensatz dazu findet die Depletion aus der in den Desmosomen enthaltenen Molekülfraction wesentlich langsamer statt

1 Einleitung

(Mao et al., 2009). Dies passt zu der Beobachtung, dass die Depletion von extradesmosomalem Dsg3 bereits wesentlich früher eintritt als die Reduktion der Menge an zytoskelett-gebundenem Dsg3 (Aoyama und Kitajima, 1999; Yamamoto et al., 2007; Jennings et al., 2011) und dass die Akantholyse in den Regionen zwischen den Desmosomen beginnt (Takahashi et al., 1985; Hu et al., 1978), wo sich zuerst der Interzellularraum erweitert, während die Desmosomen noch an schmalen Ausziehungen der Plasmamembran miteinander verbunden bleiben (Diercks et al., 2009). Erst später kommt es zu einem Verlust der Desmosomen (Wilgram et al., 1961; Bystryk und Grando, 2006).

Manche Arbeitsgruppen vertreten den Standpunkt, dass extradesmosomale Desmogleine spezifische Aufgaben als Membranrezeptoren erfüllen und nach Bindung von PV-IgG intrazelluläre Signalwege aktivieren (Spindler und Waschke, 2014; Waschke und Spindler, 2014; Spindler und Waschke, 2018). So wurde gezeigt, dass speziell extradesmosomales Dsg3 mittels des Aktin-Zytoskeletts an der Zellmembran verankert ist (Tsang et al., 2012a), dass es Komplexe mit E-Cadherin bildet, mit der Tyrosinkinase Src interagiert und auf diese Weise eine Rolle in der Regulation der Desmosomenbildung und der Pathogenese des Pemphigus spielt (Tsang et al., 2012b; Rötzer et al., 2015).

Die beiden genannten Theorien schließen einander nicht aus. Im Gegenteil ist denkbar, dass auf der Zellmembran verteiltes Dsg3 dort als spezifischer Rezeptor fungiert und gleichzeitig einen Vorrat bildet, aus dem es bei Bedarf in die Desmosomen eingebaut werden kann, wobei beide Vorgänge durch PV-IgG gestört werden.

Zusammenfassend legt das unterschiedliche Verhalten von desmosomalen und extradesmosomalen Dsg3 nahe, dass beide Fraktionen ganz spezifische Aufgaben erfüllen, beispielsweise indem sie mit verschiedenen intrazellulären Signalwegen assoziiert sind. Es wäre möglich, dass Signale, die über nicht-desmosomale Dsg3 vermittelt werden, intrazelluläre Prozesse wie die Reorganisation des Zytoskeletts beeinflussen, die anschließend zur Depletion von desmosomalem Dsg3 und damit zum Funktionsverlust der Desmosomen führen (Spindler und Waschke, 2014).

1.3.5 Signaltransduktionsabhängige Mechanismen beim Pemphigus

Eine Vielzahl von intrazellulären Signalwegen wurde bereits mit Pemphigus in Verbindung gebracht (Sanchez-Carpintero et al., 2004; Waschke et al., 2005; Waschke und Spindler, 2014; Walter et al., 2017; Schmidt et al., 2017). Der Schwerpunkt der aktuellen Forschung liegt darin, die einzelnen Abläufe und zeitlichen Zusammenhänge genauer zu analysieren. Besonders wichtig ist dabei, einzuordnen, ob spezielle Signalkaskaden vor dem Haftungsverlust der Desmosomen ablaufen und diesen induzieren, oder ob sie erst danach stattfinden und möglicherweise nur sekundär durch die bereits vorhandene Zelldissoziation verursacht werden. (Spindler und Waschke, 2014; Saito et al., 2012) In diesem Kapitel werden mehrere ausgewählte Signalwe-

ge genauer dargestellt, die nach der aktuellen Datenlage entscheidend zur Pathogenese des Pemphigus beitragen.

1.3.5.1 Spezifische Proteolyse

Eine der frühesten Theorien zur Pathogenese des Pemphigus besagt, dass die Autoantikörper nach ihrer Bindung an die Keratinozyten eine Ausschüttung von proteolytischen Enzymen verursachen, die die Zelladhäsionsmoleküle spalten und auf diese Weise zum Haftungsverlust der Zellen führen (Singer et al., 1980; Waschke, 2008). So wurde gezeigt, dass PV-IgG eine Überexpression mehrerer Proteasen im Pemphigus-Mausmodell auslösen (Cirillo et al., 2007b) und umgekehrt Proteaseinhibitoren in bestimmten Versuchskonstellationen in der Lage sind, die Effekte der Autoantikörper aufzuheben (Farb et al., 1978; Singer et al., 1980; Dobrev et al., 1996).

Zunächst lag der besondere Fokus auf der Serinprotease Plasminogen-Aktivator (PA). PV-IgG erhöhen die Aktivität des PA (Esaki et al., 1995), insbesondere die der Unterform vom Urokinase-Typ (uPA) (Kitajima et al., 1999; Hashimoto et al., 1983). Daraus wurde geschlossen, dass beim Pemphigus PA vermehrt Plasminogen in seine aktive Form Plasmin umwandelt, welches die Zelladhäsionsmoleküle spaltet und dadurch zur Akantholyse führt (Hashimoto et al., 1983). Passend dazu kann eine Hemmung des uPA unter bestimmten Bedingungen die Akantholyse verhindern (Morioka et al., 1987). Jedoch zeigte sich in einer anderen Studie trotz der Testung gleich mehrerer Inhibitoren des uPA-Systems keinerlei Effekt auf die PV-IgG-vermittelte Akantholyse in einem menschlichen Hautmodell (Schuh et al., 2003) und im Mausmodell fand sich selbst bei vollständig fehlendem PA eine identische Blasenbildung und Akantholyse wie bei den Kontrolltieren, was eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des Pemphigus ausschloss (Mahoney et al., 1999b).

Auch für andere Proteasen konnte bisher nicht sicher bewiesen werden, dass sie tatsächlich desmosomale Cadherine der Pemphigus-Patienten spalten (Waschke, 2008), zudem fehlt der Nachweis eines direkten kausalen Zusammenhangs der Proteasen mit der Akantholyse (Schuh et al., 2003). Möglich ist jedoch angesichts der Studienergebnisse, dass proteolytische Enzyme die Wirkung der PV-IgG unter bestimmten Voraussetzungen verstärken (Schuh et al., 2003). So wurde in einer klinischen Studie festgestellt, dass die Glukokortikoiddosis in der Akuttherapie von Pemphigus-Patienten bei zusätzlicher Gabe von Proteaseinhibitoren signifikant niedriger angesetzt werden konnte, ohne dass die Behandlung an Wirksamkeit verlor (Dobrev et al., 1996). Auch wenn bisher größere Untersuchungen fehlen, die die möglichen positiven Effekte der Proteasehemmung in vivo bestätigen (Dobrev et al., 1996), so deuten die vorliegenden Daten doch darauf hin, dass Proteasen unter bestimmten Umständen das Krankheitsbild des Pemphigus mit beeinflussen können.

1.3.5.2 p38MAPK

p38MAPK ist ein Mitglied der Enzymfamilie der MAP-Kinasen (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen). P38MAPK ist an der Regulation der zellulären Reaktionen auf verschiedenste externe Stimuli, wie osmotischen, oxidativen, thermalen (Mao et al., 2011) und chemischen (Tan et al., 1996) Stress beteiligt und wird beispielsweise durch extrazelluläre Hyperosmolarität, bakterielle Lipopolysaccharide, Taxol, Interleukin-1 (Han et al., 1994) und weitere Zytokine, sowie Anisomycin (Nahas et al., 1996), H₂O₂ (Mao et al., 2011), Natriumarsenit (Tan et al., 1996), Hitze oder Wachstumsfaktoren (Guay et al., 1997) aktiviert. Auf die Phosphorylierung eines Tyrosinrestes der p38MAPK (Nahas et al., 1996) folgen Signalkaskaden, die das Zellwachstum und die Differenzierung (Wang und Ron, 1996), sowie die Migration und Wundheilung beeinflussen (Rötzer et al., 2016) oder die Genexpression verändern (Tan et al., 1996).

Beim Pemphigus ist insbesondere einer der von p38MAPK abhängigen Signalwege genauer charakterisiert. Er wird *in vitro* in Keratinozyten und *in vivo* in der Haut von Mäusen durch die Bindung von PV-IgG an Dsg3 ausgelöst (Berkowitz et al., 2005, 2006). Dabei assoziiert p38MAPK sowohl mit desmosomalem als auch mit extradesmosomalem Dsg3 (Rötzer et al., 2015) und wird in diesem Komplex phosphoryliert (Spindler et al., 2013), was über den Zwischenschritt einer weiteren Kinase, der MAPKAP-Kinase 2 (Mitogen-aktivierte Proteinkinase-aktivierte Proteinkinase 2) (Mao et al., 2014; Vielmuth et al., 2016), zur Phosphorylierung des Hitzeschockproteins 27 (HSP27) führt (Larsen et al., 1997; Berkowitz et al., 2005, 2006). Auch PF-IgG waren im Mausmodell in der Lage, diesen Signalweg zu induzieren (Berkowitz et al., 2008a). Zudem zeigte sich eine Aktivierung der p38MAPK (Berkowitz et al., 2008b), der MAPKAP-Kinase 2 (Mao et al., 2014) und des HSP27 in Hautbiopsien von PF- und PV-Patienten (Berkowitz et al., 2008b). HSP27 reguliert sowohl die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts (Guay et al., 1997) als auch der Intermediärfilamente (Perng et al., 1999). Der durch Autoantikörper induzierte p38MAPK-Signalweg hat demnach einen direkten Einfluss auf die Reorganisation des Zytoskeletts beim Pemphigus (Berkowitz et al., 2005; Spindler et al., 2013; Arnold, 2014).

Darüber hinaus ist eine Aktivierung der p38MAPK durch PV-IgG auch mit der Depletion und Endozytose sowohl des desmosomalen als auch des nicht-desmosomalen Dsg3 assoziiert (Jolly et al., 2010).

Umgekehrt reduziert eine Hemmung der p38MAPK oder der nachgeschalteten MAPKAP-Kinase 2 mittels spezifischer Inhibitoren den Haftungsverlust kultivierter Keratinozyten (Hartlieb et al., 2014; Saito et al., 2012), die Depletion von Dsg3 (Mao et al., 2011, 2014) aus der löslichen und unlöslichen Fraktion (Jolly et al., 2010) ebenso wie die Aktivierung von HSP27 und die Reorganisation des Keratin- und Aktin-Zytoskeletts *in vitro* (Berkowitz et al., 2005), sowie die Aktivierung des murinen Hitzeschockproteins 25 (HSP25) und die Blasenbildung bei Mäusen *in vivo* (Berkowitz et al., 2006, 2008a). An humanen Hautbiopsien konnte gezeigt

1 Einleitung

werden, dass eine Hemmung der p38MAPK die durch PV-IgG ausgelösten Effekte wie Blasenbildung, Fragmentierung des Dsg3, Reduktion der Anzahl und Größe der Desmosomen, sowie das Auseinanderweichen der Zellmembranen und das Ablösen der Keratinfilamente von den Desmosomen, erheblich hemmt oder sogar vollkommen aufheben kann (Egu et al., 2017).

Bisher ist allerdings nicht sicher geklärt, wo die Aktivierung der p38MAPK im Ablauf der zellulären Veränderungen beim Pemphigus genau anzusiedeln ist. Es sind hierzu mehrere Ansätze und Thesen im Umlauf, deren Unterschiede sich wohl auf deutlich voneinander abweichende Untersuchungsbedingungen, insbesondere die Verwendung unterschiedlicher Zellkulturen, Testreagenzien und Autoantikörper, zurückführen lassen. So wurde einerseits eine zweigipflige Aktivierung der p38MAPK gezeigt, deren Zeitpunkte sich jedoch *in vivo* und *in vitro*, bzw. nach PF- oder PV-IgG unterscheiden. Es wurde postuliert, dass die beiden Gipfel verschiedene zelluläre Veränderungen auslösen. (Lee et al., 2009) Andere Arbeitsgruppen fanden jedoch davon abweichende Aktivierungsgipfel der p38MAPK (Chernyavsky et al., 2007) oder führten ihre Experimente zu differierenden Zeitpunkten durch (Mao et al., 2011), was die Vergleichbarkeit erschwert. Es ist daher lohnend, eine genauere Analyse der zeitlichen Reihenfolge der einzelnen intrazellulären Abläufe, insbesondere im Hinblick auf den p38MAPK-Signalweg, durchzuführen.

1.3.5.3 Plakoglobin und c-Myc

Aktuelle Arbeiten rücken zunehmend auch die desmosomalen Plaqueproteine in den Fokus der Pemphigus-Forschung (Cirillo et al., 2014; Waschke und Spindler, 2014; Cirillo und Prime, 2009). So wurde beispielsweise gezeigt, dass eine PV-IgG-vermittelte Phosphorylierung von Desmoplakin mit der Dsg3-Depletion in Verbindung steht (Dehner et al., 2014) und dass Plakophilin 3 die Akantholyse beeinflusst (Cirillo et al., 2014).

Ein besonderes Augenmerk liegt jedoch auf Plakoglobin, das sich sowohl in Desmosomen und Adhärenskontakten (Lewis et al., 1997; Yin et al., 2005), als auch an der Zellmembran, im Zytosol (Yamamoto et al., 2007) und im Zellkern (Spindler et al., 2014) der Keratinozyten findet. Es ist essentiell für die Ausbildung von Desmosomen (Lewis et al., 1997; Yin et al., 2005) und für die Zelladhäsion (Marcozzi et al., 1998; Yin et al., 2005; Cirillo und Prime, 2009) und spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Pemphigus.

PV-IgG beeinträchtigen die Verteilung des Plakoglobins (de Bruin et al., 2007; Caldelari et al., 2001; Muzio et al., 2002) und können seine Verbindung mit Dsg3 lösen (Aoyama et al., 1999). Zudem sind sie in der Lage, Plakoglobin durch die gemeinsame Endozytose von PV-IgG, Dsg3 und Plakoglobin (Calkins et al., 2006) von der Zellmembran zu depletieren (Spindler et al., 2014; Caldelari et al., 2001). Es wurde gezeigt, dass die PV-IgG-induzierte Störung der desmosomalen Komposition mit Fragmentierung des Dsg3 und anderer wichtiger desmosomaler Cadherine und Plaqueproteine, von Plakoglobin abhängig ist (de Bruin et al., 2007).

1 Einleitung

Zusätzlich zu seiner direkten Beteiligung an der Zelladhäsion (Al-Amoudi et al., 2011; Yin et al., 2005), fungiert Plakoglobin auch als Signalmolekül und ist dabei an mehreren intrazellulären Signalwegen beim Pemphigus beteiligt. So unterstützt es die Rekrutierung von p38MAPK an die Desmosomen (Spindler et al., 2014) und bildet Komplexe mit Dsg3 und p38MAPK, innerhalb derer p38MAPK aktiviert wird (Spindler et al., 2013). Die PV-IgG-bedingte Keratinretraktion und der Verlust der Zelladhäsion sind ebenfalls abhängig von Plakoglobin (Caldelari et al., 2001) und werden von diesem über p38MAPK reguliert (Spindler et al., 2014).

Zudem spielt Plakoglobin eine Rolle bei durch Wachstumsfaktoren vermittelten Signalwegen in Keratinozyten. Es wird durch Aktivierung des EGF-Rezeptors (Epidermal Growth Factor-Rezeptor) phosphoryliert und umverteilt (Gaudry et al., 2001) und ist beteiligt an dem durch EGF (Epidermal Growth Factor) ausgelösten Verlust der Zelladhäsion und der Depletion des Desmoplakins von der Zelloberfläche (Yin et al., 2005).

Als Signalprotein wird Plakoglobin auch von der Zelloberfläche in das Zytoplasma und in den Zellkern verlagert, wo es bei Pemphigus-Patienten die Expression verschiedener Proteine beeinflusst. Unter anderem wird die nukleäre Translokation des Plakoglobins von einem Anstieg des Plasminogen-Aktivator-Rezeptors vom Urokinase-Typ (engl. urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR) an der Zellmembran begleitet (s. Abschnitt 1.3.5.1). (Muzio et al., 2002)

Auch das wichtige Protoonkogen c-Myc wird durch Plakoglobin moduliert. Unter physiologischen Bedingungen unterdrückt Plakoglobin die Expression von c-Myc in Keratinozyten. Diese Funktion wird durch PV-IgG gestört, was zu einer Überexpression von nukleärem c-Myc bei PV-Patienten mit begleitender epidermaler Hyperproliferation und Reduktion der Zelladhäsion sowie zu Hautblasen führt. (Williamson et al., 2006, 2007) Die Erhöhung des nukleären c-Myc ist charakteristisch für PV und tritt bei anderen Hautkrankheiten einschließlich PF nicht auf, was darauf schließen lässt, dass bei PV und PF zumindest teilweise unterschiedliche Signalwege zum Tragen kommen. Da die Erhöhung des nukleären c-Myc bereits sehr früh im Krankheitsverlauf auftritt und zudem mit der Krankheitsaktivität korreliert, könnte die Analyse der c-Myc-Expression zukünftig bei der Diagnose des PV als sicherer und früher Marker genutzt werden. (Williamson et al., 2007)

1.3.5.4 EGF-Rezeptor und Src

Der Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR ist ein wichtiges Signalprotein. Er wird nicht nur durch EGF und andere extrazelluläre Moleküle, sondern auch ligandenunabhängig aktiviert und reguliert vielfältige zelluläre Vorgänge (Hackel et al., 1999; Bektas et al., 2013; Biscardi et al., 1999), so auch die Zelladhäsion. Eine Unterdrückung der basalen EGFR-Aktivität führt zu einer Vermehrung von membranständigem Dsg3 und Plakoglobin (Bektas et al., 2013), sowie zu einer verbesserten Zellhaftung (Lorch et al., 2004; Bektas et al., 2013).

1 Einleitung

Beim Pemphigus ergibt sich durch die Vernetzung des EGFR mit multiplen intrazellulären Signalkaskaden ein komplexes Bild, in dem sich der Rezeptor an mehreren Stellen auf die pathologischen Veränderungen der Keratinozyten auswirkt. So führen PV-IgG nach Bindung an Dsg3 zu einer Phosphorylierung des EGFR, der anschließend gemeinsam mit Dsg3 (Bektas et al., 2013) und Plakoglobin (Frusic-Zlotkin et al., 2006; Bektas et al., 2013) endozytiert wird, was eine Reduktion der Dsg3-Menge an der Zelloberfläche und einen Adhäsionsverlust der Keratinozyten zur Folge hat. Umgekehrt kann eine Hemmung des EGFR die PV-IgG-induzierte Depletion von Dsg3 und Plakoglobin, sowie die Keratinretraktion *in vitro*, ebenso wie die kutane Blasenbildung *in vivo* verhindern. (Bektas et al., 2013) Zudem ist EGFR in der Lage, die Bindung von Plakoglobin an Desmoplakin und damit indirekt auch die Verbindung der desmosomalen Cadherine mit dem Zytoskelett zu stören (Gaudry et al., 2001).

Die Aktivierung des EGFR ist von einer vorangehenden Aktivierung der p38MAPK abhängig, was eine hierarchische Einordnung dieser beiden Signalkaskaden bei Pemphigus-Patienten erlaubt (Bektas et al., 2013). Auch gibt es Hinweise auf eine Beteiligung des EGFR an der unter bestimmten Bedingungen auftretenden PV-IgG-induzierten Apoptose der Keratinozyten im Zusammenhang mit einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Jun (Frusic-Zlotkin et al., 2006).

Desweiteren interagiert EGFR mit der Tyrosinkinase Src (Cirillo und Prime, 2009). Diese ist in der Lage, sowohl EGFR (Biscardi et al., 1999) als auch Plakophilin 3 (Cirillo et al., 2014), Dsg3 und Plakoglobin zu phosphorylieren und bildet Komplexe mit Dsg3, E-Cadherin, β -Catenin und Plakoglobin (Rötzer et al., 2015). Src ist essentiell für den Einbau von Dsg3 in Desmosomen (Rötzer et al., 2015) sowie für die Adhäsion von E-Cadherin (Tsang et al., 2012b) und damit für die Ausbildung funktionsfähiger zellulärer Haftkontakte. Src wird nach der Bindung von PV-IgG an Keratinozyten rasch (Chernyavsky et al., 2007) in Abhängigkeit von extradesmosomalem Dsg3 aktiviert (Tsang et al., 2012b) und ist beteiligt an der folgenden Retraktion der Keratinfilamente (Chernyavsky et al., 2007), der Loslösung von Dsg3 vom Plaqueprotein Plakophilin 3 und der Akantholyse der Keratinozyten *in vitro* (Cirillo et al., 2014), sowie der Blasenbildung bei Mäusen *in vivo* (Pretel et al., 2009). In präläsionaler Haut von Pemphigus-Patienten ist die Menge an aktivierter Src erhöht, im Bereich der Hautblasen jedoch reduziert, was darauf schließen lässt, dass auch *in vivo* eine Aktivierung von Src vor der Akantholyse stattfindet (Tsang et al., 2012b). *In vitro* wurde gezeigt, dass die PV-IgG-induzierte Aktivierung von Src der Aktivierung des EGFR vorangeht und dass eine Hemmung der Src auch den Rezeptor indirekt hemmt (Chernyavsky et al., 2007).

Allerdings konnten in einer Studie die Effekte von PV-IgG auf den EGFR nicht reproduziert werden und es wurde nachgewiesen, dass die Zelldissoziation unter bestimmten Bedingungen *in vitro* auch ohne die Beteiligung des Rezeptors stattfinden kann (Heupel et al., 2009a; Waschke und Spindler, 2014). Dies deutet an, dass EGFR-Signaltransduktion nicht der alleinige kausale

1 Einleitung

Mechanismus beim Zellhaftungsverlust ist. Zusammengefasst gibt es aber doch gute Belege dafür, dass der EGFR in der Mehrzahl der Konstellationen und insbesondere in vivo einen Beitrag zur Akantholyse leistet und dass seine Hemmung die Effekte von PV-IgG sowohl in vitro als auch in vivo blockiert (Bektas et al., 2013), was die pharmakologische Inhibition des EGFR als Möglichkeit für eine effektivere und gezieltere Therapie des Pemphigus in Aussicht stellt (Bektas et al., 2013; Sayar et al., 2014). Alternativ wäre auch eine Blockade der vorgeschalteten Src als therapeutische Option denkbar.

1.3.5.5 Apoptose

Bei der Apoptose handelt es sich um den programmierten Zelltod, der in mehrzelligen Organismen physiologisch im Rahmen der kontinuierlichen Erneuerung proliferierender Gewebe und als Reaktion auf Zellschädigungen stattfindet (Roessner et al., 2004; Bektas et al., 2010) (Sayama et al., 1994; Nemoto et al., 1998). Er kann durch primär intrazelluläre oder durch verschiedene rezeptorvermittelte Signale ausgelöst werden und besteht aus einer geregelten Abfolge von definierten Teilschritten (Roessner et al., 2004). Das zentrale Ereignis ist dabei die Aktivierung der Proteasen aus der Caspase-Familie, die jeweils bestimmte zelluläre Zielproteine spalten (Schmidt et al., 2009) und so zu morphologischen Zellveränderungen wie Kondensation des Zellkerns mit Fragmentierung der DNA, Zellschrumpfung (Bektas et al., 2010) und Degradation des Zytoskeletts führen (Roessner et al., 2004). Die dabei entstehenden Apoptosekörperchen werden anschließend von Makrophagen abgebaut (Roessner et al., 2004; Weiske et al., 2001). Es wurde gezeigt, dass die Caspasen unter anderem auch desmosomale Cadherine und Plaqueproteine spalten und dadurch in Keratinozyten im Rahmen der Apoptose zur Zerstörung der Desmosomen und des Keratin-Zytoskeletts führen (Weiske et al., 2001).

Mehrere Studien haben dokumentiert, dass beim Pemphigus apoptotische Signalwege aktiv sein können (Pacheco-Tovar et al., 2011; Schmidt und Waschke, 2009; Bektas et al., 2010; Puviani et al., 2003; Sayama et al., 1994; Li et al., 2009; Wang et al., 2004; Arredondo et al., 2005; Sanath et al., 2018), unter anderem durch den Nachweis verschiedener Anzeichen der Apoptose in der Haut (Cuevas-Gonzalez et al., 2016; Pacheco-Tovar et al., 2011; Wang et al., 2004; Puviani et al., 2003) und Mundschleimhaut (Sanath et al., 2018) von Pemphigus-Patienten. Es herrscht jedoch große Uneinigkeit darüber, ob der programmierte Zelltod für die Pathogenese des Pemphigus relevant ist und ob er eine Ursache oder Folge der Akantholyse darstellt (Schmidt und Waschke, 2009; Pan et al., 2011).

Autoantikörper von Pemphigus-Patienten erhöhen die Aktivität pro-apoptotischer Proteine und reduzieren anti-apoptotische Proteine in kultivierten Keratinozyten (Wang et al., 2004; Pelacho et al., 2004; Puviani et al., 2003) und Mäusen (Li et al., 2009; Pretel et al., 2009; Pacheco-Tovar et al., 2011). Eine zentrale Rolle spielt dabei Caspase-3 (Pacheco-Tovar et al., 2011; Li

1 Einleitung

et al., 2009; Hariton et al., 2017), deren Aktivierung auch mit dem p38MAPK-Signalweg und der Expression von c-Myc (s. Abschnitt 1.3.5.3) (Luyet et al., 2015), sowie mit der Aktivität von RhoA (s. Abschnitt 1.3.5.6) (Liang et al., 2017) assoziiert ist. Zudem hat der EGFR-Signalweg eine wichtige Funktion in den durch PV-IgG induzierten apoptotischen Mechanismen (Frusic-Zlotkin et al., 2006). Die „Apoptolyse“-Theorie fasst die einzelnen Schritte zu einem Konzept zusammen, nach dem die Autoantikörper mehrere Signalwege aktivieren, die in ihrer Gesamtheit zum Kollaps der Keratinozyten mit Keratinretraktion und Verlust der Desmosomen, sowie schließlich zur Apoptose und Akantholyse führen (Grando et al., 2009).

Andere Studien zeigten jedoch, dass die PV-IgG-induzierte Akantholyse in Zellkulturen (Schmidt et al., 2009; Farb et al., 1978; Luyet et al., 2015) ebenso wie bei Pemphigus-Patienten (Janse et al., 2014; Schmidt et al., 2009; Luyet et al., 2015) auch ohne Apoptose der Keratinozyten stattfindet. Eine Arbeitsgruppe fand einen vorübergehenden und geringen Anstieg der Caspase-3 *in vitro* und *in vivo* vor dem Auftreten von Hautläsionen, jedoch ohne weitere Anzeichen der Apoptose (Luyet et al., 2015). Dies ist vereinbar mit Beobachtungen, dass Caspasen auch in nicht-apoptotische Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Regulation des Zellzyklus eingebunden sind (Schwerk und Schulze-Osthoff, 2003) und macht deutlich, dass beim Pemphigus gewisse Apoptose-Marker auch unabhängig vom eigentlichen Zelltod-Programm aktiv sein und sich auf die Akantholyse auswirken können (Luyet et al., 2015; Li et al., 2009), beispielsweise indem sie, anderen Signalwegen nachgeschaltet, die Blasenbildung in einem späteren Stadium verstärken (Bektas et al., 2010; Schmidt und Waschke, 2009).

In mehreren Forschungsarbeiten konnten die durch Antikörper induzierte Aktivierung der p38MAPK, die Zelldissoziation und Keratinretraktion *in vitro* (Luyet et al., 2015), ebenso wie die Blasenbildung im Mausmodell (Luyet et al., 2015; Pacheco-Tovar et al., 2011; Pretel et al., 2009; Li et al., 2009; Arredondo et al., 2005) durch Caspase-Inhibitoren deutlich reduziert werden. Ein pharmakologischer Eingriff in die Regulation Caspase-anhängiger nicht-apoptotischer Mechanismen könnte daher eine erfolgsversprechende Option für die Pemphigus-Therapie darstellen (Luyet et al., 2015; Pacheco-Tovar et al., 2011; Hariton et al., 2017).

1.3.5.6 Aktin-Zytoskelett und Rho-GTPasen

Das Aktinnetzwerk hat mehrere essentielle Funktionen in allen eukaryotischen Zellen, so auch in Keratinozyten (Hall und Nobes, 2000). Es sorgt für die mechanische Stabilität der Zellen und eine robuste Zelladhäsion (Tsang et al., 2012a; Vasioukhin et al., 2000). Durch den schnellen und flexiblen Auf- und Abbau der Aktinfilamente werden aber auch dynamische Prozesse wie Zellform und -motilität (Hall und Nobes, 2000; Parsons et al., 2010), Phagozytose (Hall und Nobes, 2000), Proliferation und Differenzierung (Tsang et al., 2012a), Zellteilung und die Morphogenese während der embryonalen Entwicklung (Lee und Dominguez, 2010) ermöglicht.

1 Einleitung

Gesteuert werden diese Abläufe häufig von extrazellulären Signalen, die die Zelle über membranständige Rezeptoren erhält (Lee und Dominguez, 2010; Hall und Nobes, 2000) und die durch Signalmoleküle, allen voran die Enzyme RhoA, Rac-1 und Cdc42 aus der Familie der Rho-GTPasen (Ras homologe-GTPasen), an Effektorproteine am Aktin-Zytoskelett weitergeleitet werden (Tsang et al., 2012a; Hall und Nobes, 2000; Lee und Dominguez, 2010; Parsons et al., 2010).

Da Pemphigus in erster Linie durch die Beeinträchtigung der Zellhaftung charakterisiert ist, hat dort insbesondere diese Funktion des Aktin-Zytoskeletts eine entscheidende Bedeutung. So sind die Mikrofilamente wichtig für den Aufbau von Adhärenskontakten (Parsons et al., 2010; Vasioukhin et al., 2000) und Desmosomen (Godsel et al., 2005; Pasdar und Li, 1993; Pasdar et al., 1991). Durch Pemphigus-Autoantikörper wird die Anordnung des kortikalen Aktinringgürtels zerstört (Gliem et al., 2010; Jennings et al., 2011) und es zeigt sich eine Fragmentierung von Dsg3, sowie ein Verlust der Zelladhäsion (Gliem et al., 2010).

Reguliert wird die Reorganisation des Aktins beim Pemphigus unter anderem durch die Rho-GTPasen (Gliem et al., 2010). RhoA (Ras homolog gene family, member A) scheint dabei die wichtigste Rolle zu spielen (Waschke et al., 2006). Es steuert beispielsweise den Einbau von Desmoplakin in desmosomale Plaques (Godsel et al., 2010) und die Verankerung desmosomaler Proteine am Keratin-Zytoskelett und ist daher wichtig für die Integrität der Desmosomen (Waschke et al., 2006). Beim Pemphigus wird die Aktivität von RhoA durch die Autoantikörper reduziert (Waschke et al., 2006; Spindler, 2008), was in vitro im Adhäsionsverlust der Keratinozyten, der Depletion von Dsg3 und Fragmentierung von Dsg1, sowie der Desorganisation des kortikalen Aktin-Zytoskeletts resultiert (Spindler et al., 2007).

Umgekehrt verhindert eine Aktivierung von Rho-GTPasen (Gliem et al., 2010), insbesondere von RhoA, in vitro die durch Pemphigus-IgG vermittelten Veränderungen der Keratinozyten. So werden die Zelldissoziation (Gliem et al., 2010), die Aktin-Reorganisation und Keratinretraktion (Waschke et al., 2006), die Ablösung von Dsg3 vom Zytoskelett, ebenso wie die Fragmentierung von Dsg3 (Gliem et al., 2010; Waschke et al., 2006) und Desmoplakin und die epidermale Blasenbildung in humaner Haut (Waschke et al., 2006) durch eine pharmakologische Aktivierung von RhoA blockiert.

Es wurde gezeigt, dass der über Rho-GTPasen vermittelten Reorganisation des Aktins multiple hemmende und aktivierende Signale und ein komplexes intrazelluläres Signalnetzwerk zugrunde liegen. Desmosomale Proteine können beispielsweise ihrerseits die Dynamik des Aktins verändern und dadurch wiederum die Organisation und Ausbildung der Desmosomen beeinflussen (Hatzfeld et al., 2000; Godsel et al., 2010). So reguliert Plakophilin 2 die Aktivität und Lokalisation von RhoA und nimmt damit selbst indirekt Einfluss auf die Zelladhäsion (Godsel et al., 2010). Dsg3 beeinflusst die Aktivität von Rac-1, Cdc42 und RhoA. In Abhängigkeit von der Rac-1-Aktivität interagiert es mit kortikalem Aktin und reguliert dessen Dynamik. (Tsang et al.,

1 Einleitung

2012a) Auch wurde eine Verbindung des p38MAPK-Signalweges mit der Aktivität von RhoA (Waschke et al., 2006; Spindler, 2008) und der durch PV-IgG ausgelösten Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts (Berkowitz et al., 2005) nachgewiesen und gezeigt, dass der RhoA-Signalweg vom p38MAPK-Signalweg abhängig ist (Spindler und Waschke, 2011). Darüber hinaus wurde RhoA mit möglichen apoptotischen Signalwegen bei Pemphigus in Verbindung gebracht (Liang et al., 2017).

Eines der Aktin-bindenden Proteine, das durch Rho-GTPasen gesteuert werden, ist Adducin. Es ist essentiell für die Zelladhäsion von Keratinozyten, die Stabilität der kortikalen Mikrofilamente und die Inkorporation von Dsg3 in die Zellmembran. Pemphigus-IgG phosphorylieren Adducin, welches daraufhin in den Keratinozyten einen protektiven Effekt ausübt, indem es die durch Antikörper induzierte Fragmentierung von Dsg3 und die Zelldissoziation reduziert, was darauf schließen lässt, dass es an einem Rettungsweg der Zelle, z.B. gemeinsam mit RhoA und der Proteinkinase C (PKC, s. Abschnitt 1.3.5.8), beteiligt ist. (Rötzer et al., 2014)

Es erscheint aufgrund der vorliegenden Daten lohnend, diesen Ansatz in weiteren Studien zu verfolgen. Womöglich stellt die gezielte pharmakologische Beeinflussung des Aktin-Zytoskeletts und der assoziierten Proteine und Signalwege, beispielsweise durch RhoA-Agonisten, eine neue therapeutische Option für Pemphigus-Patienten dar (Waschke et al., 2006; Spindler und Waschke, 2011; Spindler, 2008).

1.3.5.7 Keratin-Zytoskelett

Als Bestandteile des Zellskeletts sind die Intermediärfilamente für die Stabilität der Keratinozyten wichtig (Bär et al., 2014; Seltmann et al., 2013a). Sie regulieren die Integrität (Loschke et al., 2016; Bär et al., 2014) und Adhäsion der Desmosomen (Bär et al., 2014), unter anderem indem sie die Haftungseigenschaften und Verteilung von Dsg1 (Vielmuth et al., 2018b) und die Expression von Dsg3, sowie dessen Verankerung an der Zellmembran beeinflussen (Vielmuth et al., 2018c). Hiermit wirken sie sich auch auf die Mobilität der Keratinozyten aus (Seltmann et al., 2013b,a).

Beim Pemphigus stellt die als Keratinretraktion (Walter et al., 2017) bezeichnete Desorganisation der Intermediärfilamente einen wichtigen Mechanismus der Akantholyse dar. Die Keratinfilamente ziehen sich dabei aus der Peripherie der Zellen (Vielmuth et al., 2018b; Schlögl et al., 2018) und damit von den Desmosomen zurück (Wilgram et al., 1961; Diercks et al., 2009; Bystryn und Grando, 2006; Schmidt et al., 2009) und konzentrieren sich in der Umgebung des Zellkernes (Cirillo et al., 2007a; Hu et al., 1978; Esaki et al., 1995; Schmidt et al., 2009; Schlögl et al., 2018).

Mehrere intrazelluläre Signalwege sind an diesem Vorgang beteiligt (Bystryn und Grando, 2006; Müller et al., 2007; Rubenstein und Diaz, 2006; Esaki et al., 1995; Vielmuth et al., 2018b).

1 Einleitung

So wurde gezeigt, dass Keratinfilamente funktionell mit p38MAPK (Vielmuth et al., 2018c,b; Spindler et al., 2013; Berkowitz et al., 2005), Plakoglobin (Müller et al., 2007) und PKC (s. Abschnitt 1.3.5.8) (Loschke et al., 2016; Vielmuth et al., 2018c; Dehner et al., 2014) interagieren. Beispielsweise beeinflussen sie abhängig von PKC die Endozytose desmosomaler Komponenten (Loschke et al., 2016) und verändern via p38MAPK die Dsg3-Verteilung auf der Zelloberfläche (Vielmuth et al., 2018b). Zudem verhindert eine Hemmung der p38MAPK in vitro die PV-IgG-induzierte Reorganisation des Keratin-Zytoskeletts und reduziert in menschlicher Haut die Ablösung der Keratinfilamente von den Desmosomen (Egu et al., 2017).

Da beim Kontakt humaner Keratinozyten mit Pemphigus-Autoantikörpern die Retraktion der Intermediärfilamente schon vor der Internalisierung von Dsg3 beginnt und zeitlich mit der Zelldissoziation korreliert, wird den Keratinen eine wichtige Rolle unter den Pathomechanismen des Pemphigus zugeschrieben (Schlögl et al., 2018). Die direkte Inhibition der Dsg3-Adhäsion durch Autoantikörper wird zwar nicht von ihnen beeinflusst (Vielmuth et al., 2018b), jedoch besteht ein Zusammenhang zwischen Keratin und dem Turnover von Dsg3 nach Kontakt mit PV-IgG (Vielmuth et al., 2018b). Zudem ist die Umverteilung von Dsg3 an der Zellmembran, die vor dessen Endozytose stattfindet, ebenfalls von Keratin abhängig (Schlögl et al., 2018).

