



Bedeutung von Desmoglein 2 und Desmoglein 3 für die interzelluläre
Adhäsion in Keratinozyten

Importance of desmoglein 2 and desmoglein 3 for intercellular adhesion
in keratinocytes

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Eva Arnold

aus

Würzburg

München, 2014



Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Müller

1. Betreuer: Prof. Dr. med. Jens Waschke

2. Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Harald Wajant

3. Betreuer: Prof. Dr. med. Volker Spindler

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Für Mama, Papa und Michi

Für Sebastian und unsere Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Aufbau und Funktion der Epidermis	1
1.2. Zell-Zell-Kontakte der Keratinozyten.....	3
1.2.1. Verschlusskontakte	3
1.2.2. Kommunikationskontakte	4
1.2.3. Adhäsionskontakte	4
1.2.3.1. Adhärenskontakte	5
1.2.3.2. Desmosomen.....	5
1.3. Einzelne desmosomale Cadherine und ihre gewebespezifischen Funktionen	7
1.3.1. Desmoglein 2.....	8
1.3.2. Desmoglein 3	10
1.4. Pemphigus	11
1.4.1. Klinik	11
1.4.2. Pathogenesemechanismen	13
1.4.2.1. Direkte Inhibierung der Cadherinbindung und Kompensationstheorie.....	14
1.4.2.2. Desmoglein-abhängige intrazelluläre Signalwege	16
1.5. p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase in der Pemphigus-Pathogenese	18
1.6. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	23
2. Material und Methoden	24
2.1. Material	24
2.1.1. Zelllinien	24
2.1.2. verwendete Antikörper und Mediatoren.....	24
2.1.3. verwendete Chemikalien.....	26
2.1.4. Rezepte.....	29
2.1.5 Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	30
2.2. Methoden.....	32
2.2.1. Kultivierung der Zelllinien.....	32
2.2.2. Einfrieren und Auftauen der Zellen.....	32
2.2.3. Proteinbiochemische Methoden.....	33
2.2.3.1. Anfertigung von Zelllysaten.....	33

2.2.3.2. Proteinmengenbestimmung	33
2.2.3.3. Gelelektrophorese, Western Blot.....	34
2.2.4. Immunfluoreszenzfärbung	34
2.2.4.1. Kulturzellen.....	35
2.2.4.2. Gewebeproben.....	35
2.2.5. Rasterelektronenmikroskopie	36
2.2.6. Transmissionselektronenmikroskopie.....	36
2.2.7. Aufreinigung rekombinanter Proteine	37
2.2.8. Transfektionen mit siRNA.....	38
2.2.9. Dispase-basierter Dissoziationsversuch	39
2.2.10. Triton-vermittelte Zellfraktionierung.....	39
2.2.11. Immunpräzipitation.....	40
2.2.12. Transgenes Dsg3-Mausmodell	41
2.2.12.1. DNA-Isolierung	41
2.2.12.2. Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion.....	41
2.2.12.3. Gewebeentnahme und -untersuchung	42
2.2.12.4. Präparation muriner primärer Keratinozyten	43
2.2.12.5. RNA-Isolierung und Präparation der komplementären DNA.....	43
2.2.12.6. Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion	44
2.2.13. Grafische Darstellung und statistische Auswertung der Datensätze	45
3. Ergebnisse.....	46
3.1. Dsg2 und Dsg3 zeigen eine spezifische Expression in humanen Hautproben	46
3.2. Dsg2 und Dsg3 sind unterschiedlich an der Zellmembran von Keratinozyten lokalisiert.....	47
3.3. Die durch Antikörper gestörte Haftung von Dsg2 führt im Gegensatz zu Dsg3 nicht zu einem Adhäsionsverlust	52
3.4. siRNA-induzierte Depletion von Dsg2 resultiert nur unter erhöhter mechanischer Belastung in einem Adhäsionsverlust	57
3.5. siRNA-induzierte Depletion von Dsg2 führt zu einer Reduzierung der Dsg3-Proteinmenge.....	59
3.6. Die Störung der Dsg3-Haftung induziert einen p38MAPK-abhängigen Haftungsverlust in Dsg2-depletierten Keratinozyten	60
3.7. Dsg3-Depletion verstärkt die Membranlokalisierung von Dsg2 in Keratinozyten	62
3.8. Charakterisierung und Genotypisierung des transgenen Dsg3-Mausmodells.....	63
3.9. Die PG-Proteinmenge ist in Dsg3 ^{-/-} -Keratinozyten reduziert	64

3.10. Primäre Dsg3 ^{-/-} -Keratinocyten zeigen eine verstärkte Dsg2-Membranlokalisation und DSG2-mRNA-Expression	65
3.11. Dsg2 reguliert im Gegensatz zu Dsg3 nicht die Aktivität der p38MAPK	66
3.12. Dsg3-Defizienz führt zu einer Lokalisationsänderung der phospho-p38MAPK in murinen Keratinocyten	72
4. Diskussion	73
4.1. Dsg2 und Dsg3 unterscheiden sich in ihrer Funktion als Haftproteine und Rezeptoren in Keratinocyten	74
4.2. Die Funktion von Dsg2 als Haftprotein ist gewebespezifisch	76
4.3. Dsg3 stabilisiert die Zellhaftung in Keratinocyten über p38MAPK-abhängige Signalwege	77
4.4. Mögliche Dsg2-vermittelte intrazelluläre Signalwege in Keratinocyten	79
5. Ausblick	82
5.1. Untersuchungen zur Lokalisation von Dsg2 und p-p38MAPK in Hautproben von PV-Patienten	82
5.2. Aufarbeitung von Hautbiopsien der Dsg3-defizienten Mäuse im Hinblick auf eine p38MAPK-Aktivierung	83
Zusammenfassung	84
Summary	86
Eidesstattliche Erklärung	88
Affidavit	89
Literaturverzeichnis	90
Abkürzungsverzeichnis	101
Abbildungsverzeichnis	104
Tabellenverzeichnis	105
Danksagungen	106
Publikationsverzeichnis	108
Lebenslauf	110

1. Einleitung

1.1. Aufbau und Funktion der Epidermis

Als Epidermis bezeichnet man den aus Epithelgewebe aufgebauten Abschnitt der Haut (Kutis) und grenzt diese Zellschicht vom bindegewebigen Anteil, der Dermis, ab (Benninghoff und Drenckhahn, 2008; Lüllmann-Rauch, 2012; Welsch, 2010). Letztere besteht überwiegend aus Kollagenfasern und elastischen Fasern. Das Epithelgewebe wird als mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel charakterisiert. In der Epidermis sind vier Zellarten zu finden: Keratinozyten als vorherrschender Zelltyp zur Barrierebildung, Melanozyten, die Pigmente bilden, Langerhans-Zellen als Zellen des Immunsystems und Merkel-Zellen, die dem Tastsinn dienen. Trotz ihrer wichtigen Funktionen stellen die drei letztgenannten Zellarten mengenmäßig nur etwa 10% der Zellpopulation in der Epidermis dar. Keratinozyten sind in allen vier Zellschichten zu finden, aus denen die Epidermis aufgebaut ist. Die direkt an die Basallamina und die darunter liegende Dermis angrenzende Schicht ist das Stratum basale. Es besteht aus einer einzelnen Lage prismatischer, mitotisch aktiver Keratinozyten sowie Gruppen von epidermalen Stammzellen. Die anschließenden, zwei- bis fünfzähligen Schichten polygonaler Zellen werden als Stratum spinosum bezeichnet. Im Stratum basale und spinosum findet die Zellteilung