Insbesondere aufgrund der zeitlichen Zusammenhänge scheint der Umbau der Intermediärfilamente also kein sekundärer Effekt, sondern eine der wesentlichen Ursachen für den Adhäsionsverlust der Zellen zu sein. (Schlögl et al., 2018)

1.3.5.8 Proteinkinase C und zelluläre Rettungswege

Desmosomen sind dynamische Strukturen, deren Organisation und Stabilität durch komplexe Mechanismen reguliert werden (Kitajima, 2013; Garrod et al., 2008; Garrod, 2010). Neu an der Zellmembran gebildete Desmosomen sind zunächst abhängig von der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Watt et al., 1984) und weisen nur eine geringe Adhäsionsfähigkeit auf. Dies ändert sich im Laufe der folgenden Tage, wenn die Desmosomen einen wesentlich stabileren und Ca^{2+} -unabhängigen Zustand einnehmen, was als Hyperadhäsion bezeichnet wird. (Cirillo et al., 2010; Kimura et al., 2007; Garrod und Kimura, 2008) In der Epidermis befinden sich anscheinend nahezu alle Desmosomen im hyperadhäsiven Status. Falls nötig, wie beispielsweise nach einer Verletzung, können sie jedoch wieder in die weniger stabile, Ca^{2+} -abhängige Form übergehen, was als essentiell für die Wundheilung angesehen wird. (Garrod und Kimura, 2008; Garrod, 2010; Wallis et al., 2000)

Der Übergang zwischen den beiden Zuständen wird unter anderem durch das Enzym Proteinkinase C (PKC) gesteuert (Cirillo et al., 2010; Kimura et al., 2007; Garrod, 2010; Hobbs und Green, 2012; Wallis et al., 2000). So führt eine pharmakologische Inhibition der PKC zur Zunahme der Zellen mit hyperadhäsiven Desmosomen in vitro (Kimura et al., 2007; Wallis et al.,

1 Einleitung

2000) und in vivo (Garrod, 2010) und damit zu einer Verbesserung der Zelladhäsion (Hobbs und Green, 2012). Eine Aktivierung der PKC hat indes einen gegenteiligen Effekt (Kimura et al., 2007; Wallis et al., 2000). Der genaue Mechanismus hierfür ist bislang ungeklärt, neuere Studien zeigen aber einen Zusammenhang sowohl mit den Keratinfilamenten und deren Haftung an den desmosomalen Plaques, als auch mit der Expression von Plakophilin 1 (Tucker et al., 2014) und einer PKC-induzierten Phosphorylierung des Plaqueproteins Desmoplakin (Kröger et al., 2013; Hobbs und Green, 2012; Dehner et al., 2014), dessen Hemmung zur Ausbildung hyperadhäsiver Desmosomen führt (Dehner et al., 2014). Diese Prozesse sind auch wichtig für die Pemphigus-Pathogenese, da Ca^{2+} -unabhängige hyperadhäsive Desmosomen weniger empfänglich für die Effekte von PV-IgG sind (Tucker et al., 2014; Cirillo et al., 2010), was die Modulation desmosomaler Plaqueproteine (Tucker et al., 2014) oder der PKC als mögliche spezifische Therapieansätze im Fokus der Pemphigus-Forschung platziert.

PV-IgG führen über eine Aktivierung des Enzyms Phospholipase C (PLC) zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und zur Bildung der Botenstoffe Inositol-Triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) (Esaki et al., 1995; Sanchez-Carpintero et al., 2004). DAG wiederum aktiviert PKC (Nishizuka, 1992; Osada et al., 1997), die anschließend intrazellulär umverteilt wird (Osada et al., 1997; Wallis et al., 2000). Eine spezifische Hemmung der PKC verringert die PV-IgG-induzierte Depletion von Dsg3 (Spindler et al., 2011), die Keratinretraktion (Dehner et al., 2014) und die Zelldissoziation (Walter et al., 2017; Spindler et al., 2011) in vitro. Auch in vivo konnte ein protektiver Effekt durch die Beschränkung des Signalweges nachgewiesen werden. So verhindert sowohl eine Inhibition der PKC (Spindler et al., 2011; Sanchez-Carpintero et al., 2004) als auch der vorgeschalteten PLC die durch PV-IgG ausgelöste kutane Blasenbildung in neonatalen Mäusen (Sanchez-Carpintero et al., 2004).

Demgegenüber kann interessanterweise auch die Aktivierung der PKC beim Pemphigus eine gewisse protektive Wirkung entfalten. So ist das aktinbindende Protein Adducin (s. Abschnitt 1.3.5.6), das die Effekte der PV-IgG reduziert, mit einer Aktivierung der PKC assoziiert. Die Rolle der PKC beim Pemphigus ist demnach komplex und umfasst sowohl eine Beteiligung an den pathologischen PV-IgG-vermittelten Vorgängen, als auch an einem Adducin-abhängigen Rettungsweg. (Rötzer et al., 2014)

Ein weiterer intrazellulärer Schutzmechanismus wird durch den sekundären Botenstoff zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) vermittelt, welcher nach Inkubation mit PV-IgG vermehrt in Keratinozyten nachweisbar ist. Eine pharmakologische Erhöhung von cAMP blockiert die Effekte von PV-IgG in vitro und die Blasenbildung im Mausmodell, und zwar mittels einer Hemmung der p38MAPK (s. Abschnitt 1.3.5.2) und abhängig von der Proteinkinase A (PKA), was erneut die komplexe Vernetzung der verschiedenen intrazellulären Signalwege beim Pemphigus unterstreicht. (Spindler et al., 2010)

Offensichtlich sind aber beide Rettungsmechanismen nicht ausreichend, um den massiven Verlust der Zelladhäsion durch PV-IgG zu verhindern. Die gezielte pharmakologische Verstärkung der protektiven Signalwege stellt somit einen möglichen neuen Ansatzpunkt für die Pemphigus-Therapie dar. Insbesondere gilt dies für cAMP-erhöhende Medikamente, die bereits für andere Indikationen, wie die Asthma-Therapie, klinisch eingesetzt werden. (Spindler et al., 2010; Vielmuth, 2014)

1.4 Fragestellung und Zielsetzung

Pemphigus ist eine potenziell lebensbedrohliche Autoimmunerkrankung, die durch epidermale und mukosale Blasenbildung charakterisiert ist. Da bisher keine spezifische Therapie existiert, werden die Patienten in erster Linie immunsuppressiv behandelt, was oft mit erheblichen unerwünschten und gefährlichen Nebenwirkungen einhergeht. Die Entwicklung zielgerichteter und nebenwirkungsarmer Medikamente ist daher oberstes Ziel, um die Lebensqualität der Patienten zu verbessern. Intensive Forschungsarbeiten beschäftigen sich mit dieser Aufgabe, deren Bewältigung ein profundes Verständnis der Pathomechanismen voraussetzt, die der Erkrankung zugrunde liegen.

Verantwortlich für die Blasenbildung beim Pemphigus ist ein Adhäsionsverlust der Keratinozyten aufgrund einer Funktionsstörung der wichtigsten zellulären Haftkontakte, der Desmosomen. Dabei fungieren bestimmte Proteine an der Zelloberfläche, die desmosomalen Cadherine Dsg3 und Dsg1, als Zielantigene von Autoantikörpern. Nach der Antikörperbindung laufen multiple komplexe intrazelluläre Prozesse ab, die überwiegend untereinander vernetzt sind. Bisher ist nicht abschließend geklärt, in welcher Reihenfolge diese pathologischen Veränderungen stattfinden und wie sie genau zusammenspielen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen daher mehrere wichtige Pathomechanismen des Pemphigus eingehender untersucht und insbesondere hinsichtlich ihrer zeitlichen Abfolgen und Interaktionen miteinander korreliert werden. So wird zunächst in Zeitreihen der Einfluss von PV-IgG auf die Zellkohäsion, sowie die Dsg3-Adhäsion, -Reorganisation und -Depletion in kultivierten Keratinozyten untersucht. Anschließend soll die Beteiligung der p38MAPK-, Apoptose- und EGFR-assoziierten intrazellulären Signalwege an PV-IgG-bedingten Veränderungen der Keratinozyten ermittelt und der Effekt von PV-IgG auf das Aktin-Zytoskelett, unter anderem im Hinblick auf einen möglichen Zusammenhang mit p38MAPK, analysiert werden. Darauf folgen Versuche, die den Einfluss der Zelldifferenzierung auf Dsg3-Depletion und Zelldissoziation testen. Abschließend wird mittels spezifischer Peptide und Antikörper die Relevanz von nicht-Desmoglein-Autoantikörpern untersucht und ein möglicher Zusammenhang zwischen der direkten Inhibition der Dsg3-Adhäsion und der Signaltransduktion beim Pemphigus ermittelt werden. Insgesamt soll somit eine genauere

1 Einleitung

Übersicht über die zeitlichen Abläufe und Zusammenhänge der untersuchten Pathomechanismen entstehen.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Für alle Experimente in dieser Arbeit wurden die 1988 erstmals beschriebenen HaCaT (Human adult low calcium elevated temperature)-Zellen verwendet. Diese humane Keratinozyten-Zelllinie wurde ursprünglich aus adulter Haut gewonnen und hat sich anschließend in Kultur spontan immortalisiert. HaCaT-Zellen stellen ein gutes Modell für die Untersuchung von Vorgängen in der menschlichen Haut dar, da sie auch nach multiplen Passagen ihre Fähigkeit zur normalen epidermalen Differenzierung behalten, gut kultivierbar sind und innerhalb weniger Tage konfluente Zellrasen formen (Boukamp et al., 1988). Sie bilden Desmosomen aus, die die Mehrzahl der Cadherine, insbesondere das in dieser Arbeit untersuchte Dsg3 (Schäfer et al., 1994; Nie et al., 2011; Nuber et al., 1995; Hartlieb et al., 2013; Arnold, 2014; van der Wier et al., 2010), sowie alle wichtigen Plaqueproteine (Dehner et al., 2014) enthalten.

Die HaCaT-Zellen wurden im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C in angefeuchteter Luft mit einem Anteil von 5 % CO₂ kultiviert. Alle Arbeiten an den Zellen wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. An jedem zweiten Tag wurde das Nährmedium [Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit einer Konzentration von 1,8 mmol/l Ca²⁺ sowie Zusätzen von 50 U/ml Penicillin G, 50 µg Streptomycin und 10 % fetalem Kälberserum (FCS)] erneuert.

Die Zellen wuchsen in T75-Kulturflaschen bis zur Konfluenz und wurden dann nach Bedarf im Verhältnis 1:3 bis 1:5 geteilt. Dazu wurden sie zunächst mit einer EDTA-Lösung [0,05 % (w/v) EDTA in PBS] für 30 Min. vorbehandelt. Da EDTA ein Chelator von Ca²⁺ ist, die Cadherine aber Ca²⁺ zur Haftung benötigen (Heupel et al., 2008), wurde so die Lösung der HaCaT-Zellen voneinander erleichtert. Danach wurde für zwei Min. eine Trypsinlösung [0,05 % (w/v) Trypsin, 0,02 % (w/v) EDTA in PBS] zugegeben und so die Zellen vom Flaschenboden und voneinander abgelöst. Nach der Resuspension der nun vereinzelt Zellen in DMEM mittels einer elektrischen Pipette wurden sie auf neue T75-Flaschen aufgeteilt oder für die Verwendung in Versuchen auf Deckgläser und Multiwell-Platten ausgesät.

2.2 Patientenserum

Das Patientenserum stellte Prof. Dr. med. Zillikens, Direktor der Klinik für Dermatologie der Universitätsklinik Lübeck, zur Verfügung. Es stammte von einem Patienten mit aktivem PV, dessen

Erkrankung zuvor klinisch, histologisch und serologisch nachgewiesen worden war. Mittels ELISA wurde die Menge an Antikörpern semiquantitativ im Vergleich zu einer Referenzprobe ermittelt (Spindler, 2008). Die Werte lagen für Dsg1 bei 711 U/ml und für Dsg3 bei 5542 U/ml. Das Serum wurde bei -80 °C aufbewahrt und in einer Konzentration von 0,5 mg/ml eingesetzt. Die Nutzung des Patientenserums erfolgte im Rahmen des Ethikvotums Nr. 223/09 der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg.

2.3 Testreagenzien

Im Rahmen der Experimente wurden HaCaT-Zellen mit verschiedenen Testreagenzien behandelt, die hier erläutert und in Tabelle 2.1 zusammengefasst sind.

AK23 ist ein gegen die N-terminale, adhäsive Domäne von Dsg3 gerichteter pathogener, monoklonaler Antikörper. Er wurde erstmals im Jahr 2003 im Maus-Modell erzeugt. Neonatale Mäuse entwickeln nach Injektion von AK23 einen PV-Phänotyp mit typischer kutaner Blasenbildung und PV-Histologie (Tsunoda et al., 2003), weshalb sich AK23 gut zur Untersuchung pathogener Mechanismen beim Pemphigus eignet.

Das 2009 erstmals beschriebene Single Peptid (SP) bindet an die extrazellulären Bereiche von Desmogleinen. Es handelt sich um ein kurzes zyklisches Peptid, das der adhäsiven Domäne von Dsg1 entspricht. Da die entsprechende Domäne des Dsg3 eine starke Homologie aufweist, bindet SP auch an Dsg3. SP imitiert somit ein desmosomales Cadherin und verhindert dadurch gleichzeitig die Adhäsion betroffener Dsg1 und Dsg3 an andere Cadherine. Es wurde gezeigt, dass eine Konzentration von 200 µmol/l SP effektiv die Interaktion von Dsg1 und Dsg3 in einer zellfreien Umgebung reduziert, weshalb diese Konzentration auch in den Experimenten der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. (Heupel et al., 2009b)

Durch die Verbindung zweier SP mittels eines flexiblen Aminohexan-Linkers entsteht ein sogenanntes Tandem Peptid (TP). Dieses hat die Fähigkeit, an zwei Desmogleine gleichzeitig zu binden und so deren Quervernetzung zu erreichen. Durch die Inkubation von HaCaT-Zellen mit TP in einer Konzentration von 20 µmol/l kann der üblicherweise durch pathogene Antikörper ausgelöste Haftungsverlust der Desmogleine signifikant reduziert werden, obwohl TP nicht die Bindung der Autoantikörper an Dsg1 und Dsg3 oder des AK23 an Dsg3 verhindert. (Heupel et al., 2009b)

Zur spezifischen Inhibition von p38MAPK wurde SB202190 (Fabian et al., 2005; Zhang et al., 2007; Berkowitz et al., 2006; Jolly et al., 2010; Mao et al., 2011; Lee et al., 2009) verwendet.

GW2974 ist ein potenter und sehr selektiver Inhibitor des EGFR (Epidermal Growth Factor-Rezeptor). Es vermindert die Phosphorylierung des EGFR um etwa 90 %, ohne die Expression des Proteins zu verändern. (Rusnak et al., 2001)

2 Material und Methoden

Der Breitspektrum-Caspase-Inhibitor zVAD (auch zVAD-FMK, Benzyloxycarbonyl-Valin-Alanin-Aspartat-Fluoromethylketon) bindet an die aktiven Zentren aller bislang bekannter Caspasen und hemmt irreversibel deren Funktion. Da die Enzymfamilie der Caspasen eine zentrale Rolle bei der Apoptose spielt, kann der programmierte Zelltod durch zVAD effektiv verhindert werden. (Bauhammer, 2005; Garcia-Calvo et al., 1998) Das in dieser Arbeit verwendete zVAD wurde von Herrn Prof. Dr. Harald Wajant, Leiter der Abteilung für Molekulare Innere Medizin der Medizinischen Klinik II am Universitätsklinikum Würzburg, zur Verfügung gestellt.

Für die gezielte Beeinflussung des Aktin-Zytoskeletts wurden je nach Bedarf drei verschiedene Mediatoren verwendet. Einerseits kam das aus dem Schwamm *Jaspis johnstoni* stammende Peptid Jasplakinolid zum Einsatz. Dieses induziert die Polymerisation von Aktin-Monomeren zu Filamenten und stabilisiert vorhandenes filamentäres Aktin, indem es dessen Depolymerisation verhindert. (Bubb et al., 1994) Zur Destabilisierung des Aktinnetzwerkes wurde das Makrolid Latrunculin B genutzt. Es wird aus dem Schwamm *Latrunculia magnifica* isoliert und hat die Eigenschaft, an G-Aktin zu binden und dessen Polymerisation zu F-Aktin zu verhindern. Gleichzeitig löst es auch eine Depolymerisation der schon vorhandenen Aktinfilamente aus. (Morton et al., 2000; Spector et al., 1989) Die Wirkung von Latrunculin B kann durch Zugabe von fetalem Kälberserum aufgehoben werden (Spector et al., 1989). Der dritte eingesetzte Mediator, das Mykotoxin Cytochalasin D, führt ebenfalls zu einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts. Seine Wirkung entfaltet es allerdings, anders als Latrunculin B, durch die Bindung an das polymerisierende Ende eines Aktinfilaments, was dort einen weiteren Anbau von G-Aktin verhindert. Bei gleichbleibendem Abbau am anderen Ende kommt es so insgesamt zu einer Verkürzung des betroffenen Filamentes. (Brenner und Korn, 1979) Darüberhinaus löst Cytochalasin D auch eine Spaltung bestehender Aktinnetzwerke aus (Schliwa, 1982).

Tab. 2.1: Testreagenzien

Reagenz	eingesetzte Konzentration	Hersteller
AK23	75 µg/ml	Biozol, Eching, Deutschland
Single Peptid	200 µmol/l	Bachem GmbH, Weil a. Rh., Deutschland
Tandem Peptid	20 µmol/l	Bachem GmbH, Weil a. Rh., Deutschland
SB202190	30 µmol/l	Calbiochem/Merck, Darmstadt, Deutschland
GW2974	100 µmol/l	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
zVAD	20 µmol/l	s. Text in Abschnitt 2.3
Jasplakinolid	200 nmol/l	Calbiochem/Merck, Darmstadt, Deutschland
Latrunculin B	0,5 µmol/l	Biomol, Hamburg, Deutschland
Cytochalasin D	100 nm	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.4 Antikörper

Zur Detektion der gesuchten Proteine mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie (s. Abschnitt 2.5) und auf den Nitrozellulosemembranen beim Westernblotting (s. Abschnitt 2.6.4) wurden Antikörper verwendet.

Die zuerst applizierten Primärantikörper (s. Tab. 2.2) erkannten und banden spezifisch die gesuchten Zielproteine. Anschließend wurden Sekundärantikörper (s. Tab. 2.3) zugegeben, die an die Fc-Teile der Primärantikörper banden und über Funktionalisierungen verfügten, mittels derer sie im letzten Schritt der Versuche sichtbar gemacht werden konnten. Diese unterschiedlichen Verfahren sind im Folgenden bei der Beschreibung der jeweiligen Versuchsanordnungen erläutert.

Tab. 2.2: Primärantikörper

Antikörper	Klonalität	eingesetzte Konzentration	Hersteller
anti-Dsg3 (5G11)	monoklonal	1:200	Zytomed, Berlin, Deutschland
anti-Dsg3	polyklonal	1:1000	Santa Cruz, Dallas, USA
anti- β -Aktin	monoklonal	1:2000	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
anti-p-p38MAPK	polyklonal	1:2000	Cell Signaling, Danvers, USA
anti-p38MAPK	polyklonal	1:2000	Cell Signaling, Danvers, USA
anti-GAPDH	monoklonal	1:2000	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

Tab. 2.3: Sekundärantikörper

Antikörper	eingesetzte Konzentration	Hersteller
Ziege anti-Kaninchen IgG (POX)	1:2000 - 1:3000	Dianova, Hamburg, Deutschland
Ziege anti-Maus IgG (POX)	1: 1000	Dianova, Hamburg, Deutschland
Ziege anti-Maus IgG (Cy3)	1:600	Promokine, Heidelberg, Deutschland

2.5 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

Zunächst erfolgte die Aussaat von HaCaT-Zellen auf runde Deckgläser (Durchmesser 12 mm) im Verhältnis 1:3. Nach fünf Tagen in DMEM hatten sich konfluente Zellrasen gebildet, die

2 Material und Methoden

entsprechend der jeweiligen Versuchsanordnung für eine festgelegte Zeitdauer mit einem oder mehreren Testreagenzien behandelt, anschließend mit PBS gewaschen und mit Aceton (-20 °C) für zwei Min. fixiert und permeabilisiert wurden. Die Permeabilisierung war erforderlich, um Substanzen, die im späteren Verlauf der Versuche appliziert wurden, in die Zelle eindringen zu lassen (Barak et al., 1980). Nach dem Abwaschen des Acetons mit PBS wurden die Deckgläser auf Objektträger aufgelegt. Um unspezifische Antikörperbindungsstellen abzusättigen, wurden die Zellen für mindestens 20 Min. mit 30 µl BSA-NGS [0,1 % (v/v) Rinderserumalbumin mit 10 % (v/v) Ziegen Serum in PBS] pro Deckglas bedeckt. Nach der vorsichtigen Entfernung des BSA-NGS erfolgte die Inkubation der Zellen mit in PBS verdünntem anti-Dsg3-Primärantikörper (Klonnummer 5G11, Konzentration 1:200, s. Tab. 2.2) in einer feuchten Kammer bei 4 °C über Nacht. Nach gründlichem Waschen mit PBS wurde zwei Std. lang bei Raumtemperatur mit dem Ziege anti-Maus-Sekundärantikörper (Konzentration 1:600, s. Tab. 2.3) und gegebenenfalls zusätzlich mit Alexa 488-Phalloidin (Konzentration 1:100) zur Darstellung von F-Aktin inkubiert. Wiederum diente PBS dazu, danach den Überschuss an Antikörpern abzuwaschen. Die fertigen Präparate wurden mit 3 µl NPG [1 % (w/v) n-propyl-Gallat mit 60 % (v/v) Glycerin in PBS] beträufelt und mit der Zelleseite nach unten auf Objektträger gelegt.

Da die Sekundärantikörper mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 (Indocarbocyanin 3) gekoppelt waren, der rotes Licht emittiert, sobald er durch grünes Licht von etwa 550 nm Wellenlänge angeregt wird (Gliem, 2011), konnte das Zielprotein Dsg3 am Fluoreszenzmikroskop indirekt sichtbar gemacht und fotografiert werden. In einigen Versuchen wurde darüber hinaus F-Aktin dargestellt, das mit Alexa 488-Phalloidin markiert worden war. Der Fluoreszenzfarbstoff Alexa 488 trägt seine Nummerierung entsprechend seinem Anregungsmaximum bei blauem Licht der Wellenlänge 488 nm (Panchuk-Voloshina et al., 1999). Er emittiert grünes Licht (Gliem, 2011) und zeichnet sich durch eine starke Leuchtkraft sowie eine hohe Fotostabilität aus (Panchuk-Voloshina et al., 1999). Das an ihn gekoppelte Phalloidin, ein Toxin des Grünen Knollenblätterpilzes, bindet spezifisch an filamentäres Aktin (Wieland et al., 1975; Barak et al., 1980). Daher kann das F-Aktin mittels Alexa 488-Phalloidin hochselektiv gefärbt werden (Panchuk-Voloshina et al., 1999).

2.6 Proteinnachweis in Keratinozyten

2.6.1 Gewinnung der Zelllysate

Es wurden zwei Methoden angewandt, um Proteine aus Keratinozyten zum späteren Nachweis aufzuarbeiten. Einerseits erfolgte die Herstellung vollständiger Zelllysate, in denen sich alle Proteine der Zellen befanden. In anderen Versuchskonstellationen wurden dagegen mittels der Chemikalie Triton X-100 zwei Proteinfractionen getrennt und gesondert voneinander dargestellt.

2.6.1.1 Lysate vollständiger Zellen

HaCaT-Zellen wurden im Verhältnis 1:3 in 12-Loch-Kulturplatten ausgesät und in DMEM gehalten. Für die Experimente wurden sie je nach Versuchsanordnung für eine bestimmte Zeitdauer mit den entsprechenden Testreagenzien oder Seren inkubiert. Das DMEM wurde anschließend entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nun wurden 80 µl dreifach konzentrierter Probenpuffer [2,27 g Tris, 6 g SDS, 37,8 g Glycerin und 2 ml Bromphenolblau (10 mg/ml), ad 100 ml Aqua dest., pH 6,9] zugegeben, die Zellen mittels einer Pipette vom Boden des Kulturgefäßes gelöst und gemeinsam mit dem Puffer in ein Reaktionsgefäß überführt. Um die Proteine aus dem Zellinneren und der Zellmembran freizusetzen und ein homogenes Lysat zu erhalten, wurden die Zellen jeder Probe 10 Sekunden lang mit Ultraschall behandelt.

2.6.1.2 Triton X-100-vermittelte Proteinextraktion

Mit Hilfe der Triton-Extraktion wurden die Zellbestandteile in zwei Gruppen getrennt. Die sogenannte Triton-lösliche Fraktion enthielt den Anteil an Dsg3, der nicht an das Keratin-Zytoskelett gebunden war (Sato et al., 2000). Im Gegensatz dazu befand sich in der Triton-unlöslichen Fraktion der Anteil an Dsg3 (Hartlieb et al., 2014), der zum Zeitpunkt der Gewinnung der Lysate an die Tonofilamente gebunden war (Aoyama und Kitajima, 1999).

HaCaT-Zellen wurden im Verhältnis 1:3 auf 12-Loch-Kulturplatten ausgesät und je nach Versuchsanordnung 3 oder 5 Tage lang wachsen gelassen. Nun folgte die Inkubation mit PV-IgG oder Testreagenzien über die jeweils angegebenen Zeitspannen im Brutschrank. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Es wurden 100 µl eisgekühlter Tritonpuffer [0,5 % (w/v) Triton X-100, 500 mmol/l MES, 25 mmol/l EGTA, 5 mmol/l MgCl₂ in Aqua dest., pH 6,8], frisch angesetzt mit den Proteaseinhibitoren 1 mg/l PMSF, 1 µg/µl Leupeptin, 1 µg/µl Pepstatin und 1 µg/µl Aprotinin, zugegeben und die Zellen 10 Min. lang auf Eis gestellt. Danach wurden sie vom Boden abgekratzt und in ein Reaktionsgefäß überführt, worin sie bei 13.000 Umdrehungen pro Min. bei 4 °C für 5 Min. zentrifugiert wurden. Nun konnte der Überstand vorsichtig abgenommen und in ein weiteres auf Eis stehendes Reaktionsgefäß überführt werden. Zu dem im ersten, ebenfalls eisgekühlten, Gefäß zurückgebliebenen Pellet wurden 50 µl dreifach konzentrierter Probenpuffer mit DTT hinzugegeben und das Pellet durch Ultraschalleinwirkung gelöst. Dieses Gefäß enthielt nun die zytoskelettgebundene Fraktion der Proteine in Probenpuffer. Dem zweiten Gefäß, das den abpipettierten Überstand enthielt, wurden 45 µl dreifach konzentrierter DTT-haltiger Probenpuffer zugefügt und anschließend die Proteine durch Ultraschall homogenisiert. In diesem Gefäß befand sich die nicht an das Zytoskelett gebundene Fraktion der Proteine.

2 Material und Methoden

Anschließend konnten die Proteinkonzentrationen in den Proben ermittelt, die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt und das Zielprotein Dsg3 per Western-Blot und Immundetektion nachgewiesen werden (s. Abschnitt 2.6.3 und 2.6.4).

2.6.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Vor dem Nachweis einzelner Proteine mittels SDS-PAGE und Western-Blot wurde zunächst die Konzentration an Gesamtprotein in den Zelllysaten mit Hilfe der Amidoschwarz-Methode ermittelt.

Hierzu wurde ein Streifen Zelluloseacetatfolie mit einem Bleistift in gleich große Segmente unterteilt. Auf jedes Segment wurden 5 µl einer Probe oder eines Standards mit bekannter Proteinkonzentration aufgetragen. Nach kurzem Trocknen wurden die Streifen für 10 Min. in einer Färbelösung [0,5 % (w/v) Amidoschwarz 10 B, 45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure in Aqua dest.] geschwenkt und anschließend in einer Entfärbelösung [47,5 % (v/v) Methanol und 5 % (v/v) Essigsäure in Aqua dest.] zweimal je 15 Min. lang gewaschen um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Nach dem vollständigen Trocknen wurden die Segmente auseinandergeschnitten und einzeln in Reaktionsgefäßen mit jeweils 1 ml Auflöselösung [10 % (w/v) Trichloressigsäure, 10 % (v/v) Essigsäure und 80 % (v/v) Ameisensäure] übergossen. In der Säure löste sich die Folie bei 50 °C innerhalb von 30 Min. vollständig. Nach ausgiebigem Vortexen konnte die Extinktion der Flüssigkeiten in den Reaktionsgefäßen am Photometer bei 620 nm gemessen werden.

Zwischen den Proteinkonzentrationen und dem Absorptionsvermögen der mit Amidoschwarz 10 B gefärbten Proben besteht ein linearer Zusammenhang (Everitt und Wohlfart, 1987). Da die Quantität an Protein in den Standards bekannt war, konnten deren Extinktionswerte zu einer Kalibriergerade aufgetragen und daran die relative Menge an Protein in den Proben bestimmt werden.

2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wird angewendet, um die in einem Lysat vermischt vorliegenden Proteine voneinander zu trennen (Ornstein, 1964; Shapiro et al., 1967; Lämmli, 1970). Man bedient sich dabei der Tatsache, dass sich kleinere Moleküle in einer Gelmatrix aus Acrylamid und Bisacrylamid schneller fortbewegen können als größere (Davis, 1964; Ornstein, 1964). Um zu verhindern, dass dabei die räumliche Struktur der Proteine das Ergebnis beeinflusst, wird den Zelllysaten SDS (Natriumdodecylsulfat) im Überschuss zugegeben, welches sich an die Proteine anlagert und bei Erhitzung auf 95 °C zur Zerstörung ihrer Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur führt. Zudem maskiert die starke negative Ladung der SDS-Moleküle die eigene Ladung der Proteine. Da sich die ursprüngliche Form und Ladung eines Proteins nun nicht mehr auf sein Laufverhalten im Gel auswirken können, erfolgt die Auftrennung allein nach der molekularen

2 Material und Methoden

Masse. (Shapiro et al., 1967; Spindler, 2008) Hierzu werden die mit Proben bestückten Gele in ein elektrisches Feld verbracht, in dem sich die Proteine in Richtung zur Anode bewegen (Lämmli, 1970; Davis, 1964; Shapiro et al., 1967). Anhand eines Markers mit Proteinen bekannter Größe, der gleichzeitig durch das Gel läuft, kann später die Größe der Zielproteine abgelesen werden (Lämmli, 1970; Shapiro et al., 1967).

Die Elektrophoresen wurden, modifiziert nach der Laemmli-Methode (Lämmli, 1970), in vertikalen Gelsystemen durchgeführt. Um eine Kontamination mit versuchsfremden Proteinen zu verhindern, wurden die Bestandteile der Gelkammer vorab gründlich mit Ethanol gereinigt. Das Trenngel [1,675 ml Polyacrylamid (Gel 30), 2,025 ml Aqua dest., 1,25 ml Tris-Puffer (1,5 M, pH 8,8), 50 µl SDS (10 %), 22,5 µl APS (10 %), 11,25 µl TEMED] wurde zuerst zwischen die beiden im Abstand von 1 mm in die Halterung eingespannten Glasscheiben gegossen. Nachdem es auspolymerisiert war, wurde das Sammelgel [0,3 ml Polyacrylamid (Gel 30), 1,55 ml Aqua dest., 0,65 ml Tris-Puffer (0,5 M, pH 6,8), 25 µl SDS (10 %), 11,25 µl APS (10 %), 5,625 µl TEMED] darüber gegossen und ein Kamm aus Kunststoff eingesteckt, der in dem noch flüssigen Gel die Taschen frei hielt, in die nach der vollständigen Polymerisation des Gels die Proben und der PPL-Marker (Prestained Protein Ladder) vorsichtig hineinpipettiert wurden. In einer mit Elektrophoresepuffer [144 g Glycin, 30 g Tris und 10 g SDS in 10 l Aqua dest.] gefüllten Kammer wurde an das Gel eine Spannung von 80 V angelegt. Sobald der Marker das Ende des Gels erreicht hatte, waren die Proteine ausreichend aufgetrennt und die Elektrophorese wurde beendet (Lämmli, 1970).

2.6.4 Western-Blot und Chemilumineszenz-Verfahren

Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden sie auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, um sie zu immobilisieren und für die anschließende Immundetektion zugänglich zu machen (Towbin et al., 1979). Der Transfer erfolgte mit leichten Modifikationen der von Towbin 1979 entwickelten Methode (Towbin et al., 1979), die von Burnette erstmals mit dem Namen „Western blot“ (Burnette, 1981) versehen wurde.

Für das verwendete „semi dry“-Verfahren wurden zuerst zwei mit Transferpuffer [15,15 g Tris, 73,2 g Glycin, 1 l Methanol und 5 g SDS, ad 25 l Aqua dest.] angefeuchtete Filterpapiere, dann die Nitrozellulosefolie, das Polyacrylamidgel und zuletzt wieder zwei feuchte Filterpapiere in die Blotkammer gelegt. Die Platzierung dieses „Sandwichs“ (Burnette, 1981) erfolgte so, dass das Gel auf der Seite der Kathode und die Nitrozellulosemembran auf der Seite der Anode lag. Daraufhin wurde für eine Dauer von 90 Min. ein Stromfluss von 42 mA angelegt. Die negativ geladenen Proteine wanderten nun in Richtung zur Anode und daher von dem Gel auf die Membran.

2 Material und Methoden

Nach der Entnahme aus der Blotkammer wurde die Nitrozellulosefolie 30 Min. lang in Milchpulver [5 % (w/v) Magermilchpulver mit 0,05 % (v/v) Tween(Polysorbat)-20 in PBS] geschwenkt, um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren. Anschließend folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper, der gegen das im Versuch nachzuweisende Protein gerichtet war (Towbin et al., 1979), für 16 bis 20 Std. am Drehrad bei einer Temperatur von 4 °C.

Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal je fünf Min. lang in PBS-Tween [5 % (w/v) Tween(Polysorbat)-20 in PBS] gewaschen, um überschüssige Erstantikörper zu entfernen. Es folgte die einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur. Die Zweitantikörper banden dabei spezifisch an die Primärantikörper (Towbin et al., 1979), überschüssige Antikörper wurden danach dreimal je fünf Min. lang in PBS-Tween abgewaschen.

Im letzten Schritt wurden die Proteine auf der Nitrozellulosemembran mittels Chemilumineszenz (Dure und Cormier, 1964; Prichard und Cormier, 1968; Whitehead et al., 1979) sichtbar gemacht. Die dafür verwendete ECL (Enhanced chemoluminescence)-Lösung ist ein 1:1-Gemisch aus zwei Lösungen (ECL-Lösung I [500 µl Luminol, 220 µl PCA und 5 ml Tris-Puffer (1 M, pH 8,5), ad 50 ml Aqua dest.] und ECL-Lösung II [32 µl H₂O₂ und 5 ml Tris-Puffer (1 M, pH 8,5), ad 50 ml Aqua dest.]), die erst unmittelbar vor der einminütigen Inkubation der Nitrozellulosefolie zusammengeführt werden. In Anwesenheit eines Katalysators reagiert das Luminol aus der ersten Lösung mit dem Oxidationsmittel Wasserstoffperoxid aus der zweiten Lösung und emittiert dabei Licht. Als Katalysator dient in diesem Fall Meerrettichperoxidase, die an den Sekundärantikörper gebunden ist. (Dure und Cormier, 1964; Prichard und Cormier, 1968) So zeigt die Chemilumineszenz exakt den Ort des gesuchten Proteins auf der Nitrozellulosefolie an. Um diesen dauerhaft sichtbar zu machen, wurde in einer Dunkelkammer ein Röntgenfilm mit dem emittierten Licht geschwärzt, indem der Film auf die Membran aufgelegt, je nach Intensität der Chemilumineszenz einige Min. lang dort belassen und anschließend je eine Min. lang in Entwickler- und Fixierlösung gelegt wurde. Nun konnten auf dem Film die relativen Mengen des Zielproteins in den verschiedenen Proben eines Versuchs miteinander verglichen werden.

2.7 Laserpinzette

Per Laserpinzetten-Technik wurde die Adhäsion von Dsg3 an HaCaT-Zellen unter Einfluss von PV-IgG und verschiedenen Testreagenzien untersucht. Ein Vorteil dieser Methode besteht darin, dass gezielt die Haftung eines bestimmten desmosomalen Cadherins an der Oberfläche lebender Zellen geprüft werden kann. Dies wird durch eine Funktionalisierung von Mikroperlen mit rekombinanten Adhäsionsmolekülen erreicht, die als Probe für die Laserpinzette dienen.

2.7.1 Funktionsprinzip der Laserpinzette

In der naturwissenschaftlichen Forschung werden Laserpinzetten verschiedenster Art und Bauweise verwendet. All diesen Anwendungen ist gemein, dass Laserstrahlen dazu genutzt werden, kleine Partikel zu manipulieren. (Ashkin, 1997) Im hier verwendeten Versuchsaufbau wurden Mikroperlen von 2,8 μm Durchmesser mit Hilfe eines Laserstrahls bewegt. Dies wird durch den Strahlungsdruck der Photonen ermöglicht, der auf die Perlen wirkt und Kräfte in zwei Richtungen ausübt. Die eine Kraft bewegt die Mikroperlen in der Richtung des Laserstrahls, die zweite Kraft entsteht durch Brechung der Lichtstrahlen an den Perlen und zieht diese vom Rand des Laserstrahls zu seiner Mitte hin. Wenn sich eine Perle im Zentrum des Laserstrahls befindet, dann ist sie dort gefangen und folgt den Bewegungen des Strahls. Aus diesem Grund werden Laserpinzetten auch als optische Fallen bezeichnet. (Ashkin, 1997)

In dieser Arbeit wurde eine Laserpinzette genutzt, die aus mehreren Bauteilen am Institut für Anatomie der Universität Würzburg eigens zusammengestellt wurde (Baumgartner et al., 2003). Der verwendete Laser ist ein Nd:YAG-Laser (Wellenlänge 1064 nm). Sein Strahl wird mit einer Leistung von 42 mW über ein Linsensystem durch die hintere Apertur des Objektivs (numerische Apertur: $100 \times 1,3 \text{ \AA}$) eines Mikroskops geleitet. Anschließend durchdringt er die mit DMEM bedeckten und mit Mikroperlen inkubierten HaCaT-Zellen auf dem Deckglas (s. Abschnitt 2.7.3). Das Bild wird mittels einer Kamera auf einen Computermonitor übertragen, um einen Kontakt der Augen mit dem Laserstrahl auszuschließen. Mit Hilfe eines Piezoelements kann das Deckglas in der horizontalen Ebene senkrecht zum Laserstrahl hin und her bewegt werden, sodass man mit dem Laser verschiedene Bereiche des Deckglases erreichen und die ungebundenen Perlen über die Zellen hinweg schieben kann, wie in Abb. 2.1 dargestellt.

2.7.2 Herstellung der Dsg3-beschichteten Mikroperlen

Die Mikroperlen wurden in einer Lösung (30 μg Polystyren-Kügelchen pro ml) geliefert. Sie waren bereits mit Protein A überzogen, das natürlicherweise in der Zellwand des Bakteriums *Staphylococcus aureus* vorkommt und das an die Fc-Teile humaner Immunglobuline bindet (Forsgren und Sjöquist, 1966; Hjelm et al., 1972). Um die Oberfläche der Perlen mit Dsg3 zu beschichten, wurde daher ein rekombinantes Protein, bestehend aus der extrazellulären Domäne von Dsg3 und dem Fc-Teil von humanem IgG1 (Dsg3-Fc) verwendet (Spindler, 2008; Waschke et al., 2005).

10 μl der Perlenlösung wurden zunächst zweimal mit 100 μl NaH_2PO_4 (Konzentration 0,1 mol/l, pH 8,1) gewaschen. Anschließend wurden 10 μg Dsg3-Fc gemeinsam mit 20 μl NaH_2PO_4 (Konzentration 0,5 mol/l, pH 8,1) und 71,8 μl HBSS (Hank's buffered salt solution) zugegeben und die Perlen unter sanfter Rotation bei Raumtemperatur für fünf Std. mit dem Protein inkubiert. Überschüssiges Dsg3-Fc wurde durch zweimaliges Waschen mit 100 μl NaH_2PO_4 (Konzentra-

2 Material und Methoden

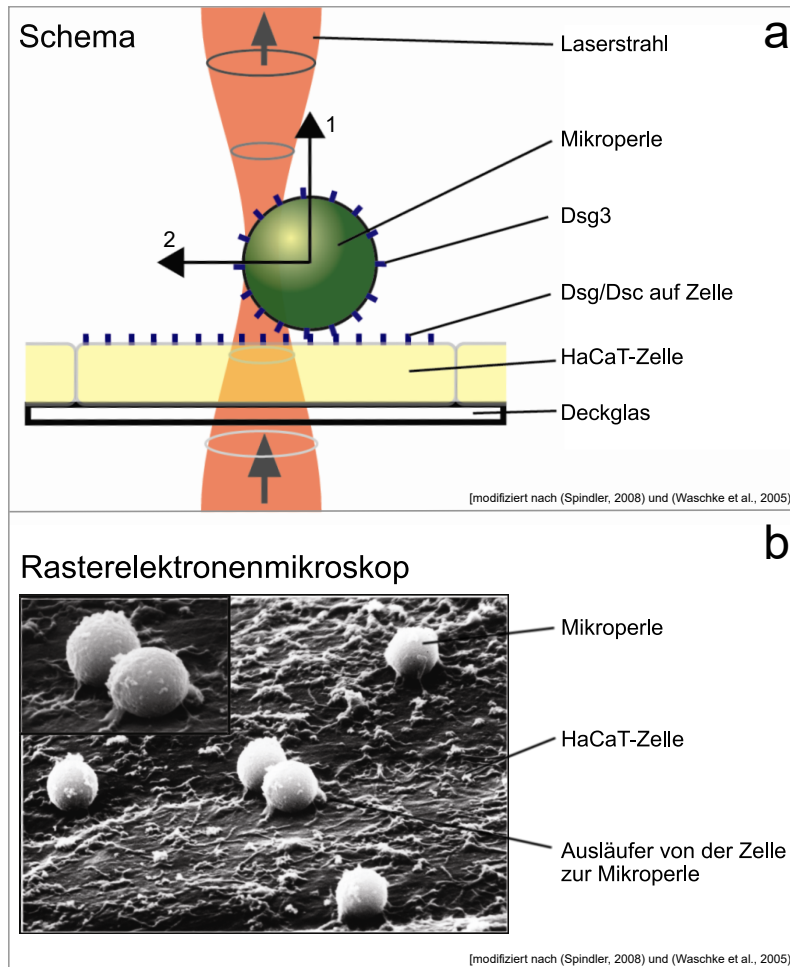


Abb. 2.1: Funktionsprinzip der Laserpinzette

Die schematische Darstellung (a) zeigt den Laserstrahl, der von unten das durchsichtige Deckglaschen und die darauf kultivierten HaCaT-Zellen durchdringt. Eine mit Dsg3 funktionalisierte Mikroperle liegt der mittleren Zelle auf und haftet an Cadherinen auf der Zelloberfläche. Das Äquivalent für diese Kontakte stellt sich im Rasterelektronenmikroskop (b) als feine Ausläufer von der Zelle zur Perle dar.

Wird in der abgebildeten Versuchsanordnung das Deckglas horizontal über den Ausgangspunkt des Laserstrahls hinweg bewegt, so wirken zwei Kräfte auf die vom Laser berührten Mikroperlen. Eine Kraft (Pfeil 1 in a) bewegt die Perle in Richtung des Strahls und hebt sie damit minimal von der Zelloberfläche ab, falls die Bindung der Cadherine nicht stark genug ist um dies zu verhindern. Die zweite Kraft (Pfeil 2 in a) zieht die Perle ins Zentrum des Laserstrahls, wo sie gefangen ist und der horizontalen Bewegung des Lasers folgen muss. Diese Verlagerung der Mikroperlen ist im Mikroskop sichtbar und ermöglicht die Unterscheidung zwischen den fest an HaCaT-Zellen gebundenen Perlen, die vom Laser nicht verschoben werden können, und den freien oder nur schwach gebundenen Perlen. (Spindler, 2008; Waschke et al., 2005)

(Abbildung a wurde erstellt von Volker Spindler und in dessen Dissertation veröffentlicht (Spindler, 2008). Prof. Spindler hat dem Abdruck zugestimmt. Die Abbildung wurde modifiziert unter Verwendung von schriftlichen Angaben aus (Waschke et al., 2005).

Abbildung b stammt aus (Waschke et al., 2005). Sie wurde modifiziert unter Verwendung von (Spindler, 2008). Die Genehmigung des Verlages für den Abdruck der Abbildung liegt vor. Prof. Spindler hat dem Abdruck ebenfalls zugestimmt.)

tion 0,1 mol/l, pH 8,1) entfernt. Es folgte die Quervernetzung der Dsg3-Fc mit dem Protein A durch zweimaliges Waschen in je 100 µl Boratpuffer (0,1 mol/l Natriumtetraborat, pH 9) und anschließender Inkubation mit 4,2 µl DMP (Dimethylpimelimidat) in 95,8 µl Boratpuffer (0,1 mol/l Natriumtetraborat, pH 8,5) unter sanfter Rotation bei Raumtemperatur für 45 Min.. Das DMP wurde durch zweimaliges Waschen mit 100 µl Ethanolamin (0,2 mol/l, pH 8) entfernt. Ein dritter Wasch-Schritt mit Ethanolamin erfolgte unter Rotation bei Raumtemperatur für zwei Std.. Zuletzt wurden die Dsg3-beschichteten Perlen dreimal kurz mit HBSS gewaschen. Um ihre Sedimentati-

on und Aggregation zu verhindern lagerten sie unter kontinuierlicher Rotation bei 4 °C in 100 µl HBSS bis zur Durchführung der Versuche, maximal eine Woche lang.

2.7.3 Anwendung der Laserpinzetten-Technik

Für Versuche mit der Laserpinzette wurden HaCaT-Zellen im Verhältnis 1:3 auf runde Deckgläser (Durchmesser 24 mm) ausgesät. Nach 5 Tagen hatten sich konfluente Zellrasen gebildet. Nun wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und 250 µl einer verdünnten Mikroperlen-Lösung (7 µl des Perlen enthaltenden HBSS aus Abschnitt 2.7.2 in 243 µl DMEM) auf die Zellen gegeben. Innerhalb einer Inkubationszeit von 30 Min. bei 37 °C sanken die Perlen aus der Flüssigkeit auf die HaCaT-Zellen hinab und Dsg3-Proteine auf ihrer Beschichtung bildeten Kontakte mit den desmosomalen Cadherinen an den Zelloberflächen aus. Anschließend wurde versucht, pro Deckglas jeweils 100 Perlen mit der Laserpinzette von der Oberfläche der HaCaT-Zellen zu lösen. Diejenigen Perlen, die mit dem Laser nicht verschoben werden konnten, wurden als fest an die Zellen gebunden gewertet (Waschke et al., 2005).

Nun erfolgte je nach Versuchsprotokoll über unterschiedliche Zeiträume bei 37 °C die Inkubation der Zellen mit PV-IgG oder den Testreagenzien und wiederum die Untersuchung von 100 Perlen pro Deckglas mit der Laserpinzette. Der Anteil der fest auf der Zelloberfläche haftenden Mikroperlen wurde in Relation zur Kontrollbedingung gesetzt, um den Einfluss des jeweiligen Testreagenz auf die Dsg3-vermittelte Adhäsion darzustellen.

In den Versuchen, bei denen eine Zeitreihe erstellt wurde, wurden die Deckgläser nach dem Auszählen der 100 Perlen wieder in den Brutschrank zurückgestellt und nach den angegebenen Zeitintervallen mehrfach wieder zur Untersuchung mit der Laserpinzette hervorgeholt.

2.8 Dispase-basierter Keratinozytendissoziationsversuch

Um festzustellen, wie sich PV-IgG und weitere äußere Einflüsse auf die Kohäsion der HaCaT-Zellen auswirken, wurden Keratinozytendissoziationsversuche durchgeführt, bei denen mittels eines Scherstress versucht wird, die Keratinozyten voneinander zu lösen. Je nachdem, wie stark die funktionelle Adhäsionsfähigkeit beeinträchtigt ist, zerteilt der mechanische Stress eine zuvor intakte Zellschicht in unterschiedlich viele Fragmente, die unter dem Mikroskop gezählt werden können. Die ermittelten Fragmentzahlen erlauben den Vergleich des Haftungsverlustes der HaCaT-Zellen unter verschiedenen Bedingungen und lassen indirekt auf das Ausmaß der Störung der Desmosomenfunktion schließen. (Ishii et al., 2005)

Zunächst wurden HaCaT-Zellen im Verhältnis 1:3 in 24-Loch-Kulturplatten ausgesät. Vor Versuchsbeginn wurde das Nährmedium vorsichtig abgesaugt und die am Boden adhären-

2 Material und Methoden

konfluenten Zellrasen dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 150 μ l Dispase bei 37 °C inkubiert.



Abb. 2.2: Funktionsprinzip des Dissoziationsversuchs

Im Dispase-basierten Keratinozytendissoziationsversuch kann die Auswirkung verschiedener Agenzien auf die Zellkohäsion verglichen werden. Hierzu werden einschichtig konfluent gewachsene Zellrasen aus Keratinozyten über einen bestimmten Zeitraum inkubiert, beispielsweise mit Autoantikörpern eines Pemphigus-Patienten. Anschließend löst man mittels der Protease Dispase die Verbindung der Zellen zum Untergrund, so dass ein frei in der Flüssigkeit schwimmender zusammenhängender Zellteppich vorliegt (a). Dieser wird nun durch gleichmäßiges Pipettieren einem Scherstress ausgesetzt, was ihn zerfallen lässt. Je nachdem, wie stark die Kohäsion der Keratinozyten eingeschränkt ist, entstehen weniger (b) oder mehr (c) Fragmente, die abschließend unter dem binokularen Mikroskop ausgezählt werden können. (Ishii et al., 2005; Walter et al., 2017)

(Die Genehmigung des Verlages für den Abdruck der Abbildungen besteht im Rahmen der Open Access Lizenz CC BY 4.0.)

Dispase ist eine neutrale Protease aus dem Bakterium *Bacillus polymyxa* (Stenn et al., 1989; Kitano und Okada, 1983). Sie löst effektiv die Verbindungen der Zellen zum Untergrund durch selektive Spaltung von Kollagen IV und Fibronectin, die Kontakte der Keratinozyten untereinander bleiben jedoch erhalten (Stenn et al., 1989). Selbst eine 24-stündige Inkubation mit Dispase überstehen die Desmosomen und zugehörigen Tonofilamente unbeschädigt und die Lebensfähigkeit der Zellen wird nicht beeinträchtigt (Kitano und Okada, 1983). Nach Inkubation mit Dispase liegt somit eine intakte Zellschicht aus miteinander verbundenen lebenden Keratinozyten vor, die frei in der Flüssigkeit flottiert (Green et al., 1979).

Innerhalb von 15 Min. hatte die Protease ihre volle Wirkung entfaltet und es wurde 100 μ l HBSS hinzugefügt, sodass sich insgesamt 250 μ l Flüssigkeit gemeinsam mit der frei umherschwimmenden Zellschicht im Reaktionsgefäß befanden. Nun wurde mit einer auf 250 μ l eingestellten Pipette durch fünfmaliges Pipettieren ein gleichmäßiger mechanischer Stress auf jeden Zellrasen

ausgeübt. Direkt im Anschluss wurden die Fragmente, in die jeder Zellrasen zerfallen war, unter einem binokularen Mikroskop ausgezählt (s. Abb. 2.2).

2.9 Auswertung der Daten und grafische Darstellung

Zur Auswertung der Western-Blots wurde mit der Software ImageJ die Intensität der Schwärzung im Bereich der einzelnen Banden auf den entwickelten und eingescannten Röntgenfilmen gemessen, die Schwärzung des Hintergrundes abgezogen und die resultierenden Werte in Relation zum Kontrollwert gesetzt.

Mit der Software Inkscape wurden schematische Zeichnungen angefertigt und die Fotografien der Immunfärbungen bearbeitet, beschriftet und nebeneinander angeordnet.

Die statistische Auswertung des Datenmaterials erfolgte mit der Software Sigma-Stat. Entsprechen die Daten der Gaußschen Normalverteilung, so wurden jeweils zwei Datengruppen mittels zweiseitigem Student's t-Test verglichen. In den Fällen, in denen die Daten nicht normalverteilt waren, wurde ein Wilcoxon-Mann-Whitney-Test durchgeführt. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde ab einem p-Wert $<0,05$ angenommen. Zur Anfertigung der Diagramme diente Microsoft Excel, alle Werte sind grafisch als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt.

2.10 Verzeichnisse der verwendeten Geräte und Chemikalien

Tab. 2.4: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Auflichtmikroskop, AE30	Motic, Wetzlar, Deutschland
Binokularmikroskop, MZ75	Leica, Wetzlar, Deutschland
CO ₂ -Inkubator, C150 (E2)	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Elektrische Pipette Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Elektrophoresekammern	Universität Würzburg (Eigenanfertigung), Würzburg, Deutschland
Epson Stylus DX4400	Seiko Epson Corporation, Suwa, Japan
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2 mot plus	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Heizblock, HBT-2-132	Haep Labor Consult, Bovenden, Deutschland
Kühlzentrifuge 5430R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Laserpinzette mit den Bestandteilen:	

2 Material und Methoden

- Nd:YAG-Laser	Laser 2000, Wessling, Deutschland
- Kamera SensioCam 12Bit	PCO CCD Imaging, Kelheim, Deutschland
- Mikroskop Axiovert 135	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
- Verschiebeeinrichtung	Piezosystem, Jena, Deutschland
Nassblotkammer	peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Rotator, Rotator-Genie	Scientific Industries, New York, USA
Smart Spec TM Plus Spectrophotometer	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Sterilbank, Class II Biohazard Safety Cabinet	ESCO, Singapur
Ultraschallgerät, Sonifier 250	Branson Ultrasonics, Eemnes, Niederlande
Vortexer, Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad, SUB Aqua 34+	Grant Instruments, Royston, England
Zentrifuge, Rotanta 460R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

Tab. 2.5: Software

Bezeichnung	Hersteller
Sigma Stat 3.5	Systat Software, Erkrath, Deutschland
ImageJ 1.42q/1.51j8	Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, USA
Microsoft Excel, 2016 MSO, 16.0.7571.7095, 32 bit	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Inkscape 0.92.0 r15299, Version 3, 2007	Software Freedom Conservancy, Inc., New York, USA

Tab. 2.6: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Deckgläser, 12mm Durchmesser	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Deckgläser, 22mm Durchmesser	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Dynabeads, 2,8 µm Durchmesser	Invitrogen, Carlsbad, USA
Filterpapiere	Thermo Fisher, Waltham, USA
Handschuhe	VWR, Radnor, USA
Nitrozellulosemembran Hybond-C extra	Amersham-Biosc., Freiburg, Deutschland
Objektträger	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland

2 Material und Methoden

Petrischalen 35x10mm Nr. 83.1800	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Protran® Nitrocellulose Transfer Membran	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Röntgenfilme, Super RX FUJI Medical X-Ray-Film 100 NIF	Fujifilm Corporation, Tokio, Japan
12-Well Culture Plate Cellstar®	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
24-Well Culture Plate Cellstar®	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Zelluloseacetatfolie Cellulose Acetate for Electrophoresis	Sartorius Stedim Biotech SA, Göttingen, Deutschland

Tab. 2.7: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Amidoschwarz 10 B	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Alexa 488-Phalloidin	Molecular Probes, Eugene, USA
Ameisensäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aquabator-Clean	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Aprotinin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
APS	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Digitonin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dispase II (>2,4 U/ml in HBSS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DMEM	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DMP	Thermo Fisher, Waltham, USA
DTT	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Entwicklerlösung	Carestream Health, Rochester, USA
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanolamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
FCS	Biochrom, Berlin, Deutschland
Fixierlösung	Carestream Health, Rochester, USA

2 Material und Methoden

Gel 30 Rotiphorese	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
HBSS A3140,9050	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
HCl	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
H ₂ O ₂	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Leupeptin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Luminol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
MES	Biomol, Hamburg, Deutschland
Methanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
MgCl ₂	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumtetraborat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NaH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NGS	Jackson Imm.Res., West Grove, USA
NPG	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PageRuler PPL	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
PBS	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
PCA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Pepstatin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
PMSF	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
SDS	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
SDS-Pellets	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Streptomycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Trichloressigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Tris	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Trypsin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Tween 20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

3 Ergebnisse

3.1 Zeitabfolge der PV-IgG-vermittelten Effekte auf Keratinozyten

Autoantikörper von Pemphigus-Patienten lösen multiple intrazelluläre Veränderungen in den Keratinozyten aus, die in ihrem Zusammenwirken schließlich in der Akantholyse und damit der klinisch sichtbaren kutanen Blasenbildung münden. Die zeitlichen Zusammenhänge dieser Abläufe sind, obschon essentiell für das Verständnis der Pemphigus-Pathogenese, noch sehr unzureichend geklärt, weshalb auch die Einordnung einzelner Mechanismen als Ursache oder Wirkung vielfach schwer fällt.

In der ersten Versuchsreihe dieser Arbeit wurden daher Zeitreihen erstellt, die das Auftreten der Zelldissoziation mit der Verminderung der Dsg3-vermittelten Adhäsion, der reduzierten Dsg3-Konzentration und der Aktivierung der p38MAPK zeitlich miteinander korrelierten.

3.1.1 Zellkohäsion ist bereits nach 30 Min. signifikant reduziert und nimmt danach weiter ab

Zunächst wurde im Dispase-basierten Keratinozytendissoziationsversuch (kurz: Dissoziationsversuch) der Einfluss von PV-IgG auf die Zelladhäsion untersucht. Für jeden der angegebenen Zeiträume wurden konfluent gewachsene HaCaT-Zellen mit PV-IgG inkubiert. Als Kontrolle fungierten HaCaT, denen kein PV-IgG zugegeben wurde. Anschließend wurde der Dissoziationsversuch, wie in Abschnitt 2.8 beschrieben, durchgeführt. Es zeigte sich, dass bereits 30 Min. nach Kontakt der Zellen mit den Antikörpern die Fragmentzahl auf das 2,6 ($\pm 0,9$)-fache der Kontrollbedingung erhöht war, was einem signifikanten Adhäsionsverlust der Keratinozyten entsprach. Die Anzahl der Fragmente stieg mit länger werdender Inkubationszeit kontinuierlich an und erreichte nach 24 Std. das 13,7 ($\pm 3,9$)-fache der Kontrolle. Die Zeitreihe, aus der auch die weiteren untersuchten Zeitpunkte ersichtlich sind, ist in Abb. 3.1 dargestellt.

Demnach waren die PV-Autoantikörper in der Lage, die Zelladhäsion sehr schnell und über mindestens 24 Std. hinweg fortschreitend zu stören.

3.1.2 Dsg3-Adhäsion sinkt innerhalb von 120 Min. stetig ab

Da im Dissoziationsversuch zwar die globale Zellkohäsion verglichen werden kann, nicht aber die jeweilige Beteiligung einzelner desmosomaler Cadherine, wurde im folgenden Laserpinzetten-

3 Ergebnisse

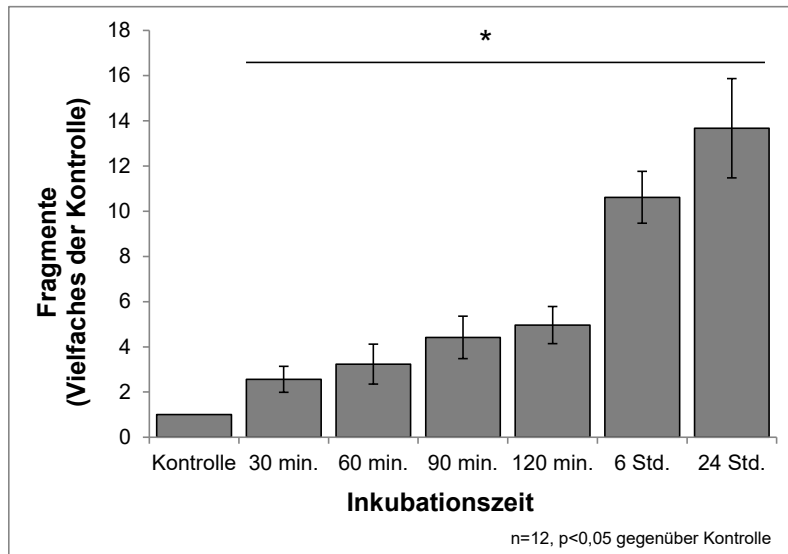


Abb. 3.1: Reduktion der Zellkohäsion durch PV-IgG

Nach Inkubation der HaCaT-Zellen mit PV-IgG nimmt die Zahl der Fragmente im Dissoziationsversuch bereits innerhalb der ersten 30 Min. signifikant gegenüber der Kontrolle zu, was eine bereits früh beginnende Beeinträchtigung der Zellkohäsion aufzeigt. Dieser Effekt setzt sich im Lauf der folgenden 24 Std. kontinuierlich weiter fort.

Experiment separat die Dsg3-vermittelte Adhäsion dargestellt. Die mit Dsg3 beschichteten Mikroperlen wurden mit den HaCaT-Zellen inkubiert und hatten im Brutschrank 30 Min. lang Zeit, Verbindungen mit den desmosomalen Cadherinen auf der Oberfläche der Zellen einzugehen. Daraufhin wurden 100 Mikroperlen mit der Laserpinzette hinsichtlich ihrer Haftung an den HaCaT-Zellen getestet und gezählt, bevor die Zugabe von PV-IgG erfolgte. Unter Einwirkung der Autoantikörper wurde alle 30 Min. erneut die Adhäsion von je 100 Perlen untersucht. Es war zu beobachten, dass bereits nach den ersten 30 Min. signifikant weniger Mikroperlen ($87 \% \pm 2 \%$ des Ausgangswertes) an den HaCaT-Zellen hafteten. Die Anzahl der fest gebundenen Perlen reduzierte sich mit steigender Inkubationszeit weiter, bis auf $48 \% \pm 6 \%$ des Ausgangswertes nach zwei Std. (s. Abb. 3.2).

Dieses Ergebnis zeigt, dass der zuvor im Dissoziationsversuch nachgewiesene frühe Verlust der Zelladhäsion zeitgleich von einer verminderten Dsg3-Haftung begleitet wurde.

3.1.3 Reorganisation von Dsg3 beginnt nach 90 Min.

Um die Lokalisation von Dsg3 in HaCaT-Zellen zu visualisieren, wurde eine indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie durchgeführt. So sollte festgestellt werden, ob und wann PV-IgG zu einer Umverteilung von Dsg3 führen und ob diese Veränderungen zeitlich mit der Zelldissoziation korrelieren. Die Zugabe der PV-IgG zu den konfluenten HaCaT-Zellen erfolgte daher zu identischen Zeitpunkten wie im Dissoziationsversuch. Repräsentative Bilder aus dieser Versuchsreihe

3 Ergebnisse

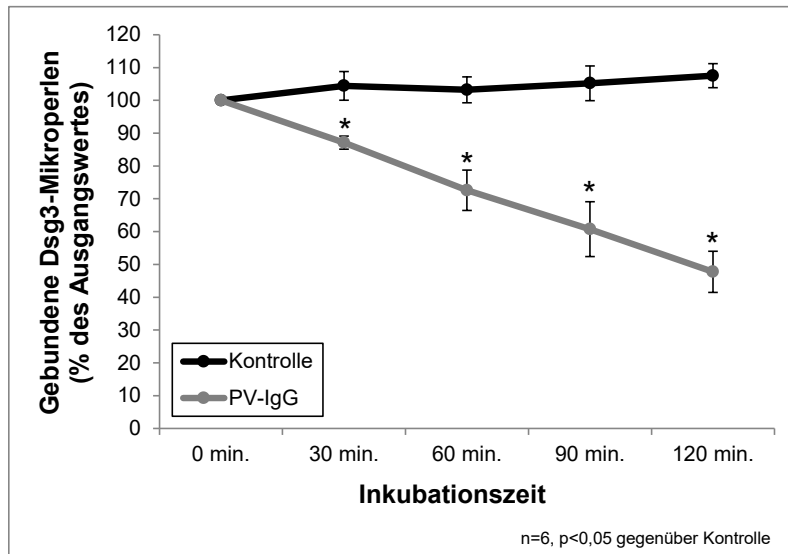


Abb. 3.2: Abnahme der Dsg3-vermittelten Adhäsion durch PV-IgG

Mittels Laserpinzette wurde festgestellt, dass die Haftung der Dsg3-beschichteten Mikroperlen auf der Zelloberfläche bereits 30 Min. nach Applikation der Autoantikörper signifikant abgenommen hatte und sich im Verlauf von zwei Std. immer weiter reduzierte.

zeigen in Abb. 3.3 den Zeitablauf der Umverteilung von Dsg3. Da der Sekundärantikörper mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 gekoppelt war, ist Dsg3 rot dargestellt.

Zu Beginn war Dsg3 homogen entlang der Zellgrenzen verteilt. Diese Anordnung veränderte sich innerhalb der ersten Stunde nach der Inkubation mit PV-IgG nicht. Erst nach 90 Min. zeichnete sich eine beginnende leichte Fragmentierung des Dsg3-Signals ab. Nach zwei Std. erschien dieses schon deutlich desorganisiert und teilweise von der Zellmembran ins Innere der HaCaT-Zellen verlagert. Diese Effekte verstärkten sich nach sechs Std. Inkubationszeit weiter. Nach 24 Std. war die Dsg3-Umverteilung so weit fortgeschritten, dass große Anteile von Dsg3 von den Zelloberflächen verschwunden waren und sogar einige Zellgrenzen wegen des Mangels an Dsg3 nicht mehr erkennbar waren.

Die Immunfluoreszenzmikroskopie machte somit deutlich, dass in HaCaT-Zellen sichtbare morphologische Veränderungen durch PV-IgG im Sinne einer Dsg3-Umverteilung erst später nachweisbar waren als die Zelldissoziation und der Dsg3-vermittelte Haftungsverlust.

3.1.4 Depletion tritt nach 24 Std. in der extradesmosomalen Dsg3-Fraktion auf

Nachdem sich in der indirekten Immunfluoreszenzdarstellung gezeigt hatte, dass PV-IgG in der Lage sind, die regelrechte Verteilung von Dsg3 zu stören und dieses von den Zellgrenzen zu entfernen, stellte sich die Frage, ob PV-IgG auch die Quantität an Dsg3 in den Keratinozyten verändern. Hierzu wurden die Zelllysate mittels Triton X-100 in die zytoskelettgebundene und -ungebundene Fraktion aufgeteilt.

3 Ergebnisse

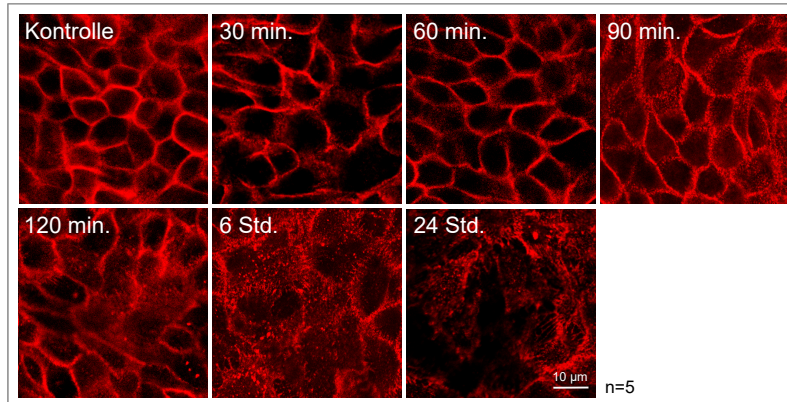


Abb. 3.3: Zeitverlauf der PV-IgG-vermittelten Reorganisation von Dsg3

Die Immunfluoreszenzmikroskopie zeigt die Umverteilung des rot dargestellten Dsg3. In der Kontrolle, sowie zu den Zeitpunkten 30 und 60 Min. nach Antikörperkontakt, war Dsg3 regelrecht überwiegend an den Zellgrenzen lokalisiert. Nach 90 Min. stellten sich erste Zeichen einer Desorganisation ein. Diese Fragmentierung und Verlagerung wurden im Zeitverlauf immer deutlicher, bis nach 24 Std. die Zellgrenzen nur noch partiell erkennbar waren.

Die HaCaT-Zellen wuchsen unter den selben Bedingungen wie in den vorangegangenen Versuchen bis zur Konfluenz. Am fünften Tag nach Aussaat erfolgte die Inkubation mit PV-IgG über die gleichen Zeiträume wie zuvor. Anschließend wurden die Zellen mittels Triton-Extraktion zu Lysaten verarbeitet, die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt und Dsg3 per Western-Blot und Immundetektion sichtbar gemacht. Als Ladungskontrolle fungierte β -Aktin.

Es zeigte sich, dass nach einer Inkubationszeit von 24 Std. eine Depletion von Dsg3 ausschließlich in der Triton-löslichen, also in der nicht-zytoskelettgebundenen Proteinfraction auftrat (s. Abb. 3.4). In der Triton-unlöslichen, zytoskelettgebundenen Fraktion veränderte sich dagegen die Menge an Dsg3 innerhalb von 24 Std. nicht signifikant.

Aus diesem Versuch ergaben sich zwei Erkenntnisse: Zunächst wurde festgestellt, dass die Depletion des nicht-zytoskelettgebundenen Dsg3 bereits zu einem Zeitpunkt begann, an dem noch keine Veränderung der Menge an zytoskelettgebundenem Dsg3 erkennbar war. Darüber hinaus wurde deutlich, dass es sich bei der Dsg3-Depletion insgesamt um einen langsamen Effekt von PV-IgG handelte, der erst deutlich später als die Zelldissoziation, sowie der Haftungsverlust und die Umverteilung von Dsg3 auftrat.

3.1.5 p38MAPK ist von 30 bis 120 Min. aktiviert

Unter den vielen Signalwegen, die mit der Pathogenese des Pemphigus in Verbindung stehen, wird p38MAPK eine zentrale Rolle zugeschrieben (Waschke und Spindler, 2014). Im folgenden Versuch wurde der Aktivierungsgrad von p38MAPK im Zellkulturmodell über einen Zeitraum von 24 Std. nach PV-IgG-Inkubation dargestellt, um den Signalweg in einen zeitlichen Zusammenhang mit den zuvor untersuchten Kennzeichen der Pemphigus-Pathogenese zu setzen.

3 Ergebnisse

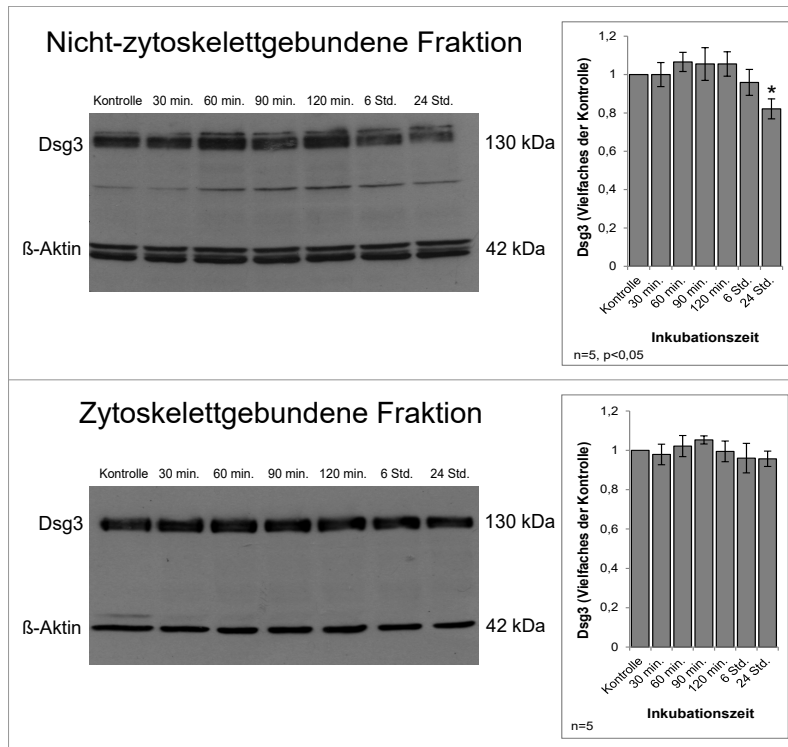


Abb. 3.4: Depletion von nicht-zytoskelettgebundenem Dsg3 durch PV-IgG

Die Gegenüberstellung der Western-Blots und ihrer grafischen Auswertungen zeigt, dass sich die Menge an Dsg3 innerhalb der ersten sechs Std. nach Kontakt mit PV-IgG nicht signifikant veränderte. Erst nach 24 Std. nahm das nicht-zytoskelettgebundene Dsg3 ab. Die zytoskelettgebundene Dsg3-Fraktion war auch zu diesem Zeitpunkt unverändert gegenüber dem Kontrollwert. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet.

HaCaT-Zellen wurden zu den selben Zeitpunkten wie in den vorangegangenen Versuchen mit PV-IgG inkubiert. Im Western-Blot (s. Abb. 3.5) zeigte sich bereits nach 30 Min. eine starke Erhöhung der phosphorylierten p38MAPK (p-p38MAPK), was der aktivierten Form des Enzyms entspricht. Die Menge an p-p38MAPK nahm im Laufe der folgenden 90 Min. langsam ab, war aber auch nach zwei Std. noch deutlich über dem Ausgangswert erhöht. Nach sechs Std. hatte sie das Kontrollniveau wieder erreicht.

Die Phosphorylierung von p38MAPK fand demnach zu einem ebenso frühen Zeitpunkt statt wie die Zelldissoziation und der Verlust der Dsg3-vermittelten Adhäsion, was die Möglichkeit eröffnete, dass der p38MAPK-Signalweg ursächlich an diesen beiden Ereignissen beteiligt sein könnte. Die folgenden Versuche sollten diese Frage aufklären.

3.2 Auswirkung des p38MAPK-Signalwegs auf Zelldissoziation und Dsg3-vermittelte Adhäsion

Das Ziel der folgenden beiden Versuche war es, einen kausalen Zusammenhang zwischen der PV-IgG-vermittelten Aktivierung der p38MAPK und den zeitgleich auftretenden wesentlichen

3 Ergebnisse

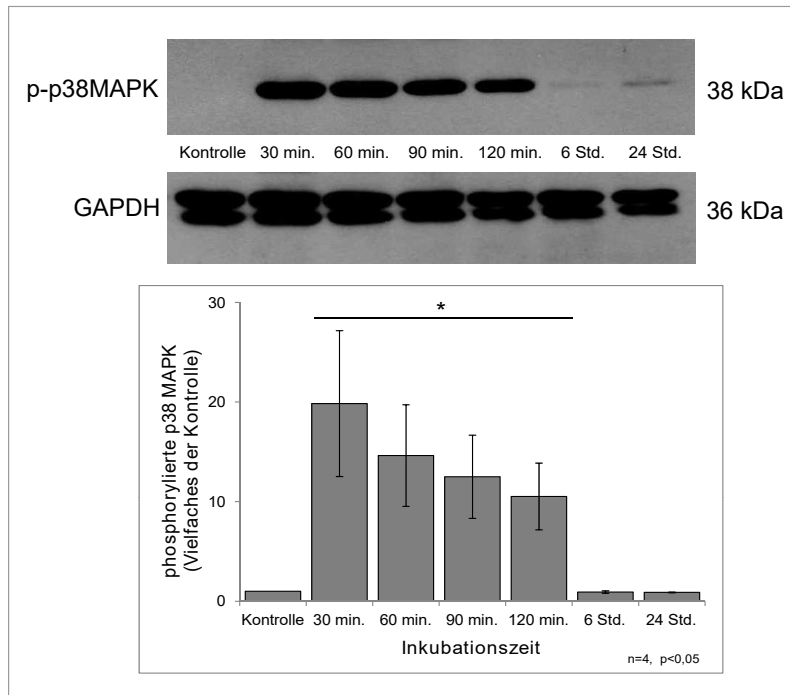


Abb. 3.5: Aktivierung von p38MAPK durch PV-IgG

Die phosphorylierte und damit aktivierte Form des Enzyms p38MAPK fand sich 30 Min. nach Applikation von PV-IgG in großer Menge in den HaCaT-Zellen. Die Aktivierung ging über zwei Std. hinweg zwar schrittweise zurück, lag in dieser Zeit jedoch weiterhin deutlich über dem Ausgangswert. Erst nach sechs Std. war, ebenso wie nach 24 Std., keine relevante Phosphorylierung mehr nachweisbar. GAPDH fungierte als Ladekontrolle.

zellulären Veränderungen nachzuweisen oder auszuschließen. Hierzu wurden HaCaT-Zellen gleichzeitig mit PV-IgG und SB202190, einem Hemmstoff der p38MAPK, inkubiert. Parallel erfolgte eine Inkubation weiterer HaCaT-Zellen allein mit PV-IgG, ohne Zusatz von SB202190. Es wurde eine Inkubationsdauer von zwei Std. gewählt, da im vorigen Versuch eine Phosphorylierung von p38MAPK innerhalb der ersten beiden Std. nachgewiesen worden war (s. Abschnitt 3.1.5).

Im Dissoziationsversuch zeigte sich, dass bei gemeinsamer Applikation von SB202190 und PV-IgG signifikant weniger Fragmente entstanden als unter alleiniger Zugabe von PV-IgG (s. Abb. 3.6). SB202190 war sogar in der Lage, die Fragmentenzahl auf einem Niveau zu halten, das sich statistisch nicht signifikant vom Kontrollwert unterschied.

Anschließend wurde ein Laserpinzettenversuch durchgeführt, für den die HaCaT-Zellen ebenfalls über zwei Std. hinweg entweder mit PV-IgG allein oder in Kombination mit SB202190 inkubiert wurden. Der Anteil der fest an HaCaT-Zellen gebundenen Mikroperlen lag unter Zusatz von SB202190 signifikant höher als bei alleiniger Inkubation mit PV-IgG (s. Abb. 3.6).

Die beiden Tests zeigten, dass eine gezielte Hemmung von p38MAPK sowohl die durch Autoantikörper bedingte Zelldissoziation als auch den PV-IgG-vermittelten Dsg3-Haftungsverlust der kultivierten Keratinozyten reduzierte und wiesen damit eine Beteiligung des Signalwegs an diesen Prozessen nach. Dass die Inhibition des Enzyms nicht ausreichte, um die Auswirkungen

3 Ergebnisse

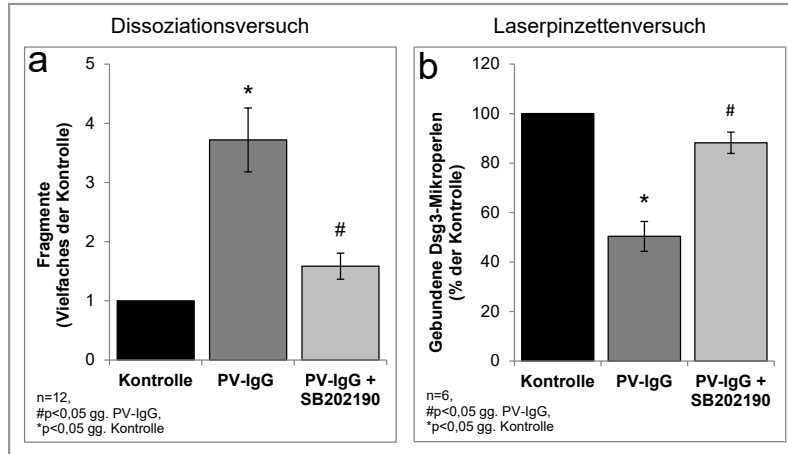


Abb. 3.6: Protektiver Effekt der p38MAPK-Inhibition auf die PV-IgG-vermittelte Zelldissoziation und den Dsg3-Adhäsionsverlust

Der Inhibitor SB202190 verhindert eine Aktivierung von p38MAPK. Im Dissoziationsversuch (a) wurde er zusätzlich zu PV-IgG zu den Keratinozyten gegeben, was nach zwei Std. Inkubationszeit eine geringere Fragmentzahl gegenüber der alleinigen Applikation von PV-IgG zur Folge hatte.

Im Laserpinzettenversuch (b) fand sich ebenfalls ein signifikanter Einfluss des p38MAPK-Inhibitors. So war die Haftung der Dsg3-beschichteten Mikropelien auf der Oberfläche der HaCaT-Zellen nach zwei Std. signifikant verbessert, wenn SB202190 zusätzlich zu PV-IgG zu den Zellen gegeben wurde.

von PV-IgG vollständig zu verhindern, lässt darauf schließen, dass neben p38MAPK noch weitere Auslöser an der Akantholyse mitwirkten.

3.3 Rolle weiterer intrazellulärer Signalwege

In den hier beschriebenen Versuchen wurden zwei weitere Signalwege, die im Zusammenhang mit der Pathogenese des Pemphigus vielversprechend diskutiert werden, auf ihre Beteiligung hin evaluiert. Dazu wurde untersucht, wie sich die Auswirkungen von PV-IgG auf HaCaT-Zellen verändern, wenn jeweils entweder der EGFR-Signalweg oder Caspasen gehemmt werden.

3.3.1 Inhibition des EGFR verringert den Verlust der Dsg3-Adhäsion durch PV-IgG, reduziert aber nicht die Zelldissoziation

Um die Aktivierung des EGFR-Signalweges zu verhindern, wurde der Inhibitor GW2974 verwendet. Sowohl im Dissoziationversuch als auch im Laserpinzettenversuch wurden den konfluenten HaCaT-Zellrasen jeweils zeitgleich für zwei Std. PV-IgG und GW2974 zugefügt. Zum Vergleich dienten die alleinige Inkubation mit PV-IgG und die Kontrolle ohne Antikörper oder GW2974.

Im Dissoziationsversuch wurde nach Abschluss der zweistündigen Inkubationszeit Dispase zu den Zellen gegeben und der Versuch wie zuvor beschrieben durchgeführt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Fragmentzahl zwischen den Zellen, die mit PV-IgG alleine und denen, die zusätzlich mit GW2974 behandelt worden waren (s. Abb. 3.7).

3 Ergebnisse

Im Versuch mit der Laserpinzette hafteten die Perlen unter dem gemeinsamen Einfluss von PV-IgG und GW2974 stärker an der Zelloberfläche als unter PV-IgG alleine, jedoch schlechter als zu Kontrollbedingungen (s. Abb. 3.7).

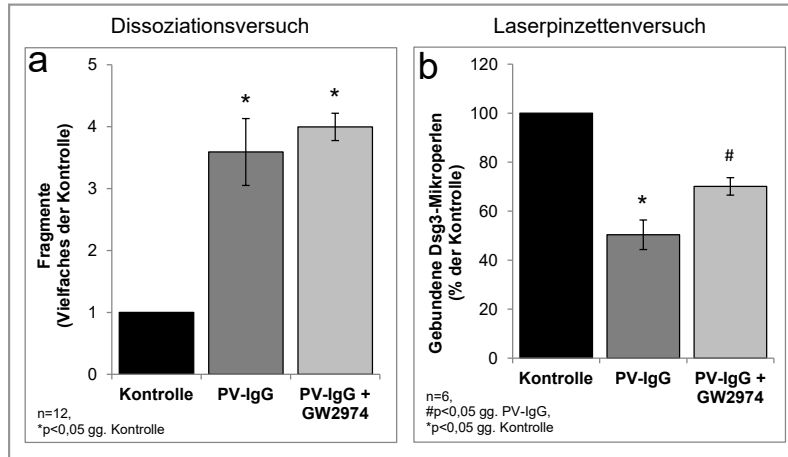


Abb. 3.7: Auswirkungen der EGFR-Inhibition auf die PV-IgG-vermittelte Zelldissoziation und den Dsg3-Adhäsionsverlust

Die Dissoziation der Keratinozyten unterschied sich bei Hemmung des EGFR nicht signifikant von der Zelldissoziation unter alleiniger Applikation von PV-IgG (a). In beiden Fällen nahm die Fragmentzahl nach zwei Std. gegenüber dem Kontrollwert deutlich zu.

Wurde die Aktivierung des EGFR mittels GW2974 verhindert, so hafteten die Dsg3-Mikroperlen in Laserpinzettenversuchen besser an den HaCaT-Zellen als bei alleiniger Inkubation mit PV-IgG (b).

Die Hemmung des EGFR-Signalweges hatte demnach eine protektive Wirkung auf die durch Autoantikörper beeinflusste Dsg3-Adhäsion, ohne jedoch gleichzeitig den Rückgang der Zelladhäsion zu verhindern.

3.3.2 Caspase-Inhibition reduziert den Adhäsionsverlust von Dsg3 unter PV-IgG, hat jedoch keinen Einfluss auf die Zelldissoziation

Um die Rolle von Apoptose zu untersuchen, wurden HaCaT-Zellen parallel zur Inkubation mit PV-IgG auch mit dem Caspase-Inhibitor zVAD inkubiert und der Laserpinzetten- und Dissoziationsversuch analog den Versuchen mit GW2974 (s. Abschnitt 3.3.1) durchgeführt.

Genau wie GW2974 hatte der Einsatz von zVAD im Dissoziationsversuch keinen Effekt. Die Fragmentzahl entsprach zwei Std. nach der Inkubation mit PV-IgG und zVAD annähernd dem Wert, der bei alleiniger Inkubation mit PV-IgG ermittelt wurde (s. Abb. 3.8). Im Gegensatz dazu zeigte die Laserpinzette unter simultaner Einwirkung von PV-IgG und zVAD eine stärkere Haftung der Perlen an der Zelloberfläche als unter PV-IgG alleine (s. Abb. 3.8).

Zusammengefasst fand sich in diesen beiden Versuchen, dass eine Verhinderung der Apoptose den durch PV-IgG ausgelösten Adhäsionsverlust von Dsg3 reduzierte, dabei aber nicht die Zelldissoziation verhindern konnte.

3 Ergebnisse

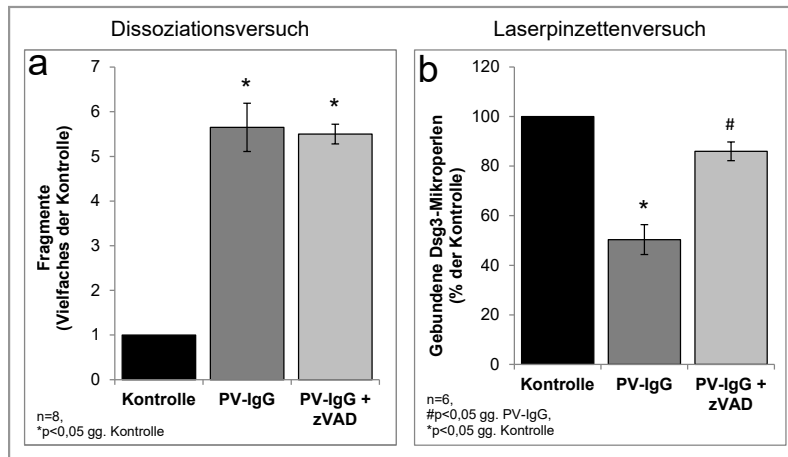


Abb. 3.8: Auswirkungen der Apoptose-Inhibition auf die PV-IgG-vermittelte Zelldissoziation und den Dsg3-Adhäsionsverlust

Im Dissoziationsversuch hatte die Hemmung der Apoptose mittels zVAD keine Auswirkung. Die Fragmentzahl nach zwei Std. Inkubation mit zVAD und PV-IgG gemeinsam entsprach nahezu derjenigen unter Anwendung von PV-IgG alleine.

Die Laserpinzette zeigte eine verbesserte Haftung der Mikroperlen an den HaCaT-Zellen, wenn zusätzlich zu PV-IgG auch der Apoptose-Inhibitor zVAD zu den Zellen gegeben wurde.

3.4 Bedeutung des Aktin-Zytoskeletts

Die Reorganisation des Zellskeletts stellt einen wichtigen Faktor in der Pemphigus-Pathogenese dar (Waschke, 2008). Sowohl die Beeinflussung der Zytokeratine (Vielmuth et al., 2018b) als auch der Aktinfilamente (Gliem et al., 2010) durch Autoantikörper führen zu intrazellulären Veränderungen, wobei die genauen Zusammenhänge, Ursachen und Folgen noch nicht sicher geklärt sind (Waschke, 2008). In der folgenden Versuchsreihe wurden der PV-IgG-vermittelte Umbau der Aktinfilamente und seine Assoziation mit weiteren Pathomechanismen näher untersucht.

3.4.1 Destabilisierung des Aktin-Zytoskeletts führt zur Reorganisation von Dsg3

Sowohl Latrunculin B als auch Cytochalasin D sind potente pharmakologische Mediatoren, die das zelluläre Aktinnetzwerk zerstören. Da ein funktionierendes Aktin-Zytoskelett wichtig für den Aufbau der Desmosomen ist (Godsel et al., 2005; Pasdar und Li, 1993; Pasdar et al., 1991) und zudem berichtet wurde, dass es extradesmosomale Dsg3 an der Zellmembran verankert (Tsang et al., 2012a), wurde nun untersucht, welche Auswirkung eine Destabilisierung filamentären Aktins auf die Verteilung von Dsg3 in kultivierten Keratinozyten hat.

Wie die Immunfluoreszenzmikroskopie in Abb. 3.9 zeigt, war das Aktin-Zytoskelett in HaCaT-Zellen sowohl nach einer dreistündigen Inkubation mit Latrunculin B als auch mit Cytochalasin D erheblich fragmentiert und desorganisiert, wobei der Effekt unter Cytochalasin D noch stärker ausgeprägt war als unter Latrunculin B. Das F-Aktin war verklumpt und die reguläre gürtelförmige kortikale Anordnung, insbesondere unter Cytochalasin D, vollständig zerstört.

3 Ergebnisse

Gleichzeitig hatte in beiden Fällen eine Umverteilung von Dsg3 stattgefunden. Die Färbung war an den Zellgrenzen größtenteils reduziert, die Zellkonturen ließen sich jedoch überwiegend noch nachvollziehen. Bei Cytochalasin D war dieser Effekt etwas deutlicher ausgeprägt als bei Latrunculin B. Im Vergleich mit den zuvor im Zeitverlauf über 24 Std. hinweg untersuchten Auswirkungen von PV-IgG (s. Abb. 3.3 in Abschnitt 3.1.3) lief die Dsg3-Reorganisation unter Modulation des Aktinnetzwerkes schneller ab und war hier nach drei Std. bereits deutlicher ausgeprägt als nach einer sechsständigen Inkubation mit PV-IgG.

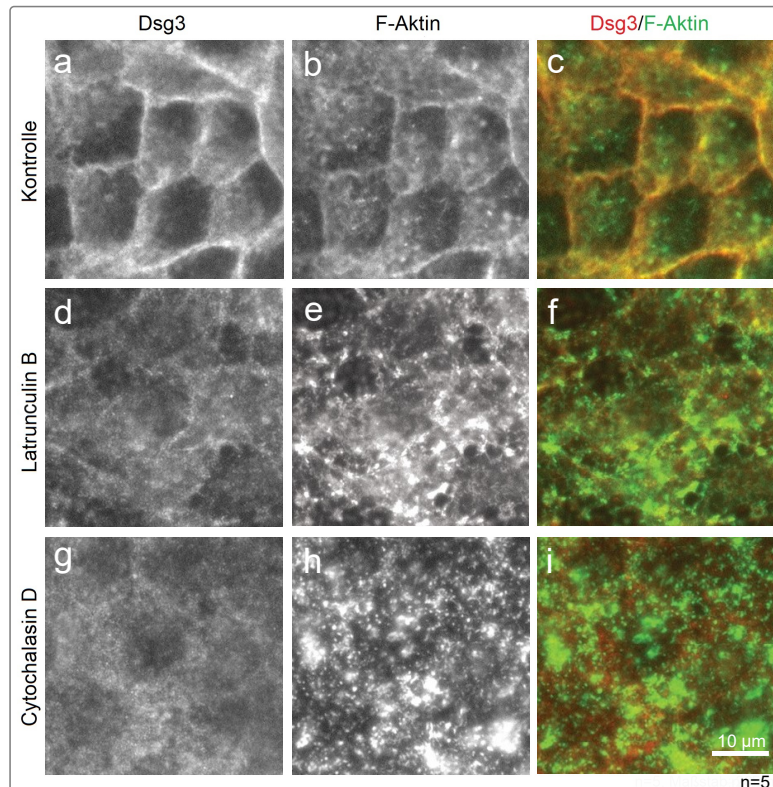


Abb. 3.9: Dsg3-Reorganisation durch Destabilisierung des Aktin-Zytoskeletts

Unter Kontrollbedingungen war Dsg3 regelrecht überwiegend an den Zellgrenzen zu finden (a, rot in c). Aktin stellte sich als organisiertes Netzwerk dar (b, grün in c).

Die dreistündige Inkubation der HaCaT-Zellen mit jeweils einem der beiden Mediatoren Latrunculin B (d-f) oder Cytochalasin D (g-i) führte zu Destabilisierung und Verklumpung des Aktins, sowie zu einer gleichzeitigen Desorganisation und Fragmentierung von Dsg3.

Zusammengefasst zeigten diese Immunfluoreszenzdarstellungen, dass für die regelrechte Anordnung von Dsg3 an den Zellgrenzen ein intaktes Aktinnetzwerk erforderlich ist und dass eine Zerstörung dieses Teils des Zellskeletts zeitgleich zu einer Umverteilung von Dsg3 führt.

3.4.2 PV-IgG-vermittelte Dsg3-Reorganisation wird durch Aktin-Stabilisierung abgemildert

Im Umkehrschluss zum vorangegangenen Versuch war nun von Interesse, ob eine Stabilisierung der Aktinfilamente die Verankerung von Dsg3 an der Zellmembran festigen und die Antikörper-

3 Ergebnisse

vermittelte Dsg3-Reorganisation (s. Abschnitt 3.1.3) hemmen kann. Hierzu wurde ebenfalls eine indirekte Immunfluoreszenzdarstellung durchgeführt, für die HaCaT-Zellen über drei Std. mit dem F-Aktin-Stabilisator Jasplakinolid inkubiert wurden. Einigen Proben wurde nach einer Stunde zusätzlich PV-IgG beigefügt und für die verbleibenden zwei Std. gemeinsam mit Jasplakinolid dort belassen. Zum Vergleich wurden weitere HaCaT-Zellen für zwei Std. allein mit PV-IgG versetzt, ohne Koinkubation mit Jasplakinolid.

Unter dieser letztgenannten Versuchsbedingung lösten PV-IgG innerhalb von zwei Std. eine deutliche Desorganisation von Dsg3 und F-Aktin aus. Dsg3 war verwaschen und F-Aktin deutlich punktförmig fragmentiert. Im Falle einer Vorinkubation mit Jasplakinolid waren diese Veränderungen dagegen sichtbar abgemildert (s. Abb. 3.10).

Interessanterweise führte auch Jasplakinolid alleine zu einer teilweisen verwaschenen Färbung von Dsg3, die jedoch geringer ausgeprägt war als unter Latrunculin B oder Cytochalasin D im vorherigen Versuch (s. Abb. 3.9 in Abschnitt 3.4.1).

Eine pharmakologische Stabilisierung des Aktinnetzwerkes konnte demnach die PV-IgG-vermittelte Dsg3-Reorganisation, einen wichtigen Mechanismus der Pemphigus-Pathogenese, partiell aufhalten. Allerdings führte auch Jasplakinolid selbst bereits zu einer moderaten Umverteilung von Dsg3.

3.4.3 Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts verhindert den PV-IgG-vermittelten Verlust der Dsg3-Adhäsion

Um festzustellen, ob eine Stabilisierung des Aktins neben der Dsg3-Desorganisation auch den Adhäsionsverlust von Dsg3 aufhalten kann, wurden 5 Tage alte, konfluent gewachsene HaCaT-Zellen in der Laserpinzette untersucht. Die Zellen wurden mit Jasplakinolid inkubiert und nach einer Stunde zusätzlich PV-IgG zugefügt. Weitere zwei Std. später erfolgte die Messung. Die Haftung der Dsg3-Mikroperlen war mit Jasplakinolid und PV-IgG gegenüber PV-IgG alleine erheblich verbessert und entsprach mit $99,2\% \pm 11,1\%$ des Ausgangswertes nahezu der Kontrolle (s. Abb. 3.11).

Die direkte pharmakologische Stabilisierung der Aktinfilamente war somit in der Lage, den PV-IgG-vermittelten Verlust der Dsg3-Adhäsion effizient zu verhindern.

3.4.4 Interaktion des p38MAPK-Signalwegs mit dem Aktin-Zytoskelett

Im folgenden Versuch wurde der Frage nachgegangen, inwiefern zwischen dem Aktin-Zytoskelett und dem Signalprotein p38MAPK eine funktionelle Verbindung besteht. Hierfür wurde die Auswirkung einer Modulation des Aktin-Zytoskeletts auf die Zelldissoziation untersucht und eine mögliche Beteiligung von p38MAPK eruiert.

3 Ergebnisse

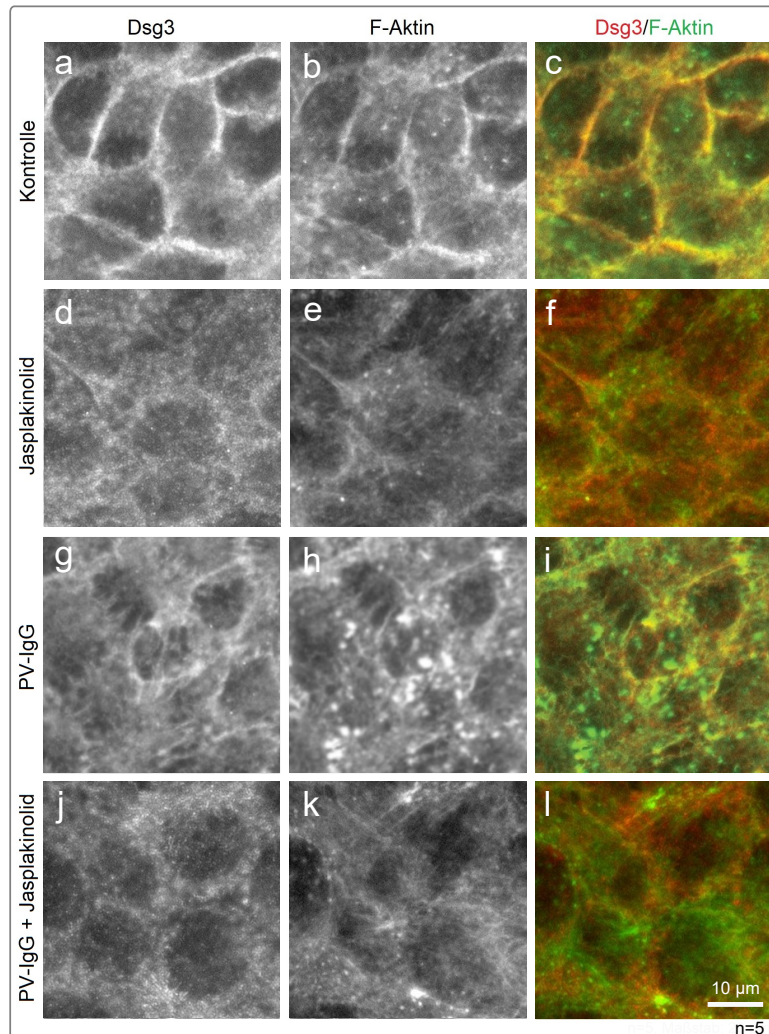


Abb. 3.10: Reduktion der PV-IgG-bedingten Dsg3-Reorganisation durch Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts

In der Kontrolle zeigte sich eine gute Organisation von Dsg3 (a, rot in c) und F-Aktin (b, grün in c). Eine dreistündige alleinige Inkubation mit dem F-Aktin-Stabilisator Jasplakinolid (d-f) löste eine moderate Umverteilung von Dsg3 in den Keratinozyten aus.

Im Gegensatz dazu war jedoch eine Vorinkubation mit Jasplakinolid in der Lage, die von PV-IgG hervorgerufenen Effekte deutlich zu reduzieren. Sowohl die ausgeprägte Störung des Aktinnetzes (h, grün in i) als auch die gleichzeitige Fragmentierung der Dsg3-Färbung (g, rot in i) nach zwei Std. PV-IgG stellten sich erheblich abgemildert dar, wenn die Zellen vorab für eine Stunde mit Jasplakinolid versetzt worden waren (j-l).

Zu 5 Tage alten, konfluent gewachsenen HaCaT-Zellrasen wurde für drei Std. entweder Jasplakinolid oder Latrunculin B zugegeben, wobei in einem Teil der Probengefäße jeweils bereits eine einstündige Vorinkubation der Zellen mit dem p38MAPK-Inhibitor SB202190 stattgefunden hatte.

Beide Mediatoren des Aktin-Zytoskeletts hatten einen negativen Effekt auf die Zellkohäsion. Unter Jasplakinolid stieg die Fragmentzahl im Dispase-basierten Dissoziationsversuch auf das 4,1 ($\pm 0,5$)-fache der Kontrolle an und unter Latrunculin B war dieser Anstieg noch um ein Mehrfaches stärker, auf das 13,1 ($\pm 1,6$)-fache der Kontrollbedingung. In beiden Fällen

3 Ergebnisse

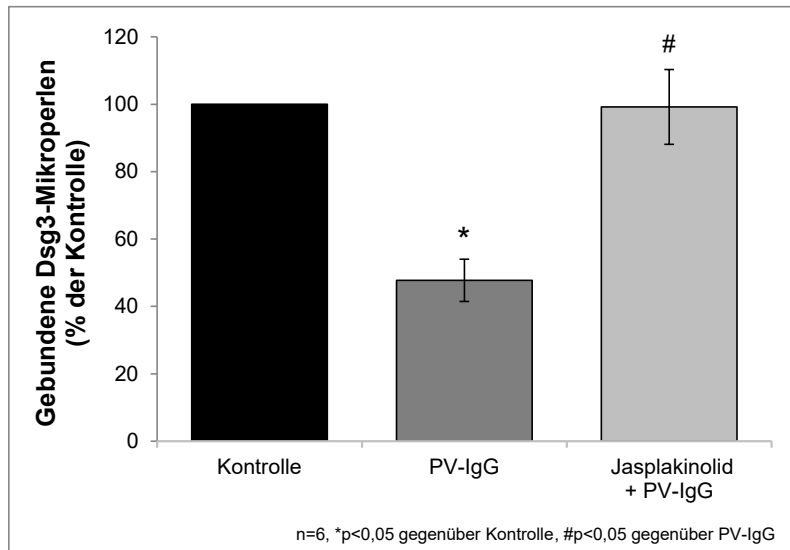


Abb. 3.11: Verhinderung des PV-IgG-bedingten Dsg3-Haftungsverlustes durch Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts

Eine zweistündige Inkubation mit PV-IgG reduzierte im Laserpinzettenversuch die Anzahl der an die Oberflächen der HaCaT-Zellen gebundenen Dsg3-beschichteten Mikroperlen. Wenn jedoch eine Stunde vor den Autoantikörpern bereits der Aktin-Stabilisator Jasplakinolid zu den Zellen gegeben worden war, so verblieb die Haftung der Perlen nahezu auf Kontrollniveau.

reduzierte die Vorinkubation mit SB202190 die Fragmentzahlen signifikant, allerdings nicht auf das Ausgangsniveau (s. Abb. 3.12).

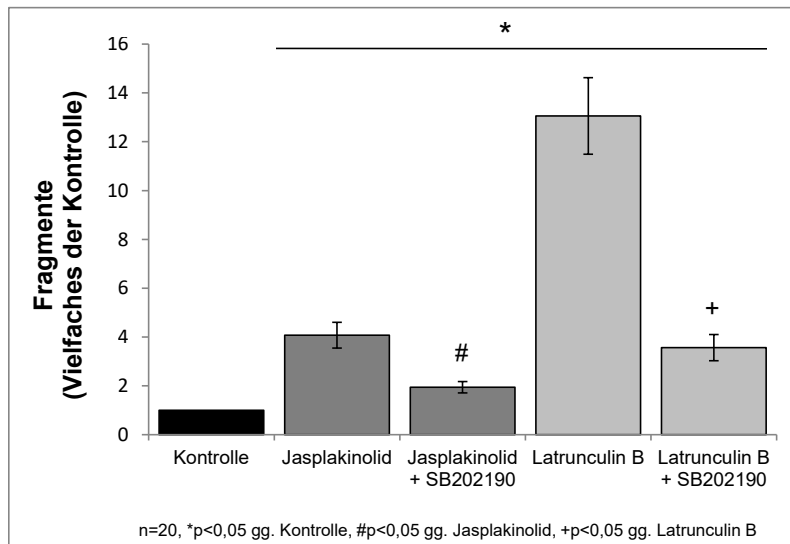


Abb. 3.12: Reduktion des durch F-Aktin-Modulation ausgelösten Adhäsionsverlusts der Keratinozyten mittels Inhibition von p38MAPK

Sowohl der Aktin-Stabilisator Jasplakinolid als auch der Zytoskelett-Inhibitor Latrunculin B führten nach drei Std. zu einer Zunahme der Fragmentzahl im Dissoziationsversuch. In beiden Fällen konnte dieser Effekt durch eine einstündige Vorinkubation der HaCaT-Zellen mit dem p38MAPK-Inhibitor SB202190 reduziert werden, erreichte aber nicht das Kontrollniveau.

Dieses Versuchsergebnis birgt zwei wichtige Erkenntnisse. Primär stellte sich heraus, dass sowohl die Desorganisation des F-Aktins durch Latrunculin B als auch die Stabilisierung der

Aktinfilamente durch Jasplakinolid zu einem Adhäsionsverlust der Keratinozyten führten, wobei die Zerstörung des Aktinnetzwerkes einen stärkeren Effekt hatte als dessen Festigung. Darüber hinaus ließ sich die von den beiden Aktin-Mediatoren ausgelöste Zelldissoziation durch eine Inhibition von p38MAPK erheblich reduzieren, jedoch nicht vollständig aufheben.

3.5 Einfluss des Differenzierungsgrades der Keratinozyten

Für alle bisher in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden HaCaT-Zellen verwendet, die nach der Aussaat 5 Tage in Ca^{2+} -haltigem Medium gehalten worden waren. Da sich die Effekte von PV-IgG abhängig vom Differenzierungsgrad der Kulturzellen unterscheiden können (Spindler et al., 2011), war nun von Interesse, ob dies auch für die Depletion des extradesmosomalen Dsg3 und für die Auswirkung der untersuchten Signalwege auf die Zelldissoziation gilt. Hierzu wurden HaCaT-Zellen nach der Aussaat lediglich 3 statt 5 Tage lang kultiviert, bevor die folgenden Versuche an diesen weniger gut differenzierten Zellen durchgeführt wurden.

3.5.1 Depletion von extradesmosomalem Dsg3 findet in weniger differenzierten Keratinozyten bereits nach zwei Std. statt

Da sich zuvor in den weiter differenzierten HaCaT-Zellen eine partielle Depletion von nicht-zytoskelettgebundenem Dsg3 nach 24 Std. eingestellt hatte (s. Abb. 3.4 in Abschnitt 3.1.4), wurde dieser Zeitpunkt in den 3 Tage alten HaCaT-Zellen zum Vergleich herangezogen. Ergänzend wurde eine Inkubationszeit von zwei Std. gewählt, da sich nach diesem Zeitraum die anderen PV-IgG-vermittelten Veränderungen, wie beispielsweise die Reduktion der Zellkohäsion und Dsg3-Adhäsion, die Dsg3-Reorganisation und die Aktivierung von p38MAPK (s. Abschnitt 3.1) in den 5 Tage alten HaCaT-Zellen deutlich gezeigt hatten.

Die Versuchsanordnung entsprach derjenigen aus Abschnitt 3.1.4. Die nach zwei bzw. 24 Std. Inkubation mit PV-IgG aus den 3 Tage alten HaCaT-Zellen gewonnenen Lysate wurden mittels Triton-Extraktion aufgetrennt und Dsg3 per Western-Blot dargestellt (s. Abb. 3.13). Es zeigte sich wie im vorangegangenen Versuch eine Depletion von Dsg3 in der löslichen Fraktion nach 24 Std., zusätzlich jedoch ähnlich stark ausgeprägt auch bereits nach zwei Std.. In der unlöslichen Fraktion trat dagegen erneut keine Dsg3-Depletion auf.

Der Differenzierungsgrad der Keratinozyten beeinflusste demnach die PV-IgG-vermittelte Depletion des nicht-zytoskelettgebundenen Dsg3, hatte jedoch innerhalb von 24 Std. keine Auswirkung auf die vorhandene Menge an zytoskelettgebundenem Dsg3.

3 Ergebnisse

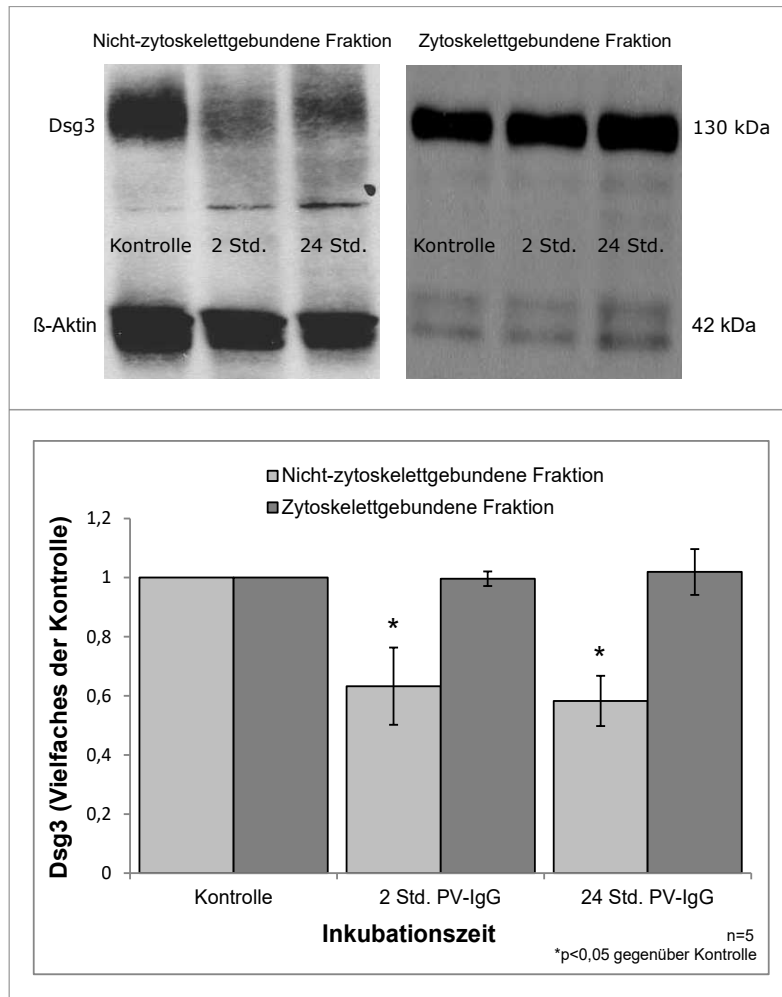


Abb. 3.13: Depletion von Dsg3 in geringer differenzierten Zellen

HaCaT-Zellen, die 3 Tage lang zur Konfluenz gewachsen waren, wurden mit PV-IgG inkubiert. Im Western-Blot zeigte sich bereits nach zwei Std. eine Depletion von nicht-zytoskelettgebundenem Dsg3, die ähnlich stark ausgeprägt war wie nach 24 Std.. Dagegen ließ sich in der zytoskelettgebundenen Fraktion weder nach zwei noch nach 24 Std. eine Veränderung der Dsg3-Menge gegenüber der Kontrolle feststellen. Zur Ladekontrolle diente β -Aktin.

3.5.2 Zelldissoziation ist unabhängig vom Differenzierungsgrad der Keratinozyten und von der Depletion des extradesmosomalen Dsg3

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass in 3 Tage alten HaCaT-Zellen bereits zwei Std. nach der Applikation von PV-IgG eine Depletion von extradesmosomalem Dsg3 stattfand, wurde anschließend untersucht, ob das Ausmaß der Zelldissoziation und der Einfluss intrazellulärer Signalwege zu diesem Zeitpunkt ebenfalls vom Differenzierungsgrad der Zellen abhängen. Hierzu wurden im Dispase-basierten Dissoziationsversuch 3 Tage alte HaCaT-Zellen für zwei Std. entweder mit PV-IgG alleine oder in Kombination mit den Inhibitoren SB202190, GW2974 oder zVAD inkubiert.

3 Ergebnisse

Die Fragmentzahl erhöhte sich nach zwei Std. PV-IgG bei den geringer differenzierten Keratinozyten (s. Abb. 3.14) ähnlich wie bei den 5 Tage alten HaCaT-Zellen (s. Abb. 3.1 in Abschnitt 3.1.1).

Wie bei den besser differenzierten HaCaT-Zellen (s. Abb. 3.6 in Abschnitt 3.2) hatte die Hemmung von p38MAPK durch SB202190 in den 3 Tage alten Keratinozyten (s. Abb. 3.14) eine signifikante Reduktion der PV-IgG-vermittelten Zelldissoziation zur Folge. Die Inhibition des EGFR und der Caspasen zeigten dagegen auch in den weniger differenzierten HaCaT-Zellen keine protektive Wirkung (s. Abb. 3.14), genau wie zuvor in deren weiter entwickelten Pendanten (s. Abb. 3.7 in Abschnitt 3.3.1 und Abb. 3.8 in Abschnitt 3.3.2).

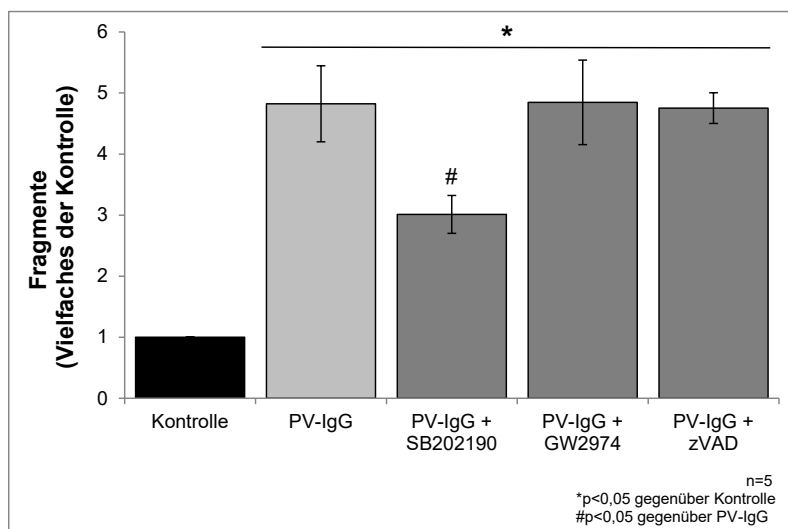


Abb. 3.14: Einfluss der Signalwege auf die PV-IgG-vermittelte Dissoziation von geringer differenzierten Keratinozyten

Konfluent gewachsene HaCaT-Zellen wurden 3 Tage nach Aussaat für zwei Std. mit PV-IgG inkubiert. Bei alleiniger Applikation der Autoantikörper erhöhte sich die Fragmentzahl deutlich gegenüber dem Kontrollwert. Dieser Effekt wurde durch gleichzeitige Zugabe des p38MAPK-Inhibitors SB202190 signifikant reduziert. Im Gegensatz dazu hatten der EGFR-Inhibitor GW2974 und der Caspase-Inhibitor zVAD keine protektive Auswirkung auf die PV-IgG-vermittelte Zelldissoziation.

Zusammengefasst führte eine zweistündige Einwirkung von PV-IgG also zu einer deutlichen Zelldissoziation, unabhängig vom Differenzierungsgrad der HaCaT-Zellen und von der Depletion der extradesmosomalen Dsg3-Fraktion. Eine Hemmung des EGFR oder der Caspasen brachte zu beiden Kulturbedingungen keine Veränderung.

Die Inhibition des p38MAPK-Signalweges wirkte dagegen in beiden Fällen protektiv, wobei sich interessanterweise beim Vergleich der beiden Versuche ein Unterschied herausstellte. So war in den 5 Tage alten HaCaT-Zellen die Fragmentzahl unter Zusatz von SB202190 so stark gegenüber der alleinigen Inkubation mit PV-IgG reduziert, dass sie statistisch nicht mehr signifikant vom Kontrollwert abwich (s. Abb. 3.6 in Abschnitt 3.2), wohingegen die Fragmentzahl in den 3 Tage alten HaCaT-Zellen durch SB202190 weniger stark abgesenkt wurde und noch ein signifikanter Unterschied zum Kontrollwert bestand (s. Abb. 3.14). Die Hemmung von p38MAPK

hatte demnach in den weniger differenzierten Zellen, in denen Dsg3 partiell depletiert war, eine geringere protektive Wirkung als in den älteren Keratinozyten.

3.6 Vergleich der Auswirkungen eines Dsg-spezifischen Peptids (SP) mit AK23 und PV-IgG

Im Serum von Pemphigus-Patienten befindet sich neben den krankheitsrelevanten Autoantikörpern gegen Dsg1 und/oder Dsg3 naturgemäß eine Mischung aus verschiedensten weiteren Immunglobulinen (Yamamoto et al., 2007). Darunter werden häufig auch mehrere Autoantikörper gegen andere Autoantigene nachgewiesen (Amber et al., 2018), deren pathologische Relevanz für die Pemphigus-Erkrankung jedoch umstritten ist (Amagai et al., 2006; Grando et al., 2001; Stanley et al., 2001; Spindler et al., 2018). Um der Frage nachzugehen, ob in den Versuchen dieser Arbeit möglicherweise nicht allein die anti-Dsg3-Antikörper aus der verwendeten IgG-Fraktion für die beobachteten Effekte verantwortlich waren, sondern auch andere Faktoren mitgewirkt haben könnten, wurden die Effekte von PV-IgG mit jenen von AK23 und SP verglichen.

SP ist ein zyklisches Oligopeptid, das durch gezielte Bindung an die EC1-Domäne von Desmogleinen deren Adhäsion direkt inhibiert (Heupel et al., 2009b). Bei AK23 handelt es sich um einen pathogenen monoklonalen murinen Antikörper, der an die adhäsive Domäne von Dsg3 bindet (Tsunoda et al., 2003). Durch den Vergleich der Effekte von PV-IgG mit den Auswirkungen von SP und AK23 können somit die beteiligten Pathomechanismen genauer dargestellt werden, insbesondere im Hinblick auf die Relevanz der Antikörperbindung an Dsg3.

3.6.1 Die Reduktion der Zellkohäsion weist unter AK23 und SP keine signifikanten Unterschiede zu PV-IgG auf

Der Dissoziationsversuch wurde wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben durchgeführt, mit der Änderung, dass zu den über 5 Tage konfluent gewachsenen HaCaT-Zellen anstelle von PV-IgG entweder AK23 oder SP hinzugefügt wurde. Die Inkubationszeiten und der sonstige Versuchsaufbau waren identisch. Es zeigte sich, dass die Fragmentzahl in beiden Fällen kontinuierlich zunahm, beginnend ab 30 Min. nach Inkubation (s. Abb. 3.15). Sowohl AK23 als auch SP lösten bei den kultivierten Keratinozyten eine ähnlich starke Zelldissoziation aus wie PV-IgG (s. Abb. 3.1 in Abschnitt 3.1.1). Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Fragmentzahlen unter PV-IgG, AK23 oder SP.

3 Ergebnisse

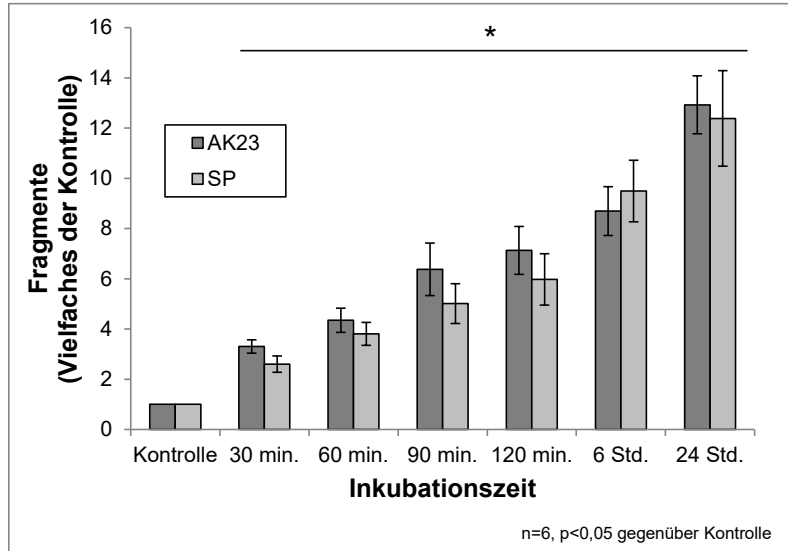


Abb. 3.15: Zeitverlauf der Zelldissoziation unter AK23 und SP

Sowohl AK23 als auch SP führten im Dissoziationsversuch im Zeitverlauf von 24 Std. zu einer ähnlich stark ausgeprägten und stetig ansteigenden Zunahme der Fragmentzahl. (modifiziert nach (Hartlieb et al., 2013). Die Genehmigung des Verlages für den Abdruck der Abbildung besteht im Rahmen der Open Access Lizenz CC BY 4.0.)

3.6.2 Der Rückgang der Dsg3-Adhäsion zeigt unter AK23 und SP einen ähnlichen Verlauf wie unter PV-IgG

Um festzustellen, wie sich AK23 oder SP spezifisch auf die Adhäsion von Dsg3 auswirken, wurden Laserpinzettenversuche, wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben, durchgeführt. Die Inkubation der Deckgläschen erfolgte mit AK23 oder SP anstelle von PV-IgG und es wurde jeweils im Abstand von 30 Min. der Anteil der fest haftenden Mikroperlen ausgezählt.

Es stellte sich heraus, dass AK23 und SP ähnliche Effekte wie PV-IgG auf die Dsg3-vermittelte Adhäsion hatten. Wie Abb. 3.16 zeigt, nahm die Anzahl der haftenden Perlen bereits 30 Min. nach Versuchsbeginn ab und der Effekt verstärkte sich innerhalb der folgenden 90 Min. immer weiter, bis nach zwei Std. nur noch 53,27 % (AK23), bzw. 57,84 % (SP) der zu Versuchsbeginn haftenden Mikroperlen an die Zellen gebunden waren. Dieses Absinken der Dsg3-Adhäsion war nahezu identisch zu der Entwicklung, die zuvor nach Zugabe von PV-IgG zu den HaCaT-Zellen beobachtet worden war (s. Abb. 3.2 in Abschnitt 3.1.2).

3.6.3 Partielle Depletion von Dsg3 tritt unter AK23 zum gleichen Zeitpunkt auf wie unter PV-IgG

Mit Hilfe der Triton X-100-vermittelten Proteinextraktion wurde anschließend untersucht, ob und zu welchem Zeitpunkt AK23 eine Depletion von Dsg3 auslöst.

Dazu wurden wie in Abschnitt 3.1.4 die Triton-lösliche und -unlösliche Proteinfraction getrennt und per Western-Blot dargestellt, mit dem Unterschied dass die Zellen zuvor mit AK23 anstelle

3 Ergebnisse

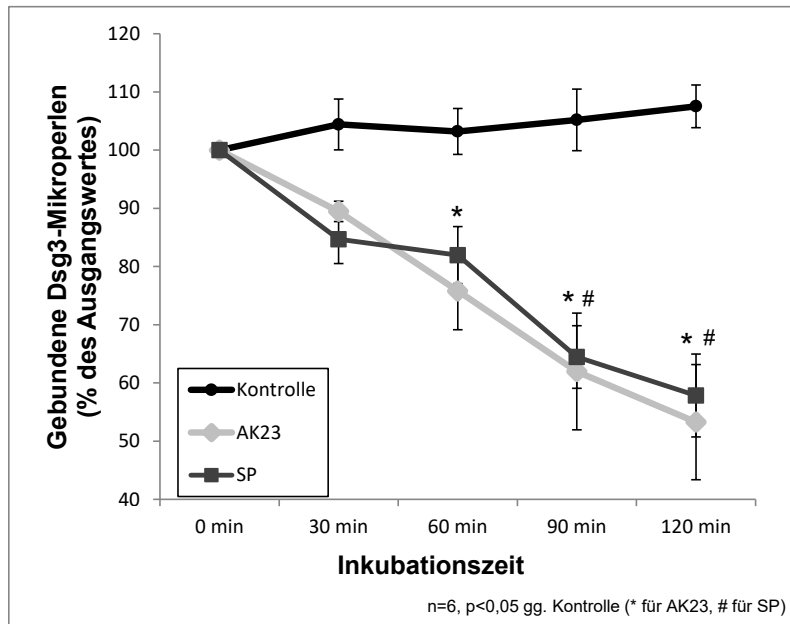


Abb. 3.16: Abnahme der Dsg3-vermittelten Adhäsion unter AK23 und SP

Innerhalb des Untersuchungszeitraumes von zwei Std. reduzierten sowohl AK23 als auch SP die Haftung der Dsg3-beschichteten Perlen an den Keratinozyten zunehmend. (modifiziert nach (Hartlieb et al., 2013). Die Genehmigung des Verlages für den Abdruck der Abbildung besteht im Rahmen der Open Access Lizenz CC BY 4.0.)

von PV-IgG inkubiert worden waren. Genau wie PV-IgG führte auch AK23 in 5 Tage alten HaCaT-Zellen erst nach 24 Std. zu einer Depletion von nicht-zytoskelettgebundenem Dsg3. Die Menge an zytoskelettgebundenem Dsg3 änderte sich auch unter Einfluss von AK23 innerhalb der gesamten Zeitreihe nicht (s. Abb. 3.17).

3.6.4 AK23 und SP aktivieren p38MAPK wie PV-IgG nach 30 Min.

Da sich bereits in mehreren Versuchen eine Beeinflussung intrazellulärer Signalwege durch PV-IgG dargestellt hatte, sollte nun vergleichend festgestellt werden, ob AK23 und SP ebenfalls die Signaltransduktion verändern können.

Als einziges der drei in dieser Arbeit untersuchten Signalproteine hatte p38MAPK sowohl die Dsg3-vermittelte Adhäsion als auch die Zelldissoziation der HaCaT-Zellen beeinflusst (s. Abschnitt 3.2). EGFR- und Caspase-Hemmung hatten dagegen keine Auswirkung auf die Zelldissoziation erkennen lassen (s. Abschnitt 3.3), weshalb sich der folgende Versuch mit AK23 und SP auf den vielversprechenderen p38MAPK-Signalweg konzentrierte.

Hierzu wurden erneut Lysate aus HaCaT-Zellen erstellt und im Western-Blot die phosphorylierte Form von p38MAPK sichtbar gemacht. Da PV-IgG p38MAPK in den ersten 30 Min. am stärksten aktiviert hatten (s. Abb. 3.5 in Abschnitt 3.1.5), wurde dieser Zeitraum auch für die Inkubation mit AK23 und SP gewählt. Es fand sich sowohl nach dreißigminütiger Inkubation mit

3 Ergebnisse

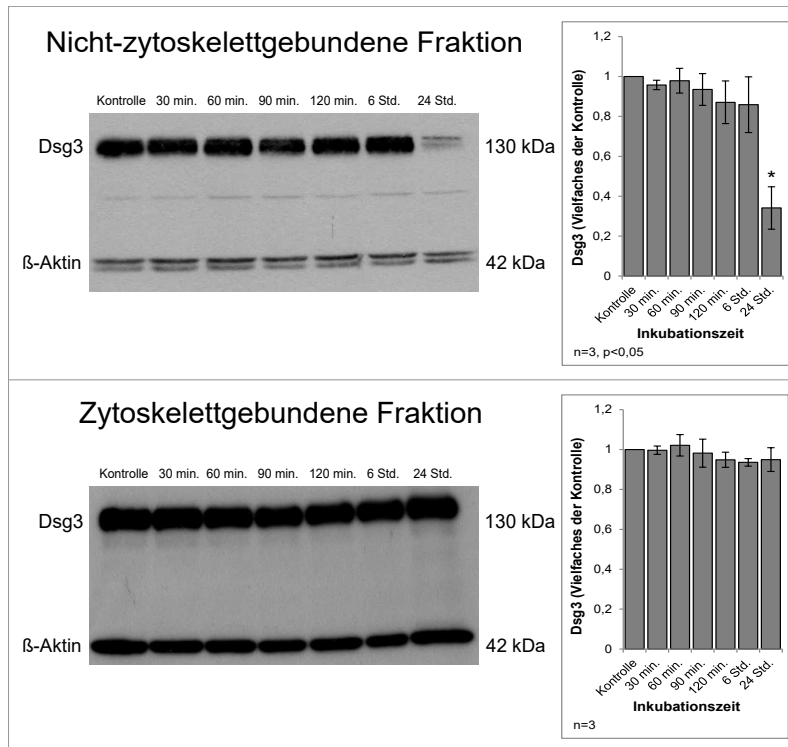


Abb. 3.17: Depletion von nicht-zytoskelettgebundenem Dsg3 durch AK23

HaCaT-Zellen wurden über verschiedene Zeiträume mit AK23 inkubiert, bevor eine Trennung der Proteinfractionen mittels Triton X-100 und eine Darstellung im Western-Blot erfolgten.

Zunächst blieb die Dsg3-Menge ohne signifikante Veränderung. Erst nach 24 Std. fand sich eine Depletion des nicht-zytoskelettgebundenen Dsg3. Im Gegensatz dazu war die zytoskelettgebundene Dsg3-Fraktion über den kompletten Zeitraum hinweg konstant. (modifiziert nach (Hartlieb et al., 2013). Die Genehmigung des Verlages für den Abdruck der Abbildungen besteht im Rahmen der Open Access Lizenz CC BY 4.0.)

AK23 als auch mit SP eine deutliche Aktivierung von p38MAPK im Vergleich zum Kontrollwert (s. Abb. 3.18).

In ihrer Gesamtheit zeigten die vier Versuche dieses Kapitels (s. Abb. 3.15, 3.16, 3.17 und 3.18), dass sowohl der monoklonale Dsg3-Antikörper AK23 als auch das gezielt zur Hemmung der direkten Desmoglein-Interaktion hergestellte Peptid SP in der Lage sind, nahezu identische Veränderungen in den kultivierten Keratinozyten auszulösen wie die Dsg3-Autoantikörper aus PV-IgG. Ein wesentlicher Einfluss weiterer Bestandteile von PV-IgG, insbesondere eine relevante Beteiligung von nicht-Desmoglein-Antikörpern, schien damit zumindest im verwendeten Zellkulturmodell nicht vorzuliegen.

3 Ergebnisse

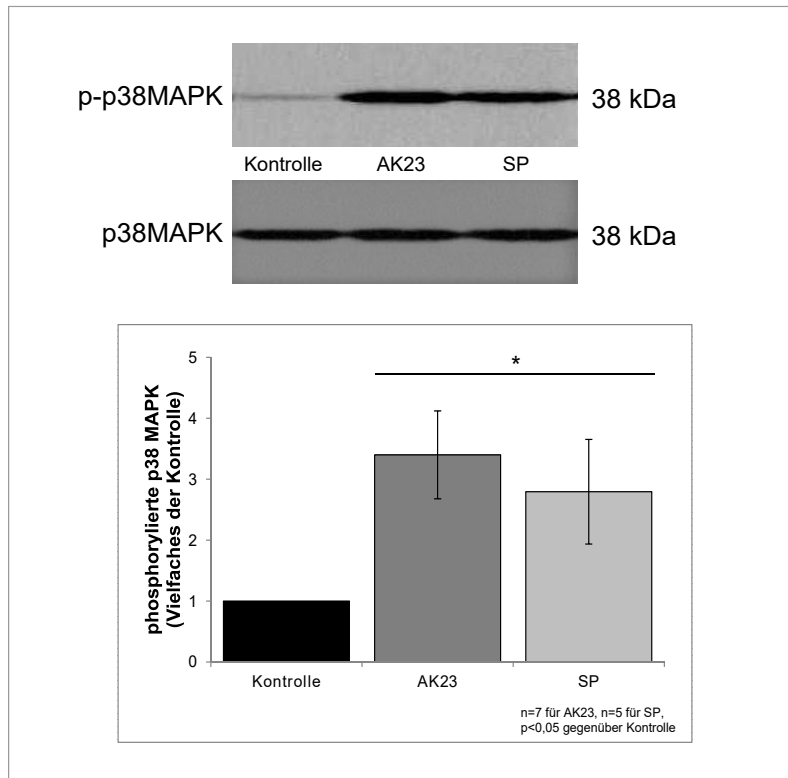


Abb. 3.18: Aktivierung von p38MAPK durch AK23 und SP nach 30 Min.

Der anti-Dsg3-Antikörper AK23 und das Peptid SP führten innerhalb einer Inkubationszeit von 30 Min. jeweils zu einer deutlichen Zunahme der phosphorylierten p38MAPK im Western-Blot. Dies weist eine signifikante Aktivierung des Enzyms in den HaCaT-Zellen nach. Als Ladekontrolle fungierte die Gesamtmenge an p38MAPK. (modifiziert nach (Spindler et al., 2013). Die Genehmigung des Verlages für den Abdruck der Abbildungen liegt vor.)

3.7 Modulation der Effekte von AK23 und PV-IgG durch ein Dsg-quervernetzendes Peptid (TP)

Fügt man zwei SP mittels eines flexiblen Verbindungsstückes zusammen, so entsteht ein Dimer, genannt Tandem Peptid (TP). Wenn bei der passenden Konzentration die beiden Anteile eines TP an zwei Desmogleine binden, dann wird deren Interaktion verstärkt und die Haftung der Desmosomen erhöht. (Heupel et al., 2009b) In den folgenden Versuchen wurde der Einfluss von TP auf Antikörper-vermittelte Pathomechanismen des Pemphigus untersucht.

3.7.1 TP reduziert die Zelldissoziation

Um den Effekt von TP auf die durch Antikörper hervorgerufene Zelldissoziation der Keratinozyten darzustellen, wurden HaCaT-Zellen zwei Std. lang zusätzlich zu PV-IgG oder AK23 auch mit TP inkubiert. Im anschließend durchgeführten Dissoziationsversuch waren die Fragmentzahlen in den mit TP behandelten Reaktionsgefäßen deutlich reduziert gegenüber den Fragmentzahlen

3 Ergebnisse

nach alleiniger Applikation von AK23 oder PV-IgG (s. Abb. 3.19). TP war demnach in der Lage, den durch Antikörper bedingten Verlust der Zellhaftung erheblich zu reduzieren.

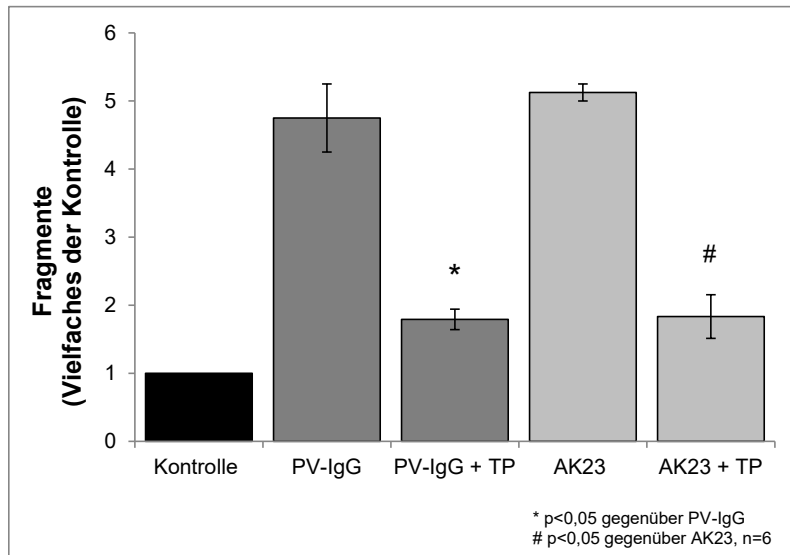


Abb. 3.19: Reduktion der PV-IgG- und AK23-induzierten Zelldissoziation durch TP

Im Dissoziationsversuch an HaCaT-Zellen war die Fragmentzahl nach zweistündiger Inkubation mit dem Peptid-Dimer TP und PV-IgG deutlich gegenüber der alleinigen Applikation von PV-IgG reduziert. Ein ähnlicher Effekt stellte sich ein, wenn die Zellen mit TP zusätzlich zu AK23 versetzt wurden. (modifiziert nach (Spindler et al., 2013). Die Genehmigung des Verlages für den Abdruck der Abbildung liegt vor.)

3.7.2 TP vermindert die Antikörper-induzierte Aktivierung von p38MAPK

Im nächsten Schritt sollte festgestellt werden, ob TP auf rein mechanische Art die Adhäsion der Keratinozyten verbessert, oder ob das Peptid zusätzlich intrazelluläre Signalwege beeinflusst. Da sich im Rahmen dieser Arbeit bereits gezeigt hatte, dass SP p38MAPK aktiviert (s. Abschnitt 3.6.4), wurde nun untersucht, ob TP ebenfalls eine Auswirkung auf die Phosphorylierung dieser Kinase hat.

Zu konfluenten HaCaT-Zellrasen wurden für 30 Min. entweder PV-IgG oder AK23 zugegeben, jeweils allein oder nach dreißigminütiger Vorinkubation mit TP. Anschließend erfolgte die Gewinnung der Zelllysate, die per SDS-PAGE und Western-Blot verarbeitet wurden, um die Menge an phosphorylierter p38MAPK in jedem Lysat darzustellen.

Es fand sich in beiden Fällen eine signifikant geringere Menge an phosphorylierter p38MAPK, wenn zusätzlich zu den Antikörpern auch TP anwesend war (s. Abb. 3.20). Der zuvor ermittelte protektive Effekt des Peptid-Dimers auf die Zelldissoziation (s. Abschnitt 3.7.1) könnte demnach zum Teil auf der Einschränkung dieser Signalkaskade beruhen.

3 Ergebnisse

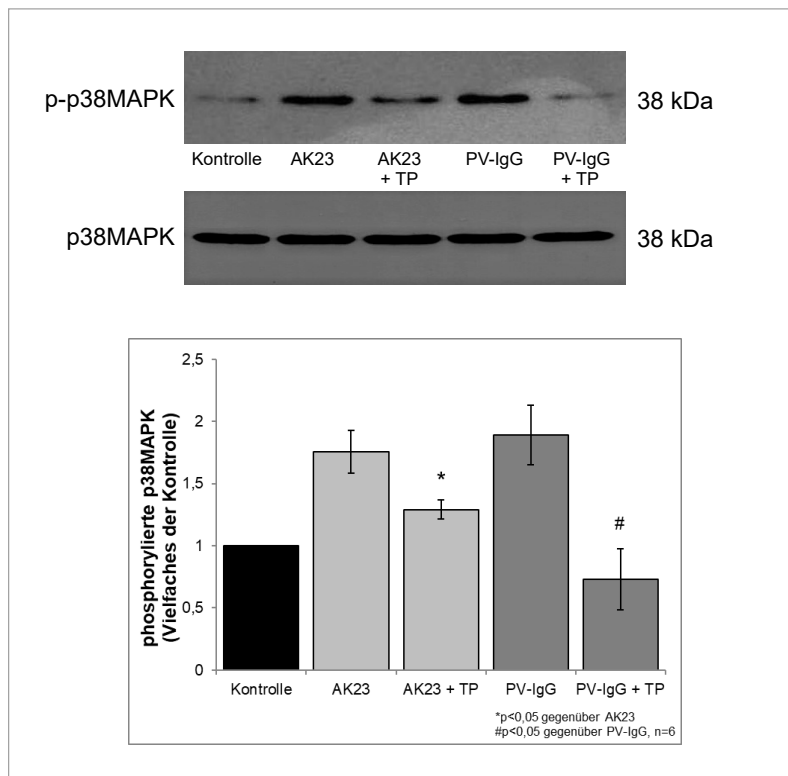


Abb. 3.20: Verminderung der Antikörper-vermittelten Phosphorylierung von p38MAPK durch TP

Das Peptid-Dimer TP reduzierte die Aktivierung von p38MAPK durch PV-IgG oder AK23. Im Western-Blot zeigte sich bei Inkubation der Keratinozyten mit Antikörpern und TP jeweils eine signifikant geringere Menge an phosphorylierter p38MAPK als in Abwesenheit von TP. Als Ladekontrolle diente die Gesamtmenge an p38MAPK. (modifiziert nach (Spindler et al., 2013). Die Genehmigung des Verlages für den Abdruck der Abbildungen liegt vor.)

4 Diskussion

4.1 Eine Dsg3-Depletion ist für die frühen Stadien der Pemphigus-Pathogenese nicht erforderlich

Obgleich die Pemphigus-Forschung bereits eine Vielzahl von Erkenntnissen über die pathologischen Prozesse, die durch die Autoantikörper in den Keratinozyten der Patienten ausgelöst werden, identifiziert hat (Spindler et al., 2018; Spindler und Waschke, 2018), fehlte bislang eine eingehende Untersuchung der zeitlichen Zusammenhänge. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden in mehreren Zeitreihen, die die ersten 24 Std. nach Kontakt kultivierter humaner Keratinozyten mit PV-IgG abdeckten und dabei besonders intensiv die Vorgänge in den ersten beiden Std. beleuchteten, mehrere wichtige Pathomechanismen des Pemphigus miteinander korreliert. Als ein zentrales Ergebnis fand sich dabei, dass der Verlust der Zelladhäsion und der Dsg3-Haftung, ebenso wie die Umverteilung von Dsg3, bereits zu einem wesentlich früheren Zeitpunkt als die Dsg3-Depletion stattfinden.

So zeigte die Immunfluoreszenzdarstellung, dass die Umverteilung von Dsg3 nicht notwendigerweise mit einer Abnahme der Gesamtmenge an Dsg3 einhergehen muss oder gar funktionell mit der Depletion gleichzusetzen ist. Dies steht im Einklang mit Literatur, die besagt, dass PV-IgG primär nicht durch Depletion von Dsg3, sondern durch die Reduktion des Einbaus neuer Dsg3-Proteine in Desmosomen (Oktarina et al., 2011; Cirillo et al., 2006; Sato et al., 2000; Mao et al., 2009) und eine Absenkung der Desmoglein-Halbwertszeit wirken (Cirillo et al., 2006).

In der Triton X-100-vermittelten Zellfraktionierung stellte sich heraus, dass die Depletion des extradesmosomalen Dsg3 derjenigen des desmosomalen Dsg3 vorangeht. Dies deckt sich mit Studien anderer Arbeitsgruppen, in denen ebenfalls zuerst die nicht-zytoskelettgebundene Dsg3-Fraktion depletiert wurde (Jolly et al., 2010; Yamamoto et al., 2007; Aoyama und Kitajima, 1999). Zwar begann in den Arbeiten dieser Gruppen die Depletion von Dsg3 insgesamt früher (Jolly et al., 2010), zum Teil schon nach 20 (Aoyama und Kitajima, 1999) oder 30 Min. (Yamamoto et al., 2007; Jennings et al., 2011), jedoch lässt sich dieser Unterschied dadurch erklären, dass andere Arten von Kulturzellen verwendet wurden, wie beispielsweise Plattenepithelkarzinom-Zellen (Yamamoto et al., 2007; Aoyama und Kitajima, 1999), die möglicherweise empfindlicher auf PV-IgG reagieren als HaCaT-Zellen (Cirillo et al., 2006), oder primäre Keratinozyten (Jolly et al., 2010; Yamamoto et al., 2007; Jennings et al., 2011). Auch wurden manche dieser Zellen vor Versuchsbeginn Kälte von 4 °C ausgesetzt (Jennings et al., 2011) oder lange Zeit in Kulturmedien

4 Diskussion

mit unphysiologisch niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen gehalten (Jolly et al., 2010; Yamamoto et al., 2007), in denen sich keine intakten Desmosomen ausbilden können (Garrod, 2010). Zudem hatten diese Zellkulturen zum Versuchszeitpunkt oft lediglich eine partielle Konfluenz erreicht (Yamamoto et al., 2007; Jolly et al., 2010), was sich deutlich vom natürlichen Zustand in der Epidermis der Patienten unterscheidet, wo jeder Keratinozyt von Nachbarzellen umgeben ist, zu denen er Kontakte ausbildet.

Es wäre daher möglich, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendete, langfristig unter physiologischer Temperatur und Ca^{2+} -Konzentration gehaltene und zu geschlossenen Zellrasen mit reifen Desmosomen gewachsene, voll differenzierungsfähige humane Keratinozytenzelllinie HaCaT (Boukamp et al., 1988), eher den natürlichen Bedingungen in der Patientenhaut nahekommt und somit die an HaCaT-Zellen gewonnenen Ergebnisse verlässlicher sein könnten als abweichende Resultate, die unter weniger physiologischen Voraussetzungen an anderen Zelllinien erzielt wurden. Einschränkend muss hierzu jedoch gesagt werden, dass auch HaCaT-Zellen Nachteile aufweisen. So ist beispielsweise unklar, welchen Einfluss die bei der Immortalisierung aufgetretene Mutation des Tumorsuppressors p53 (Lehman et al., 1993) auf Versuchsergebnisse hat. Da jedes einzelne Modell, seien es verschiedene Zelllinien, Organkulturen menschlicher Haut oder Mausmodelle, immer nur eine Annäherung an die tatsächlichen Bedingungen der humanen Epidermis sein kann und unweigerlich spezifische Limitationen aufweist, ist es sicherlich sinnvoll, Resultate, die an einem Modell gewonnen wurden, an anderen zu verifizieren (van der Wier et al., 2010). So könnten beispielsweise in vivo-Studien an Mäusen dazu dienen, die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu prüfen.

Unabhängig davon kann jedoch schon allein durch die Korrelation der hier durchgeführten Zeitreihen gesagt werden, dass die Dsg3-Depletion für die frühen Stadien der Pemphigus-Pathogenese und insbesondere für den Beginn des Haftungsverlusts der Keratinozyten nicht erforderlich zu sein scheint. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit anderen Studien, die bei HaCaT-Zellen unter ähnlichen Bedingungen ebenfalls keine frühe Dsg3-Depletion nachwiesen (Gliem et al., 2010; Spindler et al., 2011). Es ist denkbar, dass die Depletion zwar nicht den Beginn des Adhäsionsverlusts einleitet, jedoch durch ihr späteres Einsetzen für die Aufrechterhaltung der pathologischen Prozesse verantwortlich ist.

4.2 Die Depletion von extradesmosomalem Dsg3 hängt vom Differenzierungsgrad der Keratinozyten ab

Durch vergleichende Versuche an unterschiedlich weit differenzierten HaCaT-Zellen zeigte sich, dass der Differenzierungsgrad der Keratinozyten die Depletion von extradesmosomalem Dsg3 beeinflusst. Die Depletion in geringer differenzierten HaCaT-Zellen erfolgte bereits nach

zwei Std. und damit deutlich eher als in den weiter entwickelten Zellkulturen. Die Menge an zytoskelettgebundenem Dsg3 hingegen blieb auch in den jüngeren HaCaT-Zellen über den gesamten Zeitraum hinweg konstant.

Interessanterweise war im Dissoziationsversuch das Ausmaß des zellulären Adhäsionsverlustes nach zwei Std. PV-IgG sowohl unabhängig von der Differenzierung der Zellen als auch von der Depletion des extradesmosomalen Dsg3. Daraus lässt sich folgern, dass diese Desmogleinfraktion nach zwei Std. nicht wesentlich zur Adhäsion beiträgt, entweder weil sie ihre Bindungsfähigkeit bereits zuvor rasch eingebüßt hat oder weil sie ohnehin vorrangig eine Funktion als Membranrezeptor ausübt, der nach Antikörperkontakt intrazelluläre Signalwege beeinflusst (Müller et al., 2008; Waschke und Spindler, 2014).

Vor diesem Hintergrund kann vermutet werden, dass sich die Depletion des extradesmosomalen Dsg3 und damit indirekt der Differenzierungsgrad der Keratinozyten auf die Rezeptorfunktion der Desmogleine und auf die assoziierten Signalkaskaden auswirken. Für die Aktivierung der PKC wurde bereits ein solcher Zusammenhang eines Signalweges mit der Zelldifferenzierung gezeigt (Spindler et al., 2011). Weiterführende Studien zu diesem Aspekt könnten beispielsweise Erkenntnisse liefern, die die suprabasale Lokalisation der Akantholyse in der Epidermis der PV-Patienten in Abhängigkeit vom dortigen Differenzierungsfortschritt der Keratinozyten und dadurch bedingten Besonderheiten in der Signaltransduktion erklären (Spindler et al., 2011).

4.3 Der p38MAPK-Signalweg spielt eine wichtigere Rolle in der Pemphigus-Pathogenese als EGFR und Caspasen

Das Enzym p38MAPK ist im Rahmen der Pemphigus-Pathogenese bereits vielfach untersucht worden, jedoch sind insbesondere die zeitlichen Zusammenhänge nur bedingt erforscht (Lee et al., 2009; Chernyavsky et al., 2007; Mao et al., 2011).

Es wurde daher zunächst eine Zeitreihe angefertigt, die einen Anstieg der aktiven phosphorylierten Form der p38MAPK von 30 Min. bis zwei Std. nach der Applikation von PV-IgG nachwies. Zu späteren Zeitpunkten war keine signifikante Aktivierung mehr sichtbar. Dies erlaubt die Einordnung des p38MAPK-Signalwegs als frühe PV-IgG-vermittelte Veränderung, die parallel zum Beginn der Zelldissoziation und zum Verlust der Dsg3-Adhäsion stattfindet. Dass diese zeitliche Korrelation nicht zufällig sondern kausal bedingt ist, wurde dadurch nachgewiesen, dass eine pharmakologische Hemmung der p38MAPK sowohl die PV-IgG-bedingte Zelldissoziation als auch den Dsg3-vermittelten Adhäsionsverlust erheblich reduzierte. Die Werte erreichten jedoch nicht das Kontrollniveau, was andeutet, dass p38MAPK möglicherweise nicht allein für die beobachteten Effekte verantwortlich sein könnte. Dies stimmt mit der Literatur überein, die

4 Diskussion

multiple Signalkaskaden an der Pemphigus-Pathogenese beteiligt sieht (Sanchez-Carpintero et al., 2004; Luyet et al., 2015; Walter et al., 2017).

Im Folgenden wurden deshalb zwei weitere Signalmechanismen untersucht: die Bedeutung von EGFR und von Caspasen. In beiden Fällen war ein Hemmstoff des jeweiligen Signalweges in der Lage, den durch die Autoantikörper vermittelten Rückgang der Dsg3-Haftung im Laserpinzettenversuch abzuschwächen. Im Gegensatz dazu trat weder bei Hemmung von EGFR noch von Caspasen eine Minderung der PV-IgG-bedingten Zelldissoziation ein.

Diese Beobachtung verdeutlicht, dass die durch Hemmung der beiden Signalwege erreichte Verstärkung der Dsg3-Bindung nicht genügte, um sich zum gleichen Zeitpunkt protektiv auf die zelluläre Adhäsion der Keratinozyten auszuwirken. Möglicherweise existiert in Abhängigkeit von der Aktivierung bestimmter Signalkaskaden eine Art Schwellenwert für die Dsg3-Adhäsion, dessen Überschreitung notwendig ist, um die Stabilität der Zellhaftung zu gewährleisten. Es wäre sicher lohnend, diese Hypothese im Rahmen weiterführender Studien zu prüfen, insbesondere da für den Zusammenhang zwischen Zellkohäsion und prozentualer Dsg3-Depletion bereits ein Schwellenwert nachgewiesen wurde (Yamamoto et al., 2007).

Des Weiteren darf nicht außer Acht gelassen werden, dass in Desmosomen neben Dsg3 auch andere Cadherine vertreten sind (Hartlieb et al., 2013; Walter et al., 2017; van der Wier et al., 2010). Die Literatur gibt Hinweise darauf, dass die einzelnen Desmogleine und Desmocolline auf verschiedene Weise zur Gesamthaftung beitragen (Hartlieb et al., 2013) und mit unterschiedlichen Signalwegen interagieren (Walter et al., 2017), was unter den vorliegenden Untersuchungsbedingungen ebenfalls einen Einfluss auf die Zelladhäsion gehabt haben könnte.

Daran anknüpfend untersuchte die vorliegende Arbeit, ob die Inhibition der drei Signalwege einen Zusammenhang mit der Differenzierung von Keratinozyten aufweist. Hierzu wurden wiederum jüngere, geringer differenzierte HaCaT-Zellen verwendet, die nach zwei Std. Inkubation mit PV-IgG eine partielle Depletion der extradesmosomalen Dsg3-Fraktion aufgewiesen hatten. Ebenso wie in den weiter differenzierten Zellen konnte auch hier weder eine Hemmung von EGFR noch von Caspasen die Zelldissoziation reduzieren, im Gegensatz zur Inhibition der p38MAPK, die erneut zu einer signifikanten Verbesserung der Zellkohäsion führte.

Zusammengefasst bestätigten die Ergebnisse, dass p38MAPK eine entscheidende Rolle beim Pemphigus spielt, wohingegen EGFR und Caspasen nur eine untergeordnetere Funktion zu haben scheinen. Dies geht konform mit Studien, die zwar eine Beteiligung von Caspasen bei der Pemphigus-Pathogenese sehen, den programmierten Zelltod aber nicht als entscheidenden Mechanismus einordnen (Luyet et al., 2015; Schmidt und Waschke, 2009; Bektas et al., 2010), bzw. die den EGFR-Signalweg ebenso als weniger relevant einschätzen, weil er unter gewissen Umständen für die PV-IgG-vermittelten Effekte verzichtbar scheint (Heupel et al., 2009a).

Der Vergleich von gering und stark differenzierten Zellen zeigte Unterschiede beim Effekt der p38MAPK-Inhibition auf. In den älteren Zellen ohne stattgehabte Dsg3-Depletion war der

4 Diskussion

protektive Effekt, den die Inhibition von p38MAPK auf die Antikörper-vermittelte Zelldissoziation ausübte, stärker ausgeprägt als in den jüngeren Keratinozyten, in denen nach zwei Std. bereits eine partielle Depletion von extradesmosomalem Dsg3 stattgefunden hatte. Dies allein belegt zwar keinen kausalen Zusammenhang, ließe sich jedoch gut vereinbaren mit der Theorie, die den frei an der Zellmembran liegenden Dsg3 eine Hauptfunktion als Rezeptoren zuschreibt (Müller et al., 2008; Waschke und Spindler, 2014). Eine geringere Anzahl von Rezeptoren bei begonnener Dsg3-Depletion würde demnach auch einen geringeren Effekt auf den assoziierten Signalweg nach sich ziehen, passend zu den hier vorliegenden Ergebnissen. Um diesen Punkt zu verifizieren, wären Studien nötig, die eine mögliche unterschiedlich starke Aktivierung des p38MAPK-Signalweges in verschiedenen weit differenzierten Keratinozyten untersuchen.

4.4 p38MAPK wirkt über eine Beeinflussung des Zytoskeletts

Es wurde vorgeschlagen, dass extradesmosomales Dsg3 mit Aktinfilamenten verbunden ist (Tsang et al., 2012a), welche wiederum durch p38MAPK reguliert werden (Berkowitz et al., 2005). Auch die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Zeitabläufe sind damit gut vereinbar, da eine Aktivierung der p38MAPK von 30 Min. bis zwei Std. nach PV-IgG nachgewiesen wurde und sich eine deutliche Reorganisation des Aktins nach zwei Std. ereignete. Dieses zeitliche Aufeinanderfolgen der beiden Veränderungen würde mit den Ergebnissen von Berkowitz et al. übereinstimmen, die durch Inhibition der p38MAPK die PV-IgG-vermittelte Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts verhinderten (Berkowitz et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Zusammenspiel allerdings weiter untersucht und gezeigt, dass eine direkte pharmakologische Modulation des Aktins zur Zelldissoziation führte, die sich mittels Inhibition der p38MAPK reduzieren ließ. Die vorliegende Arbeit erweitert somit den bisherigen Forschungsstand über die Interaktion von p38MAPK mit dem Aktin-Zytoskelett und belegt, dass der p38MAPK-Signalweg zumindest teilweise von der Beeinflussung des Aktin-Zytoskeletts unabhängig zur PV-IgG-vermittelten Zelldissoziation führt.

Dies ergänzt Erkenntnisse aus der Literatur, die bereits einen Zusammenhang zwischen der p38MAPK und einem anderen Anteil des Zytoskeletts, den Keratinfilamenten, hergestellt hatten (Vielmuth et al., 2018c). So wurde gezeigt, dass die Keratinretraktion von p38MAPK abhängig ist (Vielmuth et al., 2018b) und dass sie mit der PV-IgG-vermittelten Zelldissoziation korreliert (Schlögl et al., 2018).

4.5 Aktin beeinflusst die Verteilung und Adhäsionsstärke von Dsg3

In der indirekten Immunfluoreszenzdarstellung führte die Störung der Aktin-Dynamik durch verschiedene pharmakologische Modulatoren zur Desorganisation von Dsg3. Die Verände-

4 Diskussion

rungen ähnelten den Auswirkungen von PV-IgG, die neben der bereits zuvor in der Zeitreihe beobachteten Umverteilung von Dsg3 auch eine Aktin-Reorganisation auslösten.

Eine pharmakologische Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts war dagegen in der Lage, sowohl die PV-IgG-vermittelte Dsg3-Umverteilung als auch den in der Laserpinzette festgestellten PV-IgG-bedingten Adhäsionsverlust von Dsg3 deutlich abzumildern, was sich an einem interessanten Vorbefund anschließt, in dem der selbe Aktin-Stabilisator die durch PV-IgG verursachte Zelldissoziation reduziert hatte (Gliem et al., 2010). Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse nach, dass für die korrekte Verteilung und Adhäsion von Dsg3 ein intaktes Aktin-Zytoskelett notwendig ist und dass die Wirkung der Autoantikörper zumindest in Teilen über eine Störung der Mikrofilamente abläuft.

Dieser Sachverhalt passt auch dazu, dass die Dsg3-Reorganisation nach Applikation der Aktin-Modulatoren schneller vonstatten ging als nach der Zugabe von PV-IgG. Die Modulatoren beeinflussten Aktin direkt und konnten daher wohl auch rascher auf Dsg3 einwirken, wohingegen PV-IgG zunächst mehrere Zwischenschritte benötigte um die Anordnung der Aktinfilamente zu verändern (Berkowitz et al., 2005) und dadurch indirekter und langsamer die Dsg3-Umverteilung auszulösen.

Auf den ersten Blick überraschend war, dass neben der Destabilisierung des Aktin-Zytoskeletts auch dessen Stabilisierung zu einer, wenn auch geringer ausgeprägten, Desorganisation von Dsg3 und zu einer moderaten Dissoziation der Keratinozyten führte. Eine mögliche Erklärung für diese Effekte wäre, dass ein sich stets dynamisch veränderndes Aktinnetzwerk für die korrekte Anordnung von Dsg3 und damit auch für die Zelladhäsion notwendig ist und der Eingriff des Stabilisators, der die Aktin-Depolymerisation verhindert (Bubb et al., 1994), diese Dynamik stört. Somit wäre auch nachvollziehbar, dass die Stabilisierung der Aktin-Filamente, die offensichtlich den Effekten von PV-IgG entgegen steht, diese nur partiell und nicht vollständig hemmen konnte.

Auch in anderen Studien wurden Interaktionen zwischen Aktin und Dsg3 beobachtet (Vielmuth et al., 2018c; Tsang et al., 2012a,b; Gliem et al., 2010). Speziell wurde festgestellt, dass extradesmosomale Dsg3-Moleküle an Aktin binden und dass die korrekte kortikale Aktin-Anordnung von Dsg3 abhängt (Tsang et al., 2012a). Weiterhin wurde gezeigt, dass extradesmosomale Dsg3 mit E-Cadherin interagieren und für dessen Einbau in Adhärenskontakte verantwortlich sind (Tsang et al., 2012b), die ihrerseits wiederum am Aktin-Zytoskelett verankert sind.

In Zusammenschau mit den hier gezeigten Ergebnissen ist denkbar, dass speziell extradesmosomales Dsg3 nach Bindung von PV-IgG als Rezeptor fungiert, über die Beeinflussung von intrazellulären Signalwegen wie der p38MAPK unter anderem das Aktin-Zytoskelett destabilisiert und so zur Umverteilung und zum Haftungsverlust der Desmogleine, sowie zur Akantholyse führt. Um diese Hypothese zu prüfen, sollte in weiterführenden Untersuchungen ein besonderes Augenmerk auf die unterschiedlichen Funktionen der beiden Desmogleinfraktionen gelegt werden.

4.6 Nicht-Desmoglein-Autoantikörper spielen keine wesentliche Rolle bei dem durch Pemphigus-Autoantikörper vermittelten Haftungsverlust

In den vergangenen Jahren kam zunehmend die These auf, dass neben den bekannten Dsg3- und Dsg1-Autoantikörpern noch weitere, gegen eine Vielzahl anderer Antigene gerichtete Immunglobuline zur Pemphigus-Pathogenese beitragen (Marchenko et al., 2010; Nguyen et al., 2000a; Amagai et al., 2006; Chernyavsky et al., 2015; Kalantari-Dehaghi et al., 2013; Amber et al., 2018; Grando et al., 2001; Zenzo et al., 2017). Diese Anschauung ist jedoch umstritten und die vorliegende Arbeit liefert weitere Hinweise, die gegen einen relevanten Einfluss der nicht-Desmoglein-Antikörper sprechen.

PV-IgG wurden dazu hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf kultivierte Keratinozyten verglichen mit einem monoklonalen Antikörper (AK23), der an die N-terminale adhäsive Domäne von Dsg3 bindet (Tsunoda et al., 2003), und einem zyklischen Peptid (SP), das mit den homologen extrazellulären Domänen von Dsg3 und Dsg1 interagieren soll (Heupel et al., 2009b).

Da Dsg1 in den verwendeten 5 Tage alten Zellkulturen noch nicht exprimiert wird, sondern erst in noch weiter differenzierten, 8 Tage alten HaCaT-Zellen nachweisbar ist (Spindler et al., 2011; Hartlieb et al., 2013), war sichergestellt, dass die beobachteten Effekte überwiegend nicht durch eine Bindung von SP an Dsg1 oder von anti-Dsg1-Antikörpern aus der verwendeten PV-IgG-Fraktion beeinflusst wurden.

Die Zeitreihen zeigten nach Applikation von AK23 oder SP sowohl eine annähernd identische Zunahme der Zelldissoziation, als auch eine nahezu gleichförmige Abnahme der Dsg3-vermittelten Adhäsion, wie unter PV-IgG. Des Weiteren führten AK23 und SP ebenso wie PV-IgG zu einer Aktivierung der p38MAPK nach 30 Min. und AK23 löste genau wie PV-IgG eine Depletion des extradesmosomalen Dsg3 nach 24 Std. aus, bei unveränderter Menge an zytoskelettgebundenem Dsg3.

Zusammengefasst waren sowohl AK23 als auch SP jeweils für sich alleine in der Lage, ähnlich wie PV-IgG mehrere wesentliche Aspekte der Pemphigus-Pathogenese hervorzurufen. Da AK23 und SP höchstwahrscheinlich nur an Desmogleine binden, lässt sich aus dem direkten Vergleich der drei Agenzien folgern, dass nicht-Desmoglein-Antikörper aus der verwendeten PV-IgG-Fraktion zumindest im hier verwendeten Zellkulturmodell keinen wesentlichen zusätzlichen Beitrag zu den pathogenen Effekten geleistet haben konnten.

Die Polyklonalität der Dsg3-Immunglobuline aus PV-IgG konnte bei den Versuchen aus den gleichen Gründen keine signifikante Rolle gespielt haben. Abweichende externe Studienergebnisse, in denen sich in vitro polyklonale Dsg3-Antikörper und PV-IgG effektiver als der monoklonale AK23 gezeigt hatten (Yamamoto et al., 2007) oder AK23 andere Auswirkungen hatte als PV-IgG (Saito et al., 2012), sind nur bedingt mit den vorliegenden Resultaten vergleichbar, da dort,

ähnlich wie bereits in Kapitel 4.1 erläutert, andere Zellen mit zum Teil unreiferen Desmosomen und zudem andere Antikörperkonzentrationen verwendet wurden als in der vorliegenden Arbeit.

Dem gegenüber steht eine Vielzahl an Studien, die sich mit den hier erhobenen Daten decken und eine alleinige pathologische Wirkung von anti-Dsg3-IgG ohne Beteiligung von nicht-Desmoglein-Antikörpern aufzeigen (Hofrichter et al., 2018; Tsunoda et al., 2003, 2011; Mao et al., 2009; Heupel et al., 2008; Zenzo et al., 2012). Der in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal auf diese Weise durchgeführte Vergleich eines monoklonalen Antikörpers und eines spezifischen Peptids mit PV-IgG unterstützt demnach die vielfach vertretene Ansicht (Stanley et al., 2001; Tsunoda et al., 2003; Spindler et al., 2018; Hofrichter et al., 2018), nach der anti-Desmoglein-Autoantikörper die entscheidenden Auslöser der Hautblasen bei der überwiegenden Anzahl der Pemphigus-Patienten darstellen (Zenzo et al., 2017). Selbst wenn nicht ausgeschlossen werden kann, dass bei einem geringen Anteil der Erkrankten noch zusätzlich vorhandene Faktoren, wie beispielsweise genetische Polymorphismen, epigenetische Veränderungen, Umweltfaktoren (Zenzo et al., 2017) oder weitere Autoantikörper (Grando et al., 2001; Pan et al., 2011), die Auswirkungen der anti-Dsg1- und anti-Dsg3-IgG verstärken, so spielen diese Einflüsse wohl eher eine untergeordnete Rolle (Zenzo et al., 2017).

4.7 Direkte Inhibition der Dsg3-Adhäsion und intrazelluläre Signaltransduktion wirken zusammen

Die Bindung von Autoantikörpern an Dsg3 führt sowohl zur direkten Inhibition der Dsg3-Adhäsion (Vielmuth et al., 2015b; Heupel et al., 2008; Zenzo et al., 2016; Vielmuth et al., 2018b) als auch zur Modulation intrazellulärer Signalkaskaden (Berkowitz et al., 2005; Vielmuth et al., 2015b; Cirillo et al., 2014; Spindler et al., 2018; Sayar et al., 2014; Zenzo et al., 2016), jedoch ist die grundlegende Frage nach dem Stellenwert der beiden Mechanismen noch nicht geklärt.

Das zyklische Peptid SP wurde entwickelt, um an die Adhäsionsstelle von Desmogleinen zu binden und dort den Kontakt mit anderen desmosomalen Cadherinen zu inhibieren. TP besteht aus zwei miteinander verbundenen SP und kann durch die gleichzeitige Adhäsion an zwei Desmogleine deren Zusammenhalt gegenüber äußeren Einflüssen stabilisieren und die direkte Inhibition verhindern. (Heupel et al., 2009b) Da die beiden Peptide die Bindung der Autoantikörper an Dsg3 nicht stören (Heupel et al., 2009b), stellen sie ein ideales Werkzeug dar, um die direkte Inhibition und deren Zusammenhang mit anderen Antikörper-vermittelten Mechanismen genauer zu untersuchen.

Im Dissoziationsversuch reduzierte TP den durch Immunglobuline ausgelösten Adhäsionsverlust der HaCaT-Zellen signifikant. Dieses Ergebnis zeigt die Möglichkeit auf, die Zellkohäsion zu verbessern, indem man die Dsg-Adhäsion mittels TP stabilisiert, was anschließend an die-

4 Diskussion

se Arbeit in weiterführenden in vivo-Versuchen aufgegriffen wurde (Spindler et al., 2013). Die Fragmentzahlen erreichten unter Zusatz von TP jedoch wie erwartet nicht das Kontrollniveau, wodurch der allgemeine Konsens bekräftigt wurde, nach dem weitere Mechanismen am Adhäsionsverlust beteiligt sein müssen, allen voran intrazelluläre Signalkaskaden, wie beispielsweise der p38MAPK-Signalweg (Rubenstein und Diaz, 2006; Vielmuth et al., 2015b; Spindler et al., 2018; Berkowitz et al., 2006).

Tatsächlich wurde p38MAPK sowohl von SP als auch von dem monoklonalen Antikörper AK23, der ebenfalls eine direkte Behinderung der Dsg3-Interaktion verursacht (Tsunoda et al., 2003; Heupel et al., 2008), aktiviert. Im Gegensatz dazu reduzierte TP die Menge der von PV-IgG oder AK23 aktivierten p38MAPK im Western-Blot. Da TP lediglich die direkte Inhibition der Desmoglein-Haftung verhindert, ohne die Antikörperbindung an Dsg3 zu beeinträchtigen (Heupel et al., 2009b), kann aus diesem Ergebnis geschlossen werden, dass die direkte Inhibition dem p38MAPK-Signalweg voraus geht und möglicherweise an dessen Induktion beteiligt ist (Heupel et al., 2009b; Tsunoda et al., 2003; Spindler et al., 2013).

Dem widerspricht auch nicht, dass die Aktivierung des Signalproteins p38MAPK bereits nach 30 Min. erfolgte, da die Zelldissoziation und der Verlust der Dsg3-Bindung nach einer ebenso kurzen Inkubationszeit nachweisbar waren, wie sich übereinstimmend für PV-IgG, AK23 und SP feststellen ließ. Hier wäre jedoch sicherlich eine eingehendere Abklärung der sehr frühen zeitlichen Abläufe innerhalb der ersten 30 Min. in weiteren Studien sinnvoll, insbesondere auch unter Einbezug weiterer Signalkaskaden.

4.8 Ausblick

Die Pathomechanismen des Pemphigus vulgaris sind extrem komplex und daher erst unzureichend aufgeklärt. Ein wichtiger Aspekt, der bislang noch zu wenig Aufmerksamkeit erfahren hat, ist die jeweilige Bedeutung von desmosomalen und extradesmosomalen Desmogleinen. Nach aktuellem Stand gibt es deutliche Hinweise darauf, dass diese beiden Fraktionen unterschiedliche Funktionen erfüllen, beispielsweise indem sie mit anderen Partnern interagieren (Rötzer et al., 2015; Tsang et al., 2012a) oder zu verschiedenen Zeitpunkten depletiert werden, wie in der vorliegenden Arbeit und in der Literatur gezeigt (Jolly et al., 2010; Jennings et al., 2011; Yamamoto et al., 2007). Vor diesem Hintergrund scheinen weitere Studien lohnenswert, die die spezifischen Aufgaben der zwei Dsg3-Fraktionen genauer abgrenzen.

Oberstes Ziel der Pemphigus-Forschung ist nach wie vor die Entwicklung einer spezifischen und nebenwirkungsarmen Therapie, die die Lebensqualität der Patienten verbessert. Wenngleich die Komplexität der Pathogenese dies erschwert, so kann sie auf der anderen Seite auch als Chance gesehen werden, da sich durch die Vielzahl an beteiligten Mechanismen ebenso viele mögliche Angriffspunkte für gezielte Interventionen bieten. Bislang fehlt in dieser Hinsicht jedoch

4 Diskussion

ein entscheidender Durchbruch, was überwiegend darin begründet ist, dass neu entwickelte Maßnahmen entweder nicht stark genug wirken, um die Blasenbildung vollständig zu verhindern (Hariton et al., 2017), oder neben den pathologischen auch weitere, teils lebenswichtige zelluläre Vorgänge beeinflussen und dadurch zu toxischen Nebenwirkungen führen können (Berkowitz et al., 2006; Zhang et al., 2007). Ein Beispiel dafür sind EGFR-Inhibitoren, die zwar heute bereits für andere Indikationen klinisch angewendet werden (Lorch et al., 2004), jedoch bei Pemphigus-Patienten voraussichtlich nur limitiert einsetzbar sein und eine genaue Dosierung erfordern werden, da eine partielle Hemmung des EGFR die Akantholyse im PV-Mausmodell zwar reduzierte, eine höhere Dosis des Inhibitors aber zu einer stark zunehmenden Blasenbildung führte (Sayar et al., 2014).

Auch eine Hemmung der p38MAPK, die anhand der hier vorgelegten Daten eine vielversprechende Therapieoption darstellen könnte, ist bisher noch nicht klinisch etabliert, da die älteren Inhibitoren sehr unspezifisch wirken (Fabian et al., 2005) und aufgrund toxischer Effekte nur in der Forschung einsetzbar sind (Berkowitz et al., 2006; Zhang et al., 2007). In den vergangenen Jahren wurden zunehmend spezifischere Inhibitoren generiert, die jedoch entweder keine ausreichende therapeutische Effizienz zeigten (Goldstein et al., 2010) oder weiterhin zu viele unerwünschte Nebenwirkungen aufwiesen (Zhang et al., 2007). An der Entwicklung verbesserter p38MAPK-Inhibitoren und an Möglichkeiten zum Eingriff in den Signalweg an anderer Stelle, z.B. durch Hemmung der MAPKAP-Kinase 2, wird weiterhin gearbeitet (Zhang et al., 2007). Dabei sollten allerdings neueste Daten nicht außer Acht gelassen werden, die auf eine Beteiligung der p38MAPK an der Abheilung der Blasen hindeuten, was wiederum selbst den Einsatz sehr spezifischer Inhibitoren einschränken könnte (Waschke, 2018).

Infolge dieser Limitationen scheint es sinnvoll, an mehreren Punkten gleichzeitig anzugreifen, die sich unter anderem im Rahmen dieser Arbeit als relevant für die PV-Pathogenese herausgestellt haben. Dies könnte geschehen, indem man beispielsweise mehrere intrazelluläre Signalwege simultan moderat hemmt (Hariton et al., 2017), zelluläre Rettungswege verstärkt (Spindler et al., 2010) und parallel das Zytoskelett direkt oder indirekt stabilisiert (Waschke et al., 2006), um mit der Gesamtheit der Maßnahmen eine gute krankheitseindämmende Wirkung zu erreichen, ohne gleichzeitig gesunde Zellen oder Organe zu schädigen. Kombiniert mit einer Verhinderung der direkten Inhibition mittels TP, das sogar bei topischer Applikation die Akantholyse in Mäusen verhindern kann (Spindler et al., 2013), erscheint ein solcher Kombinationsansatz die erfolgversprechendste Therapieoption, sodass in weiterführenden Studien verschiedene Zusammenstellungen und Dosierungen *in vitro* und *in vivo* getestet werden sollten.

5 Zusammenfassung

Bei der Autoimmunerkrankung Pemphigus vulgaris führen Antikörper zur charakteristischen suprabasalen Akantholyse und Blasenbildung der Epidermis, indem sie an spezifische Antigene, die Desmogleine Dsg3 und Dsg1, auf der Zelloberfläche der Keratinozyten binden. Die Art und Weise, wie die multiplen zellulären Pathomechanismen zusammenwirken und das potenziell tödliche Krankheitsbild hervorrufen, ist jedoch bislang noch weitgehend unklar. In der vorliegenden Arbeit wurden entscheidende, durch die Autoantikörper hervorgerufene, pathologische intrazelluläre Prozesse genauer untersucht und deren Stellenwert beleuchtet.

Hierfür wurde ein Zellkulturmodell gewählt und sämtliche Versuche an einer einzigen Linie von Keratinozyten durchgeführt, um eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse untereinander zu gewährleisten. Zeitreihen ermöglichten es, die zentralen pathologischen Vorgänge direkt miteinander zu korrelieren und ihre gegenseitigen Wechselwirkungen zu erschließen. Durch Verwendung unterschiedlich weit differenzierter Keratinozyten konnte dabei gezeigt werden, dass der Entwicklungsstand der Zellen den Beginn der Depletion von extradesmosomalem Dsg3 beeinflusste. Insgesamt stellte sich die Rolle des Abbaus von Dsg3 in den Zeitreihen allerdings untergeordnet dar, da er keine unmittelbare Voraussetzung für den frühen Haftungsverlust der Keratinozyten war. Im Gegenteil traten eine deutliche Zelldissoziation und ein Rückgang der Dsg3-Adhäsion, ebenso wie eine Reorganisation von Dsg3 bereits zu einem Zeitpunkt ein, an dem noch keine Verminderung der Dsg3-Menge stattgefunden hatte.

In weiterführenden Experimenten wurde nachgewiesen, dass der Haftungsverlust der Keratinozyten nicht ausschließlich auf einer Störung der Dsg3-Bindung beruhen kann, da die Hemmung zweier Signalwege, des EGFR und der Caspasen, jeweils zu einer deutlichen Verbesserung der Dsg3-Adhäsion führte, die jedoch nicht von einer Stärkung der Zellkohäsion begleitet wurde. Gleichzeitig stellte sich heraus, dass diese beiden Signalkaskaden eine weniger wichtige Rolle in der Pemphigus-Pathogenese spielen als der p38MAPK-Signalweg, dessen zentrale Stellung im Rahmen der vorliegenden Studie weiter herausgearbeitet werden konnte. So fand sich nach Antikörperkontakt eine rasche Aktivierung der p38MAPK, die ursächlich an der Zelldissoziation und dem Adhäsionsverlust von Dsg3 beteiligt war. Außerdem wurde die Wechselwirkung der p38MAPK mit dem Aktin-Zytoskelett weiter beleuchtet. Die pharmakologische Stabilisierung des Aktins hatte einen protektiven Effekt gegenüber den Autoantikörpern von Pemphigus-Patienten, während die Modulation des Aktin-Zytoskeletts zu einem Zellhaftungsverlust führte, der wiederum durch eine p38MAPK-Hemmung abgeschwächt wurde.

5 Zusammenfassung

Mittels weiterer Zeitreihen wurde die Rolle von Autoantikörpern gegen andere Antigene als Desmogleine untersucht. So hatte SP, ein Peptid das die Desmoglein-Interaktion direkt inhibiert, die gleichen Effekte auf die Keratinozyten wie PV-IgG. Auch zwischen den Auswirkungen von PV-IgG und dem monoklonalen anti-Dsg3-Antikörper AK23 fanden sich in der vorliegenden Versuchsserie keine signifikanten Unterschiede. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte der von einigen Arbeitsgruppen postulierte Beitrag verschiedenster nicht-Desmoglein-Autoantikörper (Chernyavsky et al., 2007, 2015; Kalantari-Dehaghi et al., 2013; Grando et al., 2001) zumindest im hier verwendeten Zellkulturmodell als vernachlässigbar für die Pemphigus-Pathogenese eingeordnet werden.

Im Gegensatz zu SP wirkte das Peptid-Dimer TP protektiv auf die Antikörper-vermittelte Zell-dissoziation, was mit einer Hemmung des p38MAPK-Signalweges einher ging und somit dessen Funktion als zentraler Pathomechanismus weiter bestätigte. Zudem deutet dieses Ergebnis an, dass die direkte Inhibition, die durch TP verhindert wird, an der Aktivierung von Signalwegen beteiligt sein könnte und dass TP eine vielversprechende Therapieoption für Pemphigus-Patienten darstellen könnte.

Zusammengefasst bietet die vorliegende Arbeit Erkenntnisse über den Zeitverlauf und das Zusammenwirken einer Anzahl an Pathomechanismen, die beim Pemphigus vulgaris beteiligt sind und erweitert damit den bekannten Wissensstand über diese komplexe Erkrankung.

6 Literaturverzeichnis

- Al-Amoudi, A., D. Castaño-Diez, M. J. Betts, und A. S. Frangakis, 2007. The molecular architecture of cadherins in native epidermal desmosomes. *Nature*, 450:832–837.
- Al-Amoudi, A., D. Castaño-Diez, D. P. Devos, R. B. Russell, G. T. Johnson, und A. S. Frangakis, 2011. The three-dimensional molecular structure of the desmosomal plaque. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(16):6480–6485.
- Amagai, M., 2003. Desmoglein as a target in autoimmunity and infection. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 48:244–252.
- Amagai, M., 2009. The molecular logic of pemphigus and impetigo: the desmoglein story. *Veterinary Dermatology*, 20:308–312.
- Amagai, M., A. R. Ahmed, Y. Kitajima, J.-C. Bystry, Y. Milner, R. Gniadecki, M. Hertl, C. Pincelli, M. Fridkis-Hareli, Y. Aoyama, M. Frusic-Zlotkin, E. Müller, M. David, D. Mimouni, D. Vind-Kezunovic, B. Michel, M. G. Mahoney, und S. Grando, 2006. Are desmoglein autoantibodies essential for the immunopathogenesis of pemphigus vulgaris, or just ‘witnesses of disease’? *Experimental Dermatology*, 15(10):815–831.
- Amagai, M., S. Karpati, V. Klaus-Kovtun, M. C. Udey, und J. R. Stanley, 1994. Extracellular domain of pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) mediates weak homophilic adhesion. *The Journal of Investigative Dermatology*, 103(4):609–615.
- Amagai, M., S. Karpati, R. Prussick, V. Klaus-Kovtun, und J. R. Stanley, 1992. Autoantibodies against the amino-terminal cadherin-like binding domain of pemphigus vulgaris antigen are pathogenic. *The Journal of Clinical Investigation*, 90:919–926.
- Amagai, M., V. Klaus-Kovtun, und J. R. Stanley, 1991. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell*, 67:869–877.
- Amagai, M., N. Matsuyoshi, Z. H. Wang, C. Andl, und J. R. Stanley, 2000. Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1. *Nature Medicine*, 6(11):1275–1277.
- Amagai, M., K. Tsunoda, D. Zillikens, T. Nagai, und T. Nishikawa, 1999. The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 40(2-1):167–170.
- Amagai, M., T. Yamaguchi, Y. Hanakawa, K. Nishifuji, M. Sugai, und J. R. Stanley, 2002. Staphylococcal exfoliative toxin B specifically cleaves desmoglein 1. *The Journal of Investigative Dermatology*, 118(5):845–850.
- Amber, K. T., M. Valdebran, und S. A. Grando, 2018. Non-desmoglein antibodies in patients with pemphigus vulgaris. *Frontiers in Immunology*, 9:Article 1190.

6 Literaturverzeichnis

- Anhalt, G. J., R. S. Labib, J. J. Voorhees, T. F. Beals, und L. A. Diaz, 1982. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. *The New England Journal of Medicine*, 306(20):1189–1196.
- Aoki, V., E. A. Rivitti, und L. A. Diaz, 2015. Update on fogo selvagem, an endemic form of pemphigus foliaceus. *The Journal of Dermatology*, 42:18–26.
- Aoyama, Y. und Y. Kitajima, 1999. Pemphigus vulgaris-IgG causes a rapid depletion of desmoglein 3 (dsg3) from the Triton X-100 soluble pools, leading to the formation of dsg3-depleted desmosomes in a human squamous carcinoma cell line, DJM-1 cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 112(1):67–71.
- Aoyama, Y., M. K. Owada, und Y. Kitajima, 1999. A pathogenic autoantibody, pemphigus vulgaris-IgG, induces phosphorylation of desmoglein 3, and its dissociation from plakoglobin in cultured keratinocytes. *European Journal of Immunology*, 29(7):2233–2240.
- Arnemann, J., K. H. Sullivan, A. I. Magee, I. A. King, und R. S. Buxton, 1993. Stratification-related expression of isoforms of the desmosomal cadherins in human epidermis. *Journal of Cell Science*, 104:741–750.
- Arnold, E., 2014. *Bedeutung von Desmoglein 2 und Desmoglein 3 für die interzelluläre Adhäsion in Keratinozyten*. Dissertation, Graduate School of Life Sciences der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg, Deutschland.
- Arredondo, J., A. I. Chernyavsky, A. Karaouni, und S. A. Grando, 2005. Novel mechanisms of target cell death and survival and of therapeutic action of IVIg in pemphigus. *The American Journal of Pathology*, 167(6):1531–1544.
- Ashkin, A., 1997. Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94:4853–4860.
- Barak, L. S., R. R. Yocum, E. A. Nothnagel, und W. W. Webb, 1980. Fluorescence staining of the actin cytoskeleton in living cells with 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-phalloidin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(2):980–984.
- Bastuji-Garin, S., R. Souissi, L. Blum, H. Turki, R. Nouira, B. Jomaa, A. Zahaf, A. B. Osman, I. Mokhtar, B. Fazaa, J. Revuz, J.-C. Roujeau, und M. R. Kamoun, 1995. Comparative epidemiology of pemphigus in tunisia and france: Unusual incidence of pemphigus foliaceus in young tunisian women. *The Journal of Investigative Dermatology*, 104(2):302–305.
- Bauhammer, J. S., 2005. *Wirkungen des Pancaspase-Inhibitors zVAD-FMK auf die Apoptose von Makrophagen und Lymphozyten*. Med. Dissertation, Abteilung Kinderheilkunde IV mit Poliklinik der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen, Tübingen, Deutschland.
- Baum, S., A. Scope, A. Barzilai, E. Azizi, und H. Trau, 2006. The role of IVIg treatment in severe pemphigus vulgaris. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 20(5):548–552.

6 Literaturverzeichnis

- Baumgartner, W., G. J. Schütz, J. Wiegand, N. Golenhofen, und D. Drenckhahn, 2003. Cadherin function probed by laser tweezer and single molecule fluorescence in vascular endothelial cells. *Journal of Cell Science*, 116:1001–1011.
- Bédane, C., C. Prost, E. Thomine, L. Intrator, P. Joly, F. Caux, M. Blecker, P. Bernard, M. J. Leboutet, F. Tron, P. Lauret, J. M. Bonnetblanc, und L. Dubertret, 1996. Binding of autoantibodies is not restricted to desmosomes in pemphigus vulgaris: Comparison of 14 cases of pemphigus vulgaris and 10 cases of pemphigus foliaceus studied by western immunoblot and immunoelectron microscopy. *Archives of Dermatological Research*, 288(7):343–352.
- Bektas, M., P. Jolly, und D. S. Rubenstein, 2010. Apoptotic pathways in pemphigus. *Dermatology Research and Practice*, 2010:Article ID 456841, 8 pages.
- Bektas, M., P. S. Jolly, P. Berkowitz, M. Amagai, und D. S. Rubenstein, 2013. A pathophysiologic role for epidermal growth factor receptor in pemphigus acantholysis. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(13):9447–9456.
- Beldi, A. E., I. Zarea, M. B. Ahmed, A. B. Osman, M. Mokni, und H. Louzir, 2012. Prevalence of autoantibodies in patients with pemphigus. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*, 78(2):192–193.
- Berkowitz, P., M. Chua, Z. Liu, L. A. Diaz, und D. S. Rubenstein, 2008a. Autoantibodies in the autoimmune disease pemphigus foliaceus induce blistering via p38 mitogen-activated protein kinase-dependent signaling in the skin. *The American Journal of Pathology*, 173(6):1628–1636.
- Berkowitz, P., L. A. Diaz, R. P. Hall, und D. S. Rubenstein, 2008b. Induction of p38MAPK and HSP27 phosphorylation in pemphigus patient skin. *The Journal of Investigative Dermatology*, 128(3):738–740.
- Berkowitz, P., P. Hu, Z. Liu, L. A. Diaz, J. J. Enghild, M. P. Chua, und D. S. Rubenstein, 2005. Desmosome signaling. Inhibition of p38MAPK prevents pemphigus vulgaris IgG-induced cytoskeleton reorganization. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(25):23778–23784.
- Berkowitz, P., P. Hu, S. Warren, Z. Liu, L. A. Diaz, und D. S. Rubenstein, 2006. P38MAPK inhibition prevents disease in pemphigus vulgaris mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(34):12855–12860.
- Beutner, E. H. und R. E. Jordon, 1964. Demonstration of skin antibodies in sera of pemphigus vulgaris patients by indirect immunofluorescent staining. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 117:505–510.
- Biscardi, J. S., M.-C. Maa, D. A. Tice, M. E. Cox, T.-H. Leu, und S. J. Parsons, 1999. c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr 845 and Tyr 1101 is associated with modulation of receptor function. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(12):8335–8343.
- Blaschuk, O. W., R. Sullivan, S. David, und Y. Pouliot, 1990. Identification of a cadherin cell adhesion recognition sequence. *Developmental Biology*, 139(1):227–229.

6 Literaturverzeichnis

- Boggon, T. J., J. Murray, S. Chappuis-Flament, E. Wong, B. M. Gumbiner, und L. Shapiro, 2002. C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science*, 296(5571):1308–1313.
- Bollag, W. B., 2010. A hypothesis concerning a potential involvement of ceramide in apoptosis and acantholysis induced by pemphigus autoantibodies. *Dermatology Research and Practice*, 2010:Article ID 702409, 8 pages.
- Bonné, S., B. Gilbert, M. Hatzfeld, X. Chen, K. J. Green, und F. van Roy, 2003. Defining desmosomal plakophilin-3 interactions. *The Journal of Cell Biology*, 161(2):403–416.
- Boukamp, P., R. T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham, und N. E. Fusenig, 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of Cell Biology*, 106:761–771.
- Bär, J., V. Kumar, W. Roth, N. Schwarz, M. Richter, R. E. Leube, und T. M. Magin, 2014. Skin fragility and impaired desmosomal adhesion in mice lacking all keratins. *The Journal of Investigative Dermatology*, 134(4):1012–1022.
- Brandsen, R., M. Frusic-Zlotkin, H. Lyubimov, F. Yunes, B. Michel, A. Tamir, Y. Milner, und S. Brenner, 1997. Circulating pemphigus IgG in families of patients with pemphigus: Comparison of indirect immunofluorescence, direct immunofluorescence, and immunoblotting. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 36(1):44–52.
- Brennan, D., Y. Hu, W. Medhat, A. Dowling, und M. G. Mahoney, 2010. Superficial dsg2 expression limits epidermal blister formation mediated by pemphigus foliaceus antibodies and exfoliative toxins. *Dermatology Research and Practice*, 2010:Article ID 410278, 10 pages.
- Brenner, S. L. und E. D. Korn, 1979. Substoichiometric concentrations of cytochalasin D inhibit actin polymerization. *The Journal of Biological Chemistry*, 254(20):9982–9985.
- Bubb, M. R., A. M. J. Senderowicz, E. Sausville, K. L. K. Duncan, und E. D. Korn, 1994. Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to f-actin. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(21):14869–14871.
- Burnette, W. N., 1981. “Western blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, 112(2):195–203.
- Buxton, R. S., P. Cowin, W. W. Franke, D. R. Garrod, K. J. Green, I. A. King, P. J. Koch, A. I. Magee, D. A. Rees, J. R. Stanley, und M. S. Steinberg, 1993. Nomenclature of the desmosomal cadherins. *The Journal of Cell Biology*, 121(3):481–483.
- Bystryń, J.-C. und S. A. Grando, 2006. A novel explanation for acantholysis in pemphigus vulgaris: The basal cell shrinkage hypothesis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 54(3):513–516.

- Caldelari, R., A. de Bruin, D. Baumann, M. M. Suter, C. Bierkamp, V. Balmer, und E. Müller, 2001. A central role for the armadillo protein plakoglobin in the autoimmune disease pemphigus vulgaris. *The Journal of Cell Biology*, 153(4):823–834.
- Calkins, C. C., S. V. Setzer, J. M. Jennings, S. Summers, K. Tsunoda, M. Amagai, und A. P. Kowalczyk, 2006. Desmoglein endocytosis and desmosome disassembly are coordinated responses to pemphigus autoantibodies. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(11):7623–7634.
- Carew, B. und G. Wagner, 2014. Cutaneous pemphigus vulgaris with absence of desmoglein 1 autoantibodies. An example of the extended desmoglein compensation theory. *The Australasian Journal of Dermatology*, 55(4):292–295.
- Carson, P. J., A. Hameed, und A. R. Ahrned, 1996. Influence of treatment on the clinical course of pemphigus vulgaris. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 34(4):645–652.
- Carvalho, A. A., D. A. dos Santos Neto, M. A. dos Reis Carvalho, S. J. P. Eleutério, und A. R. E. de Oliveira Xavier, 2019. Neonatal pemphigus in an infant born to a mother with pemphigus vulgaris: a case report. *Revista paulista de pediatria: orgao oficial da Sociedade de Pediatria de Sao Paulo*, 37(1):130–134.
- Chen, X., S. Bonné, M. Hatzfeld, F. van Roy, und K. J. Green, 2002. Protein binding and functional characterization of plakophilin 2. Evidence for its diverse roles in desmosomes and β -catenin signaling. *Journal of the Biological Chemistry*, 277(12):10512–10522.
- Chernyavsky, A., J. Arredondo, Y. Kitajima, M. Sato-Nagai, und S. A. Grando, 2007. Desmoglein versus non-desmoglein signaling in pemphigus acantholysis: characterization of novel signaling pathways downstream of pemphigus vulgaris antigens. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(18):13804–13812.
- Chernyavsky, A., Y. Chen, P. H. Wang, und S. A. Grando, 2015. Pemphigus vulgaris antibodies target the mitochondrial nicotinic acetylcholine receptors that protect keratinocytes from apoptosis. *International Immunopharmacology*, 29(1):76–80.
- Chitaev, N. A., R. E. Leube, R. B. Troyanovsky, L. G. Eshkind, W. W. Franke, und S. M. Troyanovsky, 1996. The binding of plakoglobin to desmosomal cadherins: Patterns of binding sites and topogenic potential. *The Journal of Cell Biology*, 133(2):359–369.
- Chitaev, N. A. und S. M. Troyanovsky, 1997. Direct Ca^{2+} -dependent heterophilic interaction between desmosomal cadherins, desmoglein and desmocollin, contributes to cell-cell adhesion. *The Journal of Biological Chemistry*, 138:193–201.
- Cirillo, N., E. AlShwaimi, M. McCullough, und S. S. Prime, 2014. Pemphigus vulgaris autoimmune globulin induces Src-dependent tyrosine-phosphorylation of plakophilin 3 and its detachment from desmoglein 3. *Autoimmunity*, 47(2):134–140.
- Cirillo, N., F. Femiano, A. Dell'Ermo, P. Arnese, F. Gombos, und A. Lanza, 2007a. A novel method to investigate pemphigus-induced keratinocyte dysmorphisms through living cell immunofluorescence microscopy. *Virchows Archiv: an international journal of pathology*, 450(6):683–690.

- Cirillo, N., F. Femiano, F. Gombos, und A. Lanza, 2006. Serum from pemphigus vulgaris reduces desmoglein 3 half-life and perturbs its de novo assembly to desmosomal sites in cultured keratinocytes. *FEBS Letters*, 580(13):3276–3281.
- Cirillo, N., A. Lanza, und S. S. Prime, 2010. Induction of hyper-adhesion attenuates autoimmune-induced keratinocyte cell-cell detachment and processing of adhesion molecules via mechanisms that involve PKC. *Experimental Cell Research*, 316(4):580–592.
- Cirillo, N., M. Lanza, L. Rossiello, F. Gombos, und A. Lanza, 2007b. Defining the involvement of proteinases in pemphigus vulgaris: Evidence of matrix metalloproteinase-9 overexpression in experimental models of disease. *Journal of Cellular Physiology*, 212(1):36–41.
- Cirillo, N. und S. S. Prime, 2009. Desmosomal interactome in keratinocytes: a systems biology approach leading to an understanding of the pathogenesis of skin disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(21):3517–3533.
- Cuevas-Gonzalez, J. C., M. E. Vega-Memije, F. J. García-Vázquez, und M. A. Aguilar-Urbano, 2016. Detection of apoptosis in pemphigus vulgaris by tunel technique. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 91(3):296–299.
- Davis, B. J., 1964. Disc electrophoresis - II method and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121:404–427.
- de Bruin, A., R. Caldelari, L. Williamson, M. M. Suter, T. Hunziker, M. Wyder, und E. J. Müller, 2007. Plakoglobin-dependent disruption of the desmosomal plaque in pemphigus vulgaris. *Experimental Dermatology*, 16(6):468–475.
- Dehner, C., V. Rötzer, J. Waschke, und V. Spindler, 2014. A desmoplakin point mutation with enhanced keratin association ameliorates pemphigus vulgaris autoantibody-mediated loss of cell cohesion. *The American Journal of Pathology*, 184(9):2528–2536.
- Delva, E., J. M. Jennings, C. C. Calkins, M. D. Kottke, V. Faundez, und A. P. Kowalczyk, 2008. Pemphigus vulgaris IgG-induced desmoglein-3 endocytosis and desmosomal disassembly are mediated by a clathrin-and dynamin-independent mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(26):18303–18313.
- Diaz, L. A., S. A. Sampaio, E. A. Rivitti, C. R. Martins, P. R. Cunha, C. Lombardi, F. A. Almeida, R. M. Castro, M. L. Macca, C. Lavrado, G. H. Filho, P. Borges, A. Chaul, L. Minelli, J. C. Empinotti, H. Friedman, Iphis Campbell, R. S. Labib, und G. J. Anhalt, 1989. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem): II. current and historic epidemiologic studies. *The Journal of Investigative Dermatology*, 92:4–12.
- Diercks, G. F. H., H. H. Pas, und M. F. Jonkman, 2009. The ultrastructure of acantholysis in pemphigus vulgaris. *The British Journal of Dermatology*, 160(2):460–461.
- Ding, X., V. Aoki, J. M. M. Jr, A. Lopez-Swidorski, L. A. Diaz, und J. A. Fairley, 1997. Mucosal and mucocutaneous (generalized) pemphigus vulgaris show distinct autoantibody profiles. *The Journal of Investigative Dermatology*, 109(4):592–596.

- Ding, X., L. A. Diaz, J. A. Fairley, G. J. Giudice, und Z. Liu, 1999. The anti-desmoglein 1 autoantibodies in pemphigus vulgaris sera are pathogenic. *The Journal of Investigative Dermatology*, 112(5):739–743.
- Dmochowski, M., T. Hashimoto, D. R. Garrod, und T. Nishikawa, 1993. Desmocollins I and II are recognized by certain sera from patients with various types of pemphigus, particularly brazilian pemphigus foliaceus. *The Journal of Investigative Dermatology*, 100(4):380–384.
- Dobrev, H., L. Popova, und D. Vlashev, 1996. Proteinase inhibitors and pemphigus vulgaris. An in vitro and in vivo study. *Archives of Dermatological Research*, 288(11):648–655.
- Doubleday, C. W., 1987. Who is nikolsky and what does his sign mean? *Journal of the American Academy of Dermatology*, 16(5-1):1054–1055.
- Drenckhahn, D., 2004. *Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Band 2*. Elsevier, Urban & Fischer Verlag, München, 16. Auflage.
- Drenckhahn, D., 2008. *Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Band 1*. Elsevier, Urban & Fischer Verlag, München, 17. Auflage.
- Dure, L. S. und M. J. Cormier, 1964. Studies on the bioluminescence of balanoglossus biminiensis extracts III. A kinetic comparison of luminescent and nonluminescent peroxidation reactions and a proposed mechanism for peroxidase action. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 239:2351–2359.
- Dusek, R. L., L. M. Godsel, und K. J. Green, 2007. Discriminating roles of desmosomal cadherins: Beyond desmosomal adhesion. *Journal of Dermatological Science*, 45:7–21.
- Egu, D., A. Sigmund, E. Schmidt, V. Spindler, E. Walter, und J. Waschke, 2019. A new ex vivo human oral mucosa model reveals that p38MAPK inhibition is not effective in preventing autoantibody-induced mucosal blistering in pemphigus. *British Journal of Dermatology*, doi: 10.1111/bjd.18237.
- Egu, D. T., E. Walter, V. Spindler, und J. Waschke, 2017. Inhibition of p38MAPK signalling prevents epidermal blistering and alterations of desmosome structure induced by pemphigus autoantibodies in human epidermis. *British Journal of Dermatology*, 177(6):1612–1618.
- Eming, R., 2015. Pemphigus: Modellerkrankung für zielgerichtete Therapien. *Der Hautarzt*, 66(8):574–582.
- Eming, R., M. Sticherling, S. C. Hofmann, N. Hunzelmann, J. S. Kern, H. Kramer, C. Pfeiffer, V. Schuster, D. Zillikens, M. Goebeler, M. Hertl, A. Nast, H.-D. Orzechowski, M. Sárdy, E. Schmidt, C. Sitaru, B. Sporbeck, und M. Worm, 2015. S2k-Leitlinie zur Therapie des Pemphigus vulgaris/foliaceus und des bullösen Pemphigoid. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 13(8):833–845.
- Esaki, C., M. Seishima, T. Yamada, K. Osada, und Y. Kitajima, 1995. Pharmacologic evidence for involvement of phospholipase C in pemphigus IgG-induced inositol 1,4,5-trisphosphate generation, intracellular calcium increase, and plasminogen activator secretion in DJM-1 cells, a squamous cell carcinoma line. *The Journal of Investigative Dermatology*, 105(3):329–333.

6 Literaturverzeichnis

- Everitt, E. und C. Wohlfart, 1987. Spectrophotometric quantitation of anchorage-dependent cell numbers using extraction of naphthol blue-black-stained cellular protein. *Analytical Biochemistry*, 162(1):122–129.
- Eyre, R. W. und J. R. Stanley, 1988. Identification of pemphigus vulgaris antigen extracted from normal human epidermis and comparison with pemphigus foliaceus antigen. *The Journal of Clinical Investigation*, 81:807–812.
- Fabian, M. A., W. H. BlgGs, D. K. Treiber, C. E. Atteridge, M. D. Azimioara, M. G. Benedetti, T. A. Carter, P. Ciceri, P. T. Edeen, M. Floyd, J. M. Ford, M. Galvin, J. L. Gerlach, R. M. Grotzfeld, S. Herrgard, D. E. Insko, M. A. Insko, A. G. Lai, J.-M. Lelias, S. A. Mehta, Z. V. Milanov, A. M. Velasco, L. M. Wodicka, H. K. Patel, P. P. Zarrinkar, und D. J. Lockhart, 2005. A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nature Biotechnology*, 23(3):329–336.
- Farb, R. M., R. Dykes, und G. S. Lazarus, 1978. Anti-epidermal-cell-surface pemphigus antibody detaches viable epidermal cells from culture plates by activation of proteinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(1):459–463.
- Farquhar, M. G. und G. E. Palade, 1963. Junctional complexes in various epithelia. *The Journal of Cell Biology*, 17:375–412.
- Forsgren, A. und J. Sjöquist, 1966. "Protein A" from *S. aureus* I. Pseudo-immune reaction with human γ -globulin. *The Journal of Immunology*, 97(6):822–827.
- Frusic-Zlotkin, M., D. Raichenberg, X. Wang, M. David, B. Michel, und Y. Milner, 2006. Apoptotic mechanism in pemphigus autoimmunoglobulins-induced acantholysis - possible involvement of the EGF receptor. *Autoimmunity*, 39(7):563–575.
- Fuchs, E. und S. Raghavan, 2002. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nature Reviews*, 3:199–209.
- Fuchs, M., M. Foresti, M. Y. Radeva, D. Kugelmann, R. Keil, M. Hatzfeld, V. Spindler, J. Waschke, und F. Vielmuth, 2019. Plakophilin 1 but not plakophilin 3 regulates desmoglein clustering. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(17):3465–3476.
- Ganeshan, R., J. Chen, und P. J. Koch, 2010. Mouse models for blistering skin disorders. *Dermatology Research and Practice*, 2010:Article ID 584353, 7 pages.
- Garcia-Calvo, M., E. P. Peterson, B. Leiting, R. Ruel, D. W. Nicholsoni, und N. A. Thornberry, 1998. Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(49):32608–32613.
- Garrod, D., 2010. Desmosomes in vivo. *Dermatology Research and Practice*, 2010:Article ID 212439, 17 pages.
- Garrod, D., C. Fisher, A. Smith, und Z. Nie, 2008. Pervanadate stabilizes desmosomes. *Cell Adhesion and Migration*, 2(3):161–166.

6 Literaturverzeichnis

- Garrod, D. und T. E. Kimura, 2008. Hyper-adhesion: a new concept in cell-cell adhesion. *Biochemical Society Transactions*, 36(2):195–201.
- Gaudry, C. A., H. L. Palka, R. L. Dusek, A. C. Huen, M. J. Khandekar, L. G. Hudson, und K. J. Green, 2001. Tyrosine-phosphorylated plakoglobin is associated with desmogleins but not desmoplakin after epidermal growth factor receptor activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(27):24871–24880.
- Getsios, S., J. Waschke, L. Borradori, M. Hertl, und E. J. Müller, 2010. From cell signaling to novel therapeutic concepts: International pemphigus meeting on advances in pemphigus research and therapy. *The Journal of Investigative Dermatology*, 130(7):1764–1768.
- Gliem, M., 2011. *Die Rolle des Zytoskeletts in der Pathogenese des Pemphigus vulgaris*. Med. Dissertation, Lehrstuhl Anatomie III am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg, Deutschland.
- Gliem, M., W.-M. Heupel, V. Spindler, G. S. Harms, und J. Waschke, 2010. Actin reorganization contributes to loss of cell adhesion in pemphigus vulgaris. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 299(3):C606–C613.
- Gloushankova, N. A., T. Wakatsuki, R. B. Troyanovsky, E. Elson, und S. M. Troyanovsky, 2003. Continual assembly of desmosomes within stable intercellular contacts of epithelial A-431 cells. *Cell and Tissue Research*, 314(3):399–410.
- Godsel, L. M., A. D. Dubash, A. E. Bass-Zubek, E. V. Amargo, J. L. Klessner, R. P. Hobbs, X. Chen, und K. J. Green, 2010. Plakophilin 2 couples actomyosin remodeling to desmosomal plaque assembly via RhoA. *Molecular Biology of the Cell*, 21:2844–2859.
- Godsel, L. M., S. N. Hsieh, E. V. Amargo, A. E. Bass, L. T. Pascoe-McGillicuddy, A. C. Huen, M. E. Thorne, C. A. Gaudry, J. K. Park, K. Myung, R. D. Goldman, T.-L. Chew, und K. J. Green, 2005. Desmoplakin assembly dynamics in four dimensions: multiple phases differentially regulated by intermediate filaments and actin. *The Journal of Cell Biology*, 171(6):1045–1059.
- Goldstein, D. M., A. Kuglstatter, Y. Lou, und M. J. Soth, 2010. Selective p38 α inhibitors clinically evaluated for the treatment of chronic inflammatory disorders. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(6):2345–2353.
- Grando, S. A., J.-C. Bystryń, A. I. Chernyavsky, M. Frusic-Zlotkin, R. Gniadecki, R. Lotti, Y. Milner, M. R. Pittelkow, und C. Pincelli, 2009. Apoptolysis: a novel mechanism of skin blistering in pemphigus vulgaris linking the apoptotic pathways to basal cell shrinkage and suprabasal acantholysis. *Experimental Dermatology*, 18(9):764–770.
- Grando, S. A., M. R. Pittelkow, L. D. Shultz, M. Dmochowski, und V. T. Nguyen, 2001. Pemphigus: An unfolding story. *The Journal of Investigative Dermatology*, 117(4):990–995.
- Gray, A. M. H., 1922. Pemphigus foliaceus. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 15(Dermatol Sect):20.

6 Literaturverzeichnis

- Green, H., O. Kehinde, und J. Thomas, 1979. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(11):5665–5668.
- Green, K. J. und C. L. Simpson, 2007. Desmosomes: New perspectives on a classic. *Journal of Investigative Dermatology*, 127:2499–2515.
- Guay, J., H. Lambert, G. Gingras-Breton, J. N. Lavoie, J. Huot, und J. Landry, 1997. Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *Journal of Cell Science*, 110:357–368.
- Hackel, P. O., E. Zwick, N. Prenzel, und A. Ullrich, 1999. Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(2):184–189.
- Hahn, K., W. Kippes, M. Amagai, B. Rzany, E.-B. Bröcker, und D. Zillikens, 2000. Klinik und Immunpathologie bei 48 Patienten mit Pemphigus. *Der Hautarzt*, 51:670–677.
- Hahn-Ristic, K., B. Rzany, M. Amagai, E.-B. Bröcker, und D. Zillikens, 2002. Increased incidence of pemphigus vulgaris in southern europeans living in Germany compared with native Germans. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 16(1):68–71.
- Hall, A. und C. D. Nobes, 2000. Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 355(1399):965–970.
- Han, J., J.-D. Lee, L. Bibbs, und R. J. Ulevitch, 1994. A map kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*, 265(5173):808–811.
- Hanakawa, Y., N. M. Schechter, C. Lin, L. Garza, H. Li, T. Yamaguchi, Y. Fudaba, K. Nishifuji, M. Sugai, M. Amagai, und J. R. Stanley, 2002. Molecular mechanisms of blister formation in bullous impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(1):53–60.
- Hariton, W. V. J., A. Galichet, T. V. Berghe, A. M. Overmiller, M. G. Mahoney, W. Declercq, und E. J. Müller, 2017. Feasibility study for clinical application of caspase- 3 inhibitors in pemphigus vulgaris. *Experimental Dermatology*, 26(12):1274–1277.
- Harrison, O. J., J. Brasch, G. Lasso, P. S. Katsamba, G. Ahlsen, B. Honig, und L. Shapiro, 2016. Structural basis of adhesive binding by desmocollins and desmogleins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(26):7160–7165.
- Hartlieb, E., B. Kempf, M. Partilla, B. Vigh, V. Spindler, und J. Waschke, 2013. Desmoglein 2 is less important than desmoglein 3 for keratinocyte cohesion. *PLOS ONE*, 8(1):e53739, 12 pages.
- Hartlieb, E., V. Rötzer, M. Radeva, V. Spindler, und J. Waschke, 2014. Desmoglein 2 compensates for desmoglein 3 but does not control cell adhesion via regulation of p38 mitogen-activated protein kinase in keratinocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(24):17043–17053.

6 Literaturverzeichnis

- Hashimoto, K., K. M. Shafran, P. S. Webber, G. S. Lazarus, und K. H. Singer, 1983. Anti-cell surface pemphigus autoantibody stimulates plasminogen activator activity of human epidermal cells. A mechanism for the loss of epidermal cohesion and blister formation. *The Journal of experimental medicine*, 157(1):259–272.
- Hashimoto, T., M. M. Ogawa, A. Konohana, und T. Nishikawa, 1990. Detection of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus antigens by immunoblot analysis using different antigen sources. *The Journal of Investigative Dermatology*, 94(3):327–331.
- Hatzfeld, M., C. Haffner, K. Schulze, und U. Vinzens, 2000. The function of plakophilin 1 in desmosome assembly and actin filament organization. *The Journal of Cell Biology*, 149(1):209–222.
- Hübner, F., A. Recke, D. Zillikens, R. Linder, und E. Schmidt, 2016. Prevalence and age distribution of pemphigus and pemphigoid diseases in germany. *The Journal of Investigative Dermatology*, 136(12):2495–2498.
- He, W., P. Cowin, und D. L. Stokes, 2003. Untangling desmosomal knots with electron tomography. *Science*, 302(5642):109–113.
- Herrmann, G., A. Engert, und N. Hunzelmann, 2003. Treatment of pemphigus vulgaris with anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab). *British Journal of Dermatology*, 148:602–603.
- Heupel, W.-M., 2010. *Rolle und Modulation von Cadherinen in pathologischen Prozessen*. Dissertation, Institut für Anatomie und Zellbiologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg, Deutschland.
- Heupel, W.-M., P. Engerer, E. Schmidt, und J. Waschke, 2009a. Pemphigus vulgaris IgG cause loss of desmoglein-mediated adhesion and keratinocyte dissociation independent of epidermal growth factor receptor. *The American Journal of Pathology*, 174(2):475–485.
- Heupel, W.-M., T. Müller, A. Efthymiadis, E. Schmidt, D. Drenckhahn, und J. Waschke, 2009b. Peptides targeting the desmoglein 3 adhesive interface prevent autoantibody-induced acantholysis in pemphigus. *The Journal of Biological Chemistry*, 284:8589–8595.
- Heupel, W.-M., D. Zillikens, D. Drenckhahn, und J. Waschke, 2008. Pemphigus vulgaris IgG directly inhibit desmoglein 3-mediated transinteraction. *The Journal of Immunology*, 181:1825–1834.
- Hjelm, H., K. Hjelm, und J. Sjöquist, 1972. Protein A from staphylococcus aureus. Its isolation by affinity chromatography and its use as an immunosorbent for isolation of immunoglobulins. *FEBS Letters*, 28(1):73–76.
- Hobbs, R. P. und K. J. Green, 2012. Desmoplakin regulates desmosome hyperadhesion. *The Journal of Investigative Dermatology*, 132(2):482–485.
- Hofrichter, M., J. Dworschak, S. Emtenani, J. Langenhan, F. Weiß, L. Komorowski, D. Zillikens, W. Stöcker, C. Probst, E. Schmidt, und S. Goletz, 2018. Immunoabsorption of desmoglein-3-specific IgG abolishes the blister-inducing capacity of pemphigus vulgaris IgG in neonatal mice. *Frontiers in Immunology*, 9:Article 1935.

6 Literaturverzeichnis

- Hooten, J. N., R. P. Hall, und A. R. Cardones, 2014. Updates on the management of autoimmune blistering diseases. *Skin Therapy Letter*, 19(5):1–6.
- Hu, C.-H., B. Michel, und J. R. Schiltz, 1978. Epidermal acantholysis induced in vitro by pemphigus autoantibody: An ultrastructural study. *The American Journal of Pathology*, 90(2):345–362.
- Ishii, K., M. Amagai, R. P. Hall, T. Hashimoto, A. Takayanagi, S. Gamou, N. Shimizu, und T. Nishikawa, 1997. Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific enzyme-linked Immunosorbent assays with baculovirus-expressed recombinant desmogleins. *The Journal of Immunology*, 159(4):2010–2017.
- Ishii, K., R. Harada, I. Matsuo, Y. Shirakata, K. Hashimoto, und M. Amagai, 2005. In vitro keratinocyte dissociation assay for evaluation of the pathogenicity of anti-desmoglein 3 IgG autoantibodies in pemphigus vulgaris. *The Journal of Investigative Dermatology*, 124(5):939–946.
- Janse, I. C., G. van der Wier, M. F. Jonkman, H. H. Pas, und G. F. Diercks, 2014. No evidence of apoptotic cells in pemphigus acantholysis. *The Journal of Investigative Dermatology*, 134(7):2039–2041.
- Jennings, J. M., D. K. Tucker, M. D. Kottke, M. Saito, E. Delva, Y. Hanakawa, M. Amagai, und A. P. Kowalczyk, 2011. Desmosome disassembly in response to pemphigus vulgaris IgG occurs in distinct phases and can be reversed by expression of exogenous dsG3. *The Journal of Investigative Dermatology*, 131(3):706–718.
- Jolly, P. S., P. Berkowitz, M. Bektas, H.-E. Lee, M. Chua, L. A. Diaz, und D. S. Rubenstein, 2010. p38MAPK signaling and desmoglein-3 internalization are linked events in pemphigus acantholysis. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(12):8936–8941.
- Jones, J. C. R., J. Arnn, L. A. Staehelin, und R. D. Goldman, 1984. Human autoantibodies against desmosomes: Possible causative factors in pemphigus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81:2781–2785.
- Jones, J. C. R., K. M. Yokoo, und R. D. Goldman, 1986. A cell surface desmosome-associated component: Identification of a tissue-specific cell adhesion molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83:7282–7286.
- Kalantari-Dehaghi, M., G. J. Anhalt, M. J. Camilleri, A. I. Chernyavsky, S. Chun, P. L. Felgner, A. Jasinskas, K. M. Leiferman, L. Liang, S. Marchenko, R. Nakajima-Sasaki, M. R. Pittelkow, J. J. Zone, und S. A. Grando, 2013. Pemphigus vulgaris autoantibody profiling by proteomic technique. *PLOS One*, 8(3):e57587, 10 pages.
- Kamiya, K., Y. Aoyama, C. Wakashima, T. Kudo, K. Nakajima, S. Sano, N. Ishii, K. Teye, T. Hashimoto, K. Iwatsuki, und Y. Tokura, 2016. Atypical pemphigus with immunoglobulin G autoantibodies against desmoglein 3 and desmocollin 3. *The Journal of Dermatology*, 43(4):429–431.
- Kawasaki, Y., Y. Aoyama, K. Tsunoda, M. Amagai, und Y. Kitajima, 2006. Pathogenic monoclonal antibody against desmoglein 3 augments desmoglein 3 and p38MAPK phosphorylation in human squamous carcinoma cell line. *Autoimmunity*, 39(7):587–590.

6 Literaturverzeichnis

- Kempf, W., M. Hantschke, H. Kutzner, und W. Burgdorf, 2015. *Dermatopathologie*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 3. Auflage.
- Kimura, T. E., A. J. Merritt, und D. R. Garrod, 2007. Calcium-independent desmosomes of keratinocytes are hyper-adhesive. *The Journal of Investigative Dermatology*, 127(4):775–781.
- King, I. A., K. H. Sullivan, R. B. Jr., und R. S. Buxton, 1995. The desmocollins of human foreskin epidermis: Identification and chromosomal assignment of a third gene and expression patterns of the three isoforms. *The Journal of Investigative Dermatology*, 105(3):314–321.
- Kitajima, Y., 2013. New insights into desmosome regulation and pemphigus blistering as a desmosome-remodeling disease. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 29(1):1–13.
- Kitajima, Y., Y. Aoyama, und M. Seishima, 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. *The Journal of Investigative Dermatology. Symposium Proceedings.*, 4(2):137–144.
- Kitano, Y. und N. Okada, 1983. Separation of the epidermal sheet by dispase. *The British Journal of Dermatology*, 108(5):555–560.
- Kneisel, A. und M. Hertl, 2011a. Autoimmune bullous skin diseases. Part 1: Clinical manifestations. *Journal of the German Society of Dermatology*, 9(10):844–856.
- Kneisel, A. und M. Hertl, 2011b. Autoimmune bullous skin diseases. Part 2: Diagnosis and therapy. *Journal of the German Society of Dermatology*, 9(11):927–947.
- Korman, N. J., R. W. Eyre, V. Klaus-Kovtun, und J. R. Stanley, 1989. Demonstration of an adhering-junction molecule (plakoglobin) in the autoantigens of pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris. *The New England Journal of Medicine*, 321(10):631–635.
- Korman, N. J., R. W. Eyre, J. Zone, und J. R. Stanley, 1991. Drug-induced pemphigus: Autoantibodies directed against the pemphigus antigen complexes are present in penicillamine and captopril-induced pemphigus. *The Journal of Investigative Dermatology*, 96:273–276.
- Kowalczyk, A. P., E. A. Bornslaeger, J. E. Borgwardt, H. L. Palka, A. S. Dhaliwal, C. M. Corcoran, M. F. Denning, und K. J. Green, 1997. The amino-terminal domain of desmoplakin binds to plakoglobin and clusters desmosomal cadherin-plakoglobin complexes. *The Journal of Cell Biology*, 139(3):773–784.
- Kröger, C., F. Loschke, N. Schwarz, R. Windoffer, R. E. Leube, und T. M. Magin, 2013. Keratins control intercellular adhesion involving PKC- α -mediated desmoplakin phosphorylation. *The Journal of Cell Biology*, 201(5):681–692.
- Kridin, K., S. Zelber-Sagi, M. Khamaisi, A. D. Cohen, und R. Bergman, 2016. Remarkable differences in the epidemiology of pemphigus among two ethnic populations in the same geographic region. *The Journal of the American Academy of Dermatology*, 75(5):925–930.

6 Literaturverzeichnis

- Lanza, A., M. Lanza, R. Santoro, V. Soro, S. S. Prime, und N. Cirillo, 2011. Deregulation of PERK in the autoimmune disease pemphigus vulgaris occurs via IgG-independent mechanisms. *The British Journal of Dermatology*, 164(2):336–343.
- Larsen, J. K., I. A. Yamboliev, L. A. Weber, und W. T. Gerthoffer, 1997. Phosphorylation of the 27-kDa heat shock protein via p38 MAP kinase and MAPKAP kinase in smooth muscle. *The American Journal of Physiology*, 273:L930–L940.
- Lee, H. E., P. Berkowitz, P. S. Jolly, L. A. Diaz, M. P. Chua, und D. S. Rubenstein, 2009. Biphasic activation of p38MAPK suggests that apoptosis is a downstream event in pemphigus acantholysis. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(18):12524–12532.
- Lee, S. H. und R. Dominguez, 2010. Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells. *Molecules and Cells*, 29(4):311–325.
- Lehman, T. A., R. Modali, P. Boukamp, J. Stanek, W. P. Bennett, J. A. Welsh, R. A. Metcalf, M. R. Stampfer, N. Fusenig, E. M. Rogan, und C. C. Harris, 1993. p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis*, 14(5):833–839.
- Lenz, P., M. Amagai, B. Volc-Platzer, G. Stingl, und R. Kirnbauer, 1999. Desmoglein 3-ELISA: A pemphigus vulgaris-specific diagnostic tool. *Archives of Dermatology*, 135(2):143–148.
- Lewis, J. E., J. K. W. III, K. M. Sass, P. J. Jensen, K. R. Johnson, und M. J. Wheelock, 1997. Cross-talk between adherens junctions and desmosomes depends on plakoglobin. *The Journal of Cell Biology*, 136(4):919–934.
- Li, N., M. Zhao, J. Wang, Z. Liu, und L. A. Diaz, 2009. Involvement of the apoptotic mechanism in pemphigus foliaceus autoimmune injury of the skin. *The Journal of Immunology*, 182(1):711–717.
- Liang, J., X. Zeng, Y. Halifu, W. Chen, F. Hu, P. Wang, H. Zhang, und X. Kang, 2017. Blocking RhoA/ROCK inhibits the pathogenesis of pemphigus vulgaris by suppressing oxidative stress and apoptosis through TAK1/NOD2-mediated NF- κ B pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 436(1-2):151–158.
- Lüllmann-Rauch, R., 2003. *Histologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Lämmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685.
- Lorch, J. H., J. Klessner, J. K. Park, S. Getsios, Y. L. Wu, M. S. Stack, und K. J. Green, 2004. Epidermal growth factor receptor inhibition promotes desmosome assembly and strengthens intercellular adhesion in squamous cell carcinoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(35):37191–37200.
- Loschke, F., M. Homberg, und T. M. Magin, 2016. Keratin isotypes control desmosome stability and dynamics through PKC α . *The Journal of Investigative Dermatology*, 136(1):202–213.

6 Literaturverzeichnis

- Luyet, C., K. Schulze, B. S. Sayar, D. Howald, E. J. Müller, und A. Galichet, 2015. Preclinical studies identify non-apoptotic low-level caspase-3 as therapeutic target in pemphigus vulgaris. *PLOS ONE*, 10(3):e0119809, 21 pages.
- Mahoney, M. G., Y. Hu, D. Brennan, H. Bazzi, A. M. Christiano, und J. K. W. III, 2006. Delineation of diversified desmoglein distribution in stratified squamous epithelia: implications in diseases. *Experimental Dermatology*, 15(2):101–109.
- Mahoney, M. G., Z. Wang, K. Rothenberger, P. J. Koch, M. Amagai, und J. R. Stanley, 1999a. Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. *The Journal of Clinical Investigation*, 103(4):461–468.
- Mahoney, M. G., Z. H. Wang, und J. R. Stanley, 1999b. Pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus antibodies are pathogenic in plasminogen activator knockout mice. *The Journal of Investigative Dermatology*, 113(1):22–25.
- Mao, X., E. J. Choi, und A. S. Payne, 2009. Disruption of desmosome assembly by monovalent human pemphigus vulgaris monoclonal antibodies. *The Journal of Investigative Dermatology*, 129(4):908–918.
- Mao, X., H. Li, Y. Sano, M. Gaestel, J. M. Park, und A. S. Payne, 2014. MAPKAP Kinase 2 (MK2)-dependent and -independent models of blister formation in pemphigus vulgaris. *The Journal of Investigative Dermatology*, 134(1):68–76.
- Mao, X., Y. Sano, J. M. Park, und A. S. Payne, 2011. P38MAPK activation is downstream of the loss of intercellular adhesion in pemphigus vulgaris. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(2):1283–1291.
- Marchenko, S., A. I. Chernyavsky, J. Arredondo, V. Gindi, und S. A. Grandó, 2010. Antimitochondrial autoantibodies in pemphigus vulgaris: A missing link in disease pathophysiology. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(6):3695–3704.
- Marcozzi, C., I. D. J. Burdett, R. S. Buxton, und A. I. Magee, 1998. Coexpression of both types of desmosomal cadherin and plakoglobin confers strong intercellular adhesion. *The Journal of Cell Science*, 111:495–509.
- Mazzi, G., A. Raineri, F. A. Zanolli, C. D. Ponte, D. D. Roia, L. Santarossa, R. Guerra, und B. M. Orazi, 2003. Plasmapheresis therapy in pemphigus vulgaris and bullous pemphigoid. *Transfusion and Apheresis Science*, 28:13–18.
- Merlob, P., A. Metzker, B. Hazaz, H. Rogovin, und S. H. Reisner, 1986. Neonatal pemphigus vulgaris. *Pediatrics*, 78(6):1102–1105.
- Michel, B. und C. S. Ko, 1977. An organ culture model for the study of pemphigus acantholysis. *British Journal of Dermatology*, 96(3):295–302.
- Müller, E., T. Hunziker, und M. M. Suter, 2007. Keratin intermediate filament retraction is linked to plakoglobin-dependent signaling in pemphigus vulgaris. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 56(5):890–891.

6 Literaturverzeichnis

- Müller, E., K. Kernland, R. Caldelari, M. Wyder, V. Balmer, und T. Hunziker, 2002. Unusual pemphigus phenotype in the presence of a dsg1 and dsg3 autoantibody profile. *The Journal of Investigative Dermatology*, 118(3):551–555.
- Müller, E. J., L. Williamson, C. Kolly, und M. M. Suter, 2008. Outside-in signaling through integrins and cadherins: a central mechanism to control epidermal growth and differentiation? *The Journal of Investigative Dermatology*, 128(3):501–516.
- Müller, R., N. Hunzelmann, V. Baur, G. Siebenhaar, E. Wenzel, R. Eming, A. Niedermeier, P. Musette, P. Joly, und M. Hertl, 2010. Targeted immunotherapy with rituximab leads to a transient alteration of the IgG autoantibody profile in pemphigus vulgaris. *Dermatology Research and Practice*, 2010:Article ID 321950, 9 pages.
- Morioka, S., G. S. Lazarus, und P. J. Jensen, 1987. Involvement of urokinase-type plasminogen activator in acantholysis induced by pemphigus IgG. *The Journal of Investigative Dermatology*, 89(5):474–477.
- Morton, W. M., K. R. Ayscough, und P. J. McLaughlin, 2000. Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization. *Nature Cell Biology*, 2(6):376–378.
- Moujaber, O. und U. Stochaj, 2019. The cytoskeleton as regulator of cell signaling pathways. *Trends in Biochemical Sciences*, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.11.003>.
- Mourellou, O., G. C. Chaidemenos, T. Koussidou, und E. Kapetis, 1995. The treatment of pemphigus vulgaris. Experience with 48 patients seen over an 11-year period. *The British Journal of Dermatology*, 133(1):83–87.
- Muzio, L. L., G. Pannone, S. Staibano, M. D. Mignogna, C. Rubini, G. Farronato, F. Ferrari, P. F. Nocini, und G. D. Rosa, 2002. Strict correlation between uPAR and plakoglobin expression in pemphigus vulgaris. *Journal of Cutaneous Pathology*, 29(9):540–548.
- Nagasaka, T., K. Nishifuji, T. Ota, N. V. Whittock, und M. Amagai, 2004. Defining the pathogenic involvement of desmoglein 4 in pemphigus and staphylococcal scalded skin syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(10):1484–1492.
- Nahas, N., T. F. P. Molski, G. A. Fernandez, und R. I. Sha'afi, 1996. Tyrosine phosphorylation and activation of a new mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascade in human neutrophils stimulated with various agonists. *The Biochemical Journal*, 318:247–53.
- Nakamura, K., T. Tanaka, A. Kuwahara, und K. Takeo, 1985. Microassay for proteins on nitrocellulose filter using protein dye-staining procedure. *Analytical Biochemistry*, 148:311–319.
- Nemoto, S., J. Xiang, S. Huang, und A. Lin, 1998. Induction of apoptosis by SB202190 through inhibition of p38 β mitogen-activated protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(26):16415–16420.
- Nguyen, V. T., A. Ndoye, und S. A. Grando, 2000a. Pemphigus vulgaris antibody identifies pemphaxin, a novel keratinocyte annexin-like molecule binding acetylcholine. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(38):29466–29476.

- Nguyen, V. T., A. Ndoye, L. D. Shultz, M. R. Pittelkow, und S. A. Grando, 2000b. Antibodies against keratinocyte antigens other than desmogleins 1 and 3 can induce pemphigus vulgaris-like lesions. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(12):1467–1479.
- Nie, Z., A. Merritt, M. Rouhi-Parkouhi, L. Taberner, und D. Garrod, 2011. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(3):2143–2154.
- Nishizuka, Y., 1992. Membrane-impermeable cross-linking provides evidence for homophilic, isoform-specific binding of desmosomal cadherins in epithelial cells. *Science*, 258(5082):607–614.
- North, A. J., W. G. Bardsley, J. Hyam, E. A. Bornslaeger, H. C. Cordingley, B. Trinnaman, M. Hatzfeld, K. J. Green, A. I. Magee, und D. R. Garrod, 1999. Molecular map of the desmosomal plaque. *Journal of Cell Science*, 112:4325–4336.
- Nuber, U. A., S. Schäfer, A. Schmidt, P. J. Koch, und W. W. Franke, 1995. The widespread human desmocollin dsc2 and tissue-specific patterns of synthesis of various desmocollin subtypes. *European Journal of Cell Biology*, 66(1):69–74.
- Oktarina, D. A. M., G. van der Wier, G. F. H. Diercks, M. F. Jonkman, und H. H. Pas, 2011. IgG-induced clustering of desmogleins 1 and 3 in skin of patients with pemphigus fits with the desmoglein nonassembly depletion hypothesis. *The British Journal of Dermatology*, 165(3):552–562.
- Ornstein, L., 1964. Disc electrophoresis - I background and theory. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121:321–349.
- Osada, K., M. Seishima, und Y. Kitajima, 1997. Pemphigus IgG activates and translocates protein kinase C from the cytosol to the particulate/cytoskeleton fractions in human keratinocytes. *The Journal of Investigative Dermatology*, 108(4):482–487.
- Pacheco-Tovar, D., A. López-Luna, R. Herrera-Esparza, und E. Avalos-Díaz, 2011. The caspase pathway as a possible therapeutic target in experimental pemphigus. *Autoimmune Diseases*, 2011:Article ID 563091, 9 pages.
- Pan, M., X. Liu, und J. Zheng, 2011. The pathogenic role of autoantibodies in pemphigus vulgaris. *Clinical and Experimental Dermatology*, 36(7):703–707.
- Panchuk-Voloshina, N., R. P. Haugland, J. Bishop-Stewart, M. K. Bhalgat, P. J. Millard, F. Mao, W.-Y. Leung, und R. P. Haugland, 1999. Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 47:1179–1188.
- Parsons, J. T., A. R. Horwitz, und M. A. Schwartz, 2010. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature Reviews. Molecular cell biology*, 11(9):633–643.
- Pasdar, M., K. A. Krzeminski, und W. J. Nelson, 1991. Regulation of desmosome assembly in MDCK epithelial cells: Coordination of membrane core and cytoplasmic plaque domain assembly at the plasma membrane. *The Journal of Cell Biology*, 113(3):645–655.

- Pasdar, M. und Z. Li, 1993. Disorganization of microfilaments and intermediate filaments interferes with the assembly and stability of desmosomes in MDCK epithelial cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 26(2):163–180.
- Pelacho, B., C. Natal, A. Espana, I. Sanchez-Carpintero, M. J. Iraburu, und M. J. Lopez-Zabalza, 2004. Pemphigus vulgaris autoantibodies induce apoptosis in HaCaT keratinocytes. *FEBS Letters*, 566(1-3):6–10.
- Perng, M. D., L. Cairns, P. van den IJssel, A. Prescott, A. M. Hutcheson, und R. A. Quinlan, 1999. Intermediate filament interactions can be altered by HSP27 and α B-crystallin. *Journal of Cell Science*, 112:2099–2112.
- Pretel, M., A. Espana, M. Marquina, B. Pelacho, J. M. Lopez-Picazo, und M. J. Lopez-Zabalza, 2009. An imbalance in Akt/mTOR is involved in the apoptotic and acantholytic processes in a mouse model of pemphigus vulgaris. *Experimental Dermatology*, 18(9):771–780.
- Prichard, P. M. und M. J. Cormier, 1968. Studies on the mechanism of the horseradish peroxidase catalyzed luminescent peroxidation of luminol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 31(1):131–136.
- Puviani, M., A. Marconi, E. Cozzani, und C. Pincelli, 2003. Fas ligand in pemphigus sera induces keratinocyte apoptosis through the activation of caspase-8. *The Journal of Investigative Dermatology*, 120(1):164–167.
- Rafei, D., R. Müller, N. Ishii, M. Llamazares, T. Hashimoto, M. Hertl, und R. Eming, 2011. IgG autoantibodies against desmocollin 3 in pemphigus sera induce loss of keratinocyte adhesion. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 178(2):718–723.
- Rassner, G., 2007. *Dermatologie: Lehrbuch und Atlas*. Elsevier, Urban & Fischer Verlag, München, 8. Auflage.
- Roessner, A., U. Pfeifer, und H. K. Müller-Hermelink, 2004. *Grundmann: Allgemeine Pathologie*. Elsevier, Urban & Fischer Verlag, München, 10. Auflage.
- Rötzer, V., A. Breit, J. Waschke, und V. Spindler, 2014. Adducin is required for desmosomal cohesion in keratinocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(21):14925–14940.
- Rötzer, V., E. Hartlieb, F. Vielmuth, M. Gliem, V. Spindler, und J. Waschke, 2015. E-cadherin and Src associate with extradesmosomal dsg3 and modulate desmosome assembly and adhesion. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(24):4885–4897.
- Rötzer, V., E. Hartlieb, J. Winkler, E. Walter, A. Schlipp, M. Sardy, V. Spindler, und J. Waschke, 2016. Desmoglein 3-dependent signaling regulates keratinocyte migration and wound healing. *The Journal of Investigative Dermatology*, 136(1):301–310.
- Rubenstein, D. S. und L. A. Diaz, 2006. Pemphigus antibody induced phosphorylation of keratinocyte proteins. *Autoimmunity*, 39(7):577–586.

6 Literaturverzeichnis

- Runswick, S. K., M. J. O'Hare, L. Jones, C. H. Streuli, und D. R. Garrod, 2001. Desmosomal adhesion regulates epithelial morphogenesis and cell positioning. *Nature Cell Biology*, 3(9):823–830.
- Rusnak, D. W., K. Affleck, S. G. Cockerill, C. Stubberfield, R. Harris, M. Page, K. J. Smith, S. B. Guntrip, M. C. Carter, R. J. Shaw, A. Jowett, J. Stables, P. Topley, E. R. Wood, P. S. Brignola, S. H. Kadwell, B. R. Reep, R. J. Mullin, K. J. Alligood, B. R. Keith, R. M. Crosby, D. M. Murray, W. B. Knight, T. M. Gilmer, und K. Lackey, 2001. The characterization of novel, dual ErbB-2/EGFR, Tyrosine kinase inhibitors: potential therapy for cancer. *Cancer Research*, 61:7196–7203.
- Saito, M., S. N. Stahley, C. Y. Caughman, X. Mao, D. K. Tucker, A. S. Payne, M. Amagai, und A. P. Kowalczyk, 2012. Signaling dependent and independent mechanisms in pemphigus vulgaris blister formation. *PLOS One*, 7(12):Article e50696.
- Samuelov, L. und E. Sprecher, 2015. Inherited desmosomal disorders. *Cell and Tissue Research*, 360:457–475.
- Sanath, A. K., A. S. Devy, S. Aithal, G. S. Kumar, B. G. Prasad, und P. S. Pradeep, 2018. Caspase cascade pathways of apoptosis in oral pemphigus: An immunohistochemical study. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology: JOMFP*, 22(1):48–53.
- Sanchez-Carpintero, I., A. Espana, B. Pelacho, N. L. Moratalla, D. S. Rubenstein, L. A. Diaz, und M. J. Lopez-Zabalza, 2004. In vivo blockade of pemphigus vulgaris acantholysis by inhibition of intracellular signal transduction cascades. *The British Journal of Dermatology*, 151(3):565–570.
- Sato, M., Y. Aoyama, und Y. Kitajima, 2000. Assembly pathway of desmoglein 3 to desmosomes and its perturbation by pemphigus vulgaris-IgG in cultured keratinocytes, as revealed by time-lapsed labeling immunoelectron microscopy. *Laboratory Investigation; A journal of technical methods and pathology*, 80(10):1583–1592.
- Sayama, K., S. Yonehara, Y. Watanabe, und Y. Miki, 1994. Expression of Fas antigen on keratinocytes in vivo and induction of apoptosis in cultured keratinocytes. *The Journal of Investigative Dermatology*, 103(3):330–334.
- Sayar, B. S., S. Rüegg, E. Schmidt, M. Sibilia, M. Siffert, M. M. Suter, A. Galichet, und E. J. Müller, 2014. EGFR inhibitors erlotinib and lapatinib ameliorate epidermal blistering in pemphigus vulgaris in a non-linear, v-shaped relationship. *Experimental Dermatology*, 23(1):33–38.
- Schäfer, S., P. J. Koch, und W. W. Franke, 1994. Identification of the ubiquitous human desmoglein, dsg2, and the expression catalogue of the desmoglein subfamily of desmosomal cadherins. *Experimental Cell Research*, 211:391–399.
- Schiltz, J. R. und B. Michel, 1976. Production of epidermal acantholysis in normal human skin in vitro by the IgG-fraction from pemphigus serum. *The Journal of Investigative Dermatology*, 67(2):254–260.

6 Literaturverzeichnis

- Schinner, C., F. Vielmuth, V. Rötzer, M. Hiermaier, M. Y. Radeva, T. K. Co, E. Hartlieb, A. Schmidt, A. Imhof, A. Messoudi, A. Horn, A. Schlipp, V. Spindler, und J. Waschke, 2017. Adrenergic signaling strengthens cardiac myocyte cohesion. *Circulation Research*, 120(8):1305–1317.
- Schlögl, E., M. Y. Radeva, F. Vielmuth, C. Schinner, J. Waschke, und V. Spindler, 2018. Keratin retraction and desmoglein 3 internalization independently contribute to autoantibody-induced cell dissociation in pemphigus vulgaris. *Frontiers in Immunology*, 9:Article 858.
- Schliwa, M., 1982. Action of cytochalasin D on cytoskeletal networks. *The Journal of Cell Biology*, 92:79–91.
- Schmidt, E., E.-B. Bröcker, und D. Zillikens, 2000. Pemphigus: Verlust des desmosomalen Zell-Zell-Kontaktes. *Der Hautarzt*, 51(5):309–318.
- Schmidt, E., M. Goebeler, M. Hertl, M. Sárdy, C. Sitaru, R. Eming, S. C. Hofmann, N. Hunzelmann, J. S. Kern, H. Kramer, H.-D. Orzechowski, C. Pfeiffer, V. Schuster, B. Sporbeck, M. Sticherling, M. Worm, D. Zillikens, und A. Nast, 2015. S2k-Leitlinie zur Diagnostik des Pemphigus vulgaris/foliaceus und des bullösen Pemphigoids. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 13(7):713–727.
- Schmidt, E., J. Gutberlet, D. Siegmund, D. Berg, H. Wajant, und J. Waschke, 2009. Apoptosis is not required for acantholysis in pemphigus vulgaris. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 296(1):C162–172.
- Schmidt, E., E. Klinker, A. Opitz, S. Herzog, C. Sitaru, M. Goebeler, B. M. Taleghoni, E.-B. Bröcker, und D. Zillikens, 2003. Protein A immunoabsorption: a novel and effective adjuvant treatment of severe pemphigus. *British Journal of Dermatology*, 148:1222–1229.
- Schmidt, E., V. Spindler, R. Eming, M. Amagai, F. Antonicelli, J. F. Baines, M. Belheouane, P. Bernard, L. Borradori, M. Caproni, G. D. Zenzo, S. Grando, K. Harman, M. F. Jonkman, H. Koga, R. J. Ludwig, A. P. Kowalczyk, E. J. Müller, W. Nishie, H. Pas, A. S. Payne, C. D. Sadik, A. Seppänen, J. Setterfield, H. Shimizu, A. A. Sinha, E. Sprecher, M. Sticherling, H. Ujiie, D. Zillikens, M. Hertl, und J. Waschke, 2017. Meeting report of the pathogenesis of pemphigus and pemphigoid meeting in Munich, September 2016. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(6):1199–1203.
- Schmidt, E. und J. Waschke, 2009. Apoptosis in pemphigus. *Autoimmunity Reviews*, 8(7):533–537.
- Schuh, T., R. Besch, E. Braungart, M. J. Flaig, K. Douwes, C. A. Sander, V. Magdolen, C. Probst, K. Wosikowski, und K. Degitz, 2003. Protease inhibitors prevent plasminogen-mediated, but not pemphigus vulgaris-induced, acantholysis in human epidermis. *Biological Chemistry*, 384(2):311–315.
- Schulze, K., A. Galichet, B. S. Sayar, A. Scothern, D. Howald, H. Zymann, M. Siffert, D. Zenhäusern, R. Bolli, P. J. Koch, D. Garrod, M. M. Suter, und E. J. Müller, 2012. An adult passive transfer mouse model to study desmoglein 3 signaling in pemphigus vulgaris. *The Journal of Investigative Dermatology*, 132(2):346–355.

- Schwerk, C. und K. Schulze-Osthoff, 2003. Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation. *Biochemical Pharmacology*, 66(8):1453–1458.
- Scott, D. W., T. Manning, C. A. Smith, und R. M. Lewis, 1983. Pemphigus and pemphigoid in dogs, cats, and horses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 420(1):353–360.
- Sekiguchi, M., Y. Futei, Y. Fujii, T. Iwasaki, T. Nishikawa, und M. Amagai, 2001. Dominant autoimmune epitopes recognized by pemphigus antibodies map to the N-terminal adhesive region of desmogleins. *The Journal of Immunology*, 167(9):5439–5448.
- Seltmann, K., A. W. Fritsch, J. A. Käs, und T. M. Magin, 2013a. Keratins significantly contribute to cell stiffness and impact invasive behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(46):18507–18512.
- Seltmann, K., W. Roth, C. Kröger, F. Loschke, M. Lederer, S. Hüttelmaier, und T. M. Magin, 2013b. Keratins mediate localization of hemidesmosomes and repress cell motility. *The Journal of Investigative Dermatology*, 133(1):181–190.
- Shapiro, A. L., E. Vinuela, und J. V. M. Jr., 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 28(5):815–820.
- Shimizu, H., A. Ishiko, T. Ota, K. Tsunoda, M. Amagai, und T. Nishikawa, 2004. IgG binds to desmoglein 3 in desmosomes and causes a desmosomal split without keratin retraction in a pemphigus mouse model. *The Journal of Investigative Dermatology*, 122(5):1145–1153.
- Shimizu, H., T. Masunaga, A. Ishiko, A. Kikuchi, T. Hashimoto, und T. Nishikawa, 1995. Pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus sera show an inversely graded binding pattern to extracellular regions of desmosomes in different layers of human epidermis. *The Journal of Investigative Dermatology*, 105(2):153–159.
- Shirakata, Y., M. Amagai, Y. Hanakawa, T. Nishikawa, und K. Hashimoto, 1998. Lack of mucosal involvement in pemphigus foliaceus may be due to low expression of desmoglein 1. *The Journal of Investigative Dermatology*, 110(1):76–78.
- Shu, E., Y. Yamamoto, Y. Aoyama, und Y. Kitajima, 2007. Intraperitoneal injection of pemphigus vulgaris-IgG into mouse depletes epidermal keratinocytes of desmoglein 3 associated with generation of acantholysis. *Archives of Dermatological Research*, 299(3):165–167.
- Singer, K. H., N. J. Sawka, H. R. Samowitz, und G. S. Lazarus, 1980. Proteinase activation: A mechanism for cellular dyshesion in pemphigus. *The Journal of Investigative Dermatology*, 74(5):363–367.
- Smith, E. A. und E. Fuchs, 1998. Defining the interactions between intermediate filaments and desmosomes. *The Journal of Cell Biology*, 141(5):1229–1241.
- Spector, I., N. R. Shochet, D. Blasberger, und Y. Kashman, 1989. Latrunculins - novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. comparison with cytochalasin D. *Cell motility and the cytoskeleton*, 13(3):127–144.

- Spindler, V., 2008. *Bedeutung der Rho-GPTasen für desmosomale Adhäsion und Pemphigus-Pathogenese*. Med. Dissertation, Institut für Anatomie und Zellbiologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg, Deutschland.
- Spindler, V., C. Dehner, S. Hübner, und J. Waschke, 2014. Plakoglobin but not desmoplakin regulates keratinocyte cohesion via modulation of p38MAPK signaling. *The Journal of Investigative Dermatology*, 134(6):1655–1664.
- Spindler, V., D. Drenckhahn, D. Zillikens, und J. Waschke, 2007. Pemphigus IgG causes skin splitting in the presence of both desmoglein 1 and desmoglein 3. *The American Journal of Pathology*, 171(3):906–916.
- Spindler, V., R. Eming, E. Schmidt, M. Amagai, S. Grando, M. F. Jonkman, A. P. Kowalczyk, E. J. Müller, A. S. Payne, C. Pincelli, A. A. Sinha, E. Sprecher, D. Zillikens, M. Hertl, und J. Waschke, 2018. Mechanisms causing loss of keratinocyte cohesion in pemphigus. *The Journal of Investigative Dermatology*, 138(1):32–37.
- Spindler, V., A. Endlich, E. Hartlieb, F. Vielmuth, E. Schmidt, und J. Waschke, 2011. The extent of desmoglein 3 depletion in pemphigus vulgaris is dependent on Ca²⁺-induced differentiation. *The American Journal of Pathology*, 179(4):1905–1916.
- Spindler, V., W.-M. Heupel, A. Efthymiadis, E. Schmidt, R. Eming, C. Rankl, P. Hinterdorfer, T. Müller, D. Drenckhahn, und J. Waschke, 2009. Desmocollin 3-mediated binding is crucial for keratinocyte cohesion and is impaired in pemphigus. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(44):30556–30564.
- Spindler, V., V. Rötzer, C. Dehner, B. Kempf, M. Gliem, M. Radeva, E. Hartlieb, G. S. Harms, E. Schmidt, und J. Waschke, 2013. Peptide-mediated desmoglein 3 crosslinking prevents pemphigus vulgaris autoantibody-induced skin blistering. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(2):800–811.
- Spindler, V., F. Vielmuth, E. Schmidt, D. S. Rubenstein, und J. Waschke, 2010. Protective endogenous cyclic adenosine 5'-monophosphate signaling triggered by pemphigus autoantibodies. *The Journal of Immunology*, 185(11):6831–6838.
- Spindler, V. und J. Waschke, 2011. Role of Rho GTPases in desmosomal adhesion and pemphigus pathogenesis. *Annals of Anatomy*, 193(3):177–180.
- Spindler, V. und J. Waschke, 2014. Desmosomal cadherins and signaling: Lessons from autoimmune disease. *Cell Communication & Adhesion*, 21(1):77–84.
- Spindler, V. und J. Waschke, 2018. Pemphigus - a disease of desmosome dysfunction caused by multiple mechanisms. *Frontiers in Immunology*, 9:Article 136.
- Stahley, S. N., M. Saito, V. Faundez, M. Koval, A. L. Mattheyses, und A. P. Kowalczyk, 2014. Desmosome assembly and disassembly are membrane raft-dependent. *PLOS ONE*, 9(1):e87809, 10 pages.
- Stanley, J. R., T. Nishikawa, L. A. Diaz, und M. Amagai, 2001. Pemphigus: Is there another half of the story? *The Journal of Investigative Dermatology*, 116(4):489–490.

6 Literaturverzeichnis

- Stenn, K. S., R. Link, G. Moellmann, J. Madri, und E. Kuklinska, 1989. Dispase, a neutral protease from bacillus polymyxa, is a powerful fibronectinase and type IV collagenase. *The Journal of Investigative Dermatology*, 93(2):287–290.
- Sticha, K., 2009. *Untersuchungen zum molekularen Aufbau von Zell-Zell-Kontakten und zur differentiellen Expression von Endothelzellproteinen nach Hypoxie zur Aufklärung von Pathomechanismen an der Blut-Hirn-Schranke*. Med. Dissertation, Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin, Berlin, Deutschland.
- Syed, S., B. Trinnaman, S. Martin, S. Major, J. Hutchinson, und A. I. Magee, 2002. Molecular interactions between desmosomal cadherins. *Biochemical Journal*, 362:317–327.
- Takahashi, Y., H. P. Patel, R. S. Labib, L. A. Diaz, und G. J. Anhalt, 1985. Desmosomal adhesion inhibits invasive behavior. *The Journal of Investigative Dermatology*, 84(1):41–46.
- Tan, Y., J. Rouse, A. Zhang, S. Cariatil, P. Cohen, und M. J. Comb, 1996. FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *The EMBO Journal*, 15(17):4629–4642.
- Towbin, H., T. Staehelin, und J. Gordon, 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9):4350–4354.
- Tsang, S. M., L. Brown, H. Gadmor, L. Gammon, F. Fortune, A. Wheeler, und H. Wan, 2012a. Desmoglein 3 acting as an upstream regulator of Rho GTPases, Rac-1/Cdc42 in the regulation of actin organisation and dynamics. *Experimental Cell Research*, 318(18):2269–2283.
- Tsang, S. M., L. Brown, K. Lin, L. Liu, K. Piper, E. A. O'Toole, R. Grose, I. R. Hart, D. R. Garrod, F. Fortune, und H. Wan, 2012b. Non-junctional human desmoglein 3 acts as an upstream regulator of Src in E-cadherin adhesion, a pathway possibly involved in the pathogenesis of pemphigus vulgaris. *The Journal of Pathology*, 227(1):81–93.
- Tselepis, C., M. Chidgey, A. North, und D. Garrod, 1998. Desmosomal adhesion inhibits invasive behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95:8064–8069.
- Tsunoda, K., T. Ota, M. Aoki, T. Yamada, T. Nagai, T. Nakagawa, S. Koyasu, T. Nishikawa, und M. Amagai, 2003. Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein. *The Journal of Immunology*, 170:2170–2178.
- Tsunoda, K., T. Ota, M. Saito, T. Hata, A. Shimizu, A. Ishiko, T. Yamada, T. Nakagawa, A. P. Kowalczyk, und M. Amagai, 2011. Pathogenic relevance of IgG and IgM antibodies against desmoglein 3 in blister formation in pemphigus vulgaris. *The American Journal of Pathology*, 179(2):795–806.
- Tucker, D. K., S. N. Stahley, und A. P. Kowalczyk, 2014. Plakophilin-1 protects keratinocytes from pemphigus vulgaris IgG by forming calcium-independent desmosomes. *The Journal of Investigative Dermatology*, 134(4):1033–1043.

6 Literaturverzeichnis

- Ungewiß, H., F. Vielmuth, S. T. Suzuki, A. Maiser, H. Harz, H. Leonhardt, D. Kugelmann, N. Schlegel, und J. Waschke, 2017. Desmoglein 2 regulates the intestinal epithelial barrier via p38 mitogen-activated protein kinase. *Scientific Reports*, 7(1):6329.
- van der Wier, G., H. H.Pas, und M. F. Jonkman, 2010. Experimental human cell and tissue models of pemphigus. *Dermatology Research and Practice*, 2010:Article ID 143871, 8 pages.
- Vasioukhin, V., C. Bauer, M. Yin, und E. Fuchs, 2000. Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell*, 100(2):209–219.
- Vielmuth, F., 2014. *Die Rolle von cAMP bei Pemphigus vulgaris*. Med. Dissertation, Institut für Anatomie und Zellbiologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg, Deutschland.
- Vielmuth, F., E. Hartlieb, D. Kugelmann, J. Waschke, und V. Spindler, 2015a. Atomic force microscopy identifies regions of distinct desmoglein 3 adhesive properties on living keratinocytes. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 11(3):511–520.
- Vielmuth, F., V. Rötzer, E. Hartlieb, C. Hirneiß, J. Waschke, und V. Spindler, 2016. Pemphigus autoantibodies induce blistering in human conjunctiva. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 57(10):4442–4449.
- Vielmuth, F., V. Spindler, und J. Waschke, 2018a. Atomic force microscopy provides new mechanistic insights into the pathogenesis of pemphigus. *Frontiers in Immunology*, 9:Article 485.
- Vielmuth, F., E. Walter, M. Fuchs, M. Y. Radeva, F. Buechau, T. M. Magin, V. Spindler, und J. Waschke, 2018b. Keratins regulate p38MAPK-dependent desmoglein binding properties in pemphigus. *Frontiers in Immunology*, 9:Article 528.
- Vielmuth, F., M.-T. Wanuske, M. Y. Radeva, M. Hiermaier, D. Kugelmann, E. Walter, F. Buechau, T. M. Magin, J. Waschke, und V. Spindler, 2018c. Keratins regulate the adhesive properties of desmosomal cadherins through signaling. *Journal of Investigative Dermatology*, 138(1):121–131.
- Vielmuth, F., J. Waschke, und V. Spindler, 2015b. Loss of desmoglein binding is not sufficient for keratinocyte dissociation in pemphigus. *The Journal of Investigative Dermatology*, 135(12):3068–3077.
- Wallis, S., S. Lloyd, I. Wise, G. Ireland, T. P. Fleming, und D. Garrod, 2000. The α isoform of protein kinase C is involved in signaling the response of desmosomes to wounding in cultured epithelial cells. *Molecular Biology of the Cell*, 11(3):1077–1092.
- Walter, E., F. Vielmuth, L. Rotkopf, M. Sárdy, O. N. Horváth, M. Goebeler, E. Schmidt, R. Eming, M. Hertl, V. Spindler, und J. Waschke, 2017. Different signaling patterns contribute to loss of keratinocyte cohesion dependent on autoantibody profile in pemphigus. *Scientific Reports*, 7(1):Article 3579.

6 Literaturverzeichnis

- Wang, X., F. Brégégère, M. Frusic-Zlotkin, M. Feinmesser, B. Michel, und Y. Milner, 2004. Possible apoptotic mechanism in epidermal cell acantholysis induced by pemphigus vulgaris autoimmunoglobulins. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 9(2):131–143.
- Wang, X. und D. Ron, 1996. Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP kinase. *Science*, 272(5266):1347–1349.
- Waschke, J., 2008. The desmosome and pemphigus. *Histochemistry and Cell Biology*, 130(1):21–54.
- Waschke, J., 2018. Desmogleins as signaling hubs regulating cell cohesion and tissue/organ function in skin and heart - EFEM lecture 2018. *Annals of Anatomy*, doi: 10.1016/j.aanat.2018.11.006.
- Waschke, J., P. Bruggeman, W. Baumgartner, D. Zillikens, und D. Drenckhahn, 2005. Pemphigus foliaceus IgG causes dissociation of desmoglein 1-containing junctions without blocking desmoglein 1 transinteraction. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(11):3157–3165.
- Waschke, J., C. Menendez-Castro, P. Bruggemann, R. Koob, M. Amagai, H. J. Gruber, D. Drenckhahn, und W. Baumgartner, 2007. Imaging and force spectroscopy on desmoglein 1 using atomic force microscopy reveal multivalent Ca^{2+} -dependent, low-affinity trans-interaction. *The Journal of Membrane Biology*, 216(2-3):83–92.
- Waschke, J. und V. Spindler, 2014. Desmosomes and extradesmosomal adhesive signaling contacts in pemphigus. *Medicinal Research Reviews*, 34(6):1127–1145.
- Waschke, J., V. Spindler, P. Bruggeman, D. Zillikens, G. Schmidt, und D. Drenckhahn, 2006. Inhibition of Rho A activity causes pemphigus skin blistering. *The Journal of Cell Biology*, 175(5):721–727.
- Watt, F. M., D. L. Matthey, und D. R. Garrod, 1984. Calcium-induced reorganization of desmosomal components in cultured human keratinocytes. *The Journal of Cell Biology*, 99(6):2211–2215.
- Weiske, J., T. Schöneberg, W. Schröder, M. Hatzfeld, R. Tauber, und O. Huber, 2001. The fate of desmosomal proteins in apoptotic cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(44):41175–41181.
- Wheeler, G. N., A. E. Parker, C. L. Thomas, P. Ataliotis, D. Poynter, J. Arnemann, A. J. Rutman, S. C. Pidsley, F. M. Watt, D. A. Rees, R. S. Buxton, und A. I. Magee, 1991. Desmosomal glykoprotein DG1, a component of intercellular desmosome junctions, is related to the cadherin family of cell adhesion molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(11):4796–4800.
- Whitehead, T. P., L. J. Kricka, T. J. N. Carter, und G. H. G. Thorpe, 1979. Analytical luminescence: Its potential in the clinical laboratory. *Clinical Chemistry*, 25(9):1531–1546.
- Whitlock, N. V. und C. Bower, 2003. Genetic evidence for a novel human desmosomal cadherin, desmoglein 4. *Journal of Investigative Dermatology*, 120:523–530.

- Wieland, T., J. X. de Vries, A. Schäfer, und H. Faulstich, 1975. Spectroscopic evidence for the interaction of phalloidin with actin. *FEBS Letters*, 54(1):73–75.
- Wilgram, G. F., J. B. Caulfield, und W. F. Lever, 1961. An electron microscopic study of acantholysis in pemphigus vulgaris. *The Journal of Investigative Dermatology*, 36:373–382.
- Williamson, L., T. Hunziker, M. M. Suter, und E. J. Müller, 2007. Nuclear c-myc: A molecular marker for early stage pemphigus vulgaris. *The Journal of Investigative Dermatology*, 127(6):1549–1555.
- Williamson, L., N. A. Raess, R. Caldelari, A. Zakher, A. de Bruin, H. Posthaus, R. Bolli, T. Hunziker, M. M. Suter, und E. J. Müller, 2006. Pemphigus vulgaris identifies plakoglobin as key suppressor of c-myc in the skin. *The EMBO Journal*, 25:3298–3309.
- Windoffer, R., M. Borchert-Stuhlträger, und R. E. Leube, 2002. Desmosomes: interconnected calcium-dependent structures of remarkable stability with significant integral membrane protein turnover. *Journal of Cell Science*, 115:1717–1732.
- Wolff, K. und E. Schreiner, 1997. Ultrastructural localisation of pemphigus autoantibodies within the epidermis. *Nature*, 229:59–61.
- Wu, H., Z. H. Wang, A. Yan, S. Lyle, S. Fakhrazadeh, J. K. Wahl, M. J. Wheelock, H. Ishikawa, J. Uitto, M. Amagai, und J. R. Stanley, 2000. Protection against pemphigus foliaceus by desmoglein 3 in neonates. *The New England Journal of Medicine*, 343(1):31–35.
- Yamamoto, Y., Y. Aoyama, E. Shu, K. Tsunoda, M. Amagai, und Y. Kitajima, 2007. Anti-desmoglein 3 (dsg3) monoclonal antibodies deplete desmosomes of dsg3 and differ in their dsg3-depleting activities related to pathogenicity. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(24):17866–17876.
- Yin, T., S. Getsios, R. Caldelari, L. M. Godsel, A. P. Kowalczyk, E. J. Müller, und K. J. Green, 2005. Mechanisms of plakoglobin-dependent adhesion: desmosome-specific functions in assembly and regulation by epidermal growth factor receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(48):40355–40363.
- Zenzo, G. D., K. T. Amber, B. S. Sayar, E. J. Müller, und L. Borradori, 2016. Immune response in pemphigus and beyond: progresses and emerging concepts. *Seminars in Immunopathology*, 38(1):57–74.
- Zenzo, G. D., L. Borradori, und E. J. Müller, 2017. The pathogenesis of pemphigus: Controversy vs complexity. *Experimental Dermatology*, 26(12):1271–1273.
- Zenzo, G. D., G. D. Lullo, D. Corti, V. Calabresi, A. Sinistro, F. Vanzetta, B. Didona, G. Cianchini, M. Hertl, R. Eming, M. Amagai, B. Ohyama, T. Hashimoto, J. Sloostra, F. Sallusto, G. Zambruno, und A. Lanzavecchia, 2012. Pemphigus autoantibodies generated through somatic mutations target the desmoglein-3 cis-interface. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(10):3781–3790.
- Zhang, J., B. Shen, und A. Lin, 2007. Novel strategies for inhibition of the p38MAPK pathway. *Trends in Pharmacological Sciences*, 28(6):286–295.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ach	Acetylcholin
AK	Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ASMA	Anti-smooth muscle antibodies
BSA	Rinderserumalbumin
C	Celsius
C3	Komplementfaktor C3
Ca²⁺	Calcium
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CAR	Cell adhesion recognition site
Cy3	Indocarbocyanin 3
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMP	Dimethylpimelimidat
Dsc	Desmocollin
Dsg	Desmoglein
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
EC	Extrazelluläre Domäne
ECL	Enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor-Rezeptor
EGTA	Ethylendioxy-bis-(ethylenitrilo)-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
F-Aktin	Filamentäres Aktin
Fc	Crystallisable fragment
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
G-Aktin	Globuläres Aktin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
ggf.	gegebenenfalls
GW2974	N ⁴ -(1-Benzyl-1H-indazol-5-yl)-N ⁶ ,N ⁶ -dimethyl-pyrido[3,4-d]pyrimidine-4,6-diamine
h	Stunde
HaCaT-Zellen	Human adult low calcium elevated temperature-Zellen
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen

HSP Hitzeschockprotein
IgG Immunglobulin G
IIF Indirekte Immunfluoreszenz
IP₃ Inositoltriphosphat
IVIG Intravenöse Immunglobuline
kDa Kilodalton
l Liter
M Molar = mol/l
mA Milliampere
MAPKAP-Kinase 2 Mitogen-aktivierte Proteinkinase-aktivierte Proteinkinase 2
MES 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min. Minute
ml Milliliter
mm Millimeter
mmol Millimol
Nd:YAG-Laser Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
NGS Normales Ziegenserum
nm Nanometer
NPG N-Propylgallat
p38MAPK p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase
p-p38MAPK Phosphorylierte p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase
PA Plasminogen-Aktivator
PAGE Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCA Trans-4-Hydroxycinnamic acid
PF Pemphigus foliaceus
PF-IgG Pemphigus foliaceus-Immunglobulin G
pH pH-Wert
phospho phosphoryliert
PKA Proteinkinase A
PKC Proteinkinase C
PLC Phospholipase C
PMSF Phenylmethylsulfonylfluorid
POX Meerrettichperoxidase
PPL Prestained protein ladder
PV Pemphigus vulgaris
PVA Pemphigus vulgaris-Antigen
PV-IgG Pemphigus vulgaris-Immunglobulin G
PX Pemphaxin
Rho-GTPase Ras homologe-GTPase
RhoA Ras homolog gene family, member A
SB202190 4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-pyridyl)-1H-imidazole
SDS Natriumdodecylsulfat
SP Single Peptid
SSSS Staphylococcal scalded skin syndrome
Std. Stunde
Tab. Tabelle

7 Anhang

TEMED Tetramethylethyldiamin
Tris Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TP Tandem Peptid
Trp Tryptophan
U Units
uPA Plasminogen-Aktivator vom Urokinase-Typ
uPAR Plasminogen-Aktivator-Rezeptor vom Urokinase-Typ
V Volt
W Watt
z.B. zum Beispiel
zVAD Benzyloxycarbonyl-Valin-Alanin-Aspartat-Fluoromethylketon

7.2 Tabellenverzeichnis

2.1 Testreagenzien	37
2.2 Primärantikörper	38
2.3 Sekundärantikörper	38
2.4 Geräte	48
2.5 Software	49
2.6 Verbrauchsmaterialien	49
2.7 Chemikalien	50

7.3 Abbildungsverzeichnis

1.1	Aufbau eines Desmosoms	4
1.2	Expressionsmuster desmosomaler Cadherine	6
1.3	Klinisches Bild des Pemphigus vulgaris	10
1.4	Klinisches Bild des Pemphigus foliaceus	11
1.5	Histologie von Pemphigus vulgaris und foliaceus	12
2.1	Funktionsprinzip der Laserpinzette	45
2.2	Funktionsprinzip des Dissoziationsversuchs	47
3.1	Reduktion der Zellkohäsion durch PV-IgG	54
3.2	Abnahme der Dsg3-vermittelten Adhäsion durch PV-IgG	55
3.3	Zeitverlauf der PV-IgG-vermittelten Reorganisation von Dsg3	56
3.4	Depletion von nicht-zytoskelettgebundenem Dsg3 durch PV-IgG	57
3.5	Aktivierung von p38MAPK durch PV-IgG	58
3.6	Protektiver Effekt der p38MAPK-Inhibition auf die PV-IgG-vermittelte Zelldissoziation und den Dsg3-Adhäsionsverlust	59
3.7	Auswirkungen der EGFR-Inhibition auf die PV-IgG-vermittelte Zelldissoziation und den Dsg3-Adhäsionsverlust	60
3.8	Auswirkungen der Apoptose-Inhibition auf die PV-IgG-vermittelte Zelldissoziation und den Dsg3-Adhäsionsverlust	61
3.9	Dsg3-Reorganisation durch Destabilisierung des Aktin-Zytoskeletts	62
3.10	Reduktion der PV-IgG-bedingten Dsg3-Reorganisation durch Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts	64
3.11	Verhinderung des PV-IgG-bedingten Dsg3-Haftungsverlustes durch Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts	65
3.12	Reduktion des durch F-Aktin-Modulation ausgelösten Adhäsionsverlusts der Keratinozyten mittels Inhibition von p38MAPK	65
3.13	Depletion von Dsg3 in geringer differenzierten Zellen	67
3.14	Einfluss der Signalwege auf die PV-IgG-vermittelte Dissoziation von geringer differenzierten Keratinozyten	68
3.15	Zeitverlauf der Zelldissoziation unter AK23 und SP	70
3.16	Abnahme der Dsg3-vermittelten Adhäsion unter AK23 und SP	71
3.17	Depletion von nicht-zytoskelettgebundenem Dsg3 durch AK23	72
3.18	Aktivierung von p38MAPK durch AK23 und SP nach 30 Min.	73

7 Anhang

3.19	Reduktion der PV-IgG- und AK23-induzierten Zelldissoziation durch TP	74
3.20	Verminderung der Antikörper-vermittelten Phosphorylierung von p38MAPK durch TP	75

7.4 Publikationsverzeichnis

7.4.1 Originalarbeiten

Eva Hartlieb, Bettina Kempf, Miriam Partilla, Balázs Vigh, Volker Spindler, and Jens Waschke. Desmoglein 2 is less important than desmoglein 3 for keratinocyte cohesion. *PLOS One*, 8(1): e53739, 2013

Volker Spindler, Vera Rötzer, Carina Dehner, Bettina Kempf, Martin Gliem, Mariya Radeva, Eva Hartlieb, Gregory S. Harms, Enno Schmidt, and Jens Waschke. Peptide-mediated desmoglein 3 crosslinking prevents pemphigus vulgaris autoantibody-induced skin blistering. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(2):800–811, 2013

7.4.2 Kongressbeitrag

Bettina Kempf, Volker Spindler, and Jens Waschke. Initial loss of cell adhesion in pemphigus vulgaris does not require depletion of desmoglein 3. *105th Annual Meeting of the Anatomische Gesellschaft*, Hamburg, Germany, 26.-29.03.2010

Poster

Danksagung

Allen voran möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Jens Waschke für die Bereitstellung des Themas bedanken. Gemeinsam mit Herrn Prof. Dr. med. Volker Spindler hat er mein Interesse an diesem Forschungsgebiet geweckt und mich bei der Planung und Durchführung der Laborarbeit stets motiviert und unterstützt. Insbesondere bin ich sehr dankbar für die mir entgegen gebrachte außergewöhnliche Geduld und dafür, dass Prof. Waschke und Prof. Spindler auch nach Schreibpausen und Verzögerungen noch an die Fertigstellung meiner Dissertation geglaubt haben! Herrn Prof. Dr. med. Süleyman Ergün danke ich vielmals dafür, dass er sich meiner Dissertation angenommen und mir deren Einreichung ermöglicht hat!

Ebenfalls großer Dank gebührt den Mitarbeitern des Anatomischen Instituts der Universität Würzburg, darunter besonders Lisa Berberich, die mir nahezu alles beigebracht hat, was ich über die Methoden und die Laborarbeit wissen musste. Herzlichen Dank auch an Nadja Niedermeier und Veronika Heimbach, die mir stets mit einem offenen Ohr und oft mit Lösungen für die alltäglichen Laborprobleme beistanden. Daneben danke ich Saskia Roth für die Unterstützung im Labor und die angenehmen Stunden beim gemeinsamen Fotografieren der Immunfluoreszenzen.

Mein Dank gilt ebenso Anett Diker, sowie den anderen Doktoranden, namentlich Franziska Vielmuth, Eva Arnold, Alexander Endlich, Martin Gliem, Rhea Leweke und Dominik Peter, mit denen ich manche gute Zeit verbringen durfte, sei es im Institut oder außerhalb. Vielen Dank für eure Unterstützung und das schöne Gefühl, in einer Gemeinschaft arbeiten zu dürfen!

Große Dankbarkeit hege ich darüber hinaus für meine Eltern, weil sie mir diese Promotion ermöglicht haben. Sie beide haben mein Medizinstudium finanziert und ohne zu zögern zugestimmt, als ich für die Laborarbeit ein zusätzliches Semester einschieben wollte. Auch meinen Geschwistern, Freundinnen und Freunden danke ich für die Motivation und moralische Unterstützung!

Schließlich möchte ich mich ganz besonders bei meinem Mann Martin bedanken, der während des langen Zeitraums, den diese Promotion beansprucht hat, immer hinter mir stand und mich unterstützt hat. Er hat mich durch alle Höhen und Tiefen des Projektes begleitet und war jederzeit für mich da. Vor allem aber hat er nie den Glauben daran verloren, dass ich die Promotion schlussendlich erfolgreich abschließen würde. Dafür bin ich ihm unbeschreiblich dankbar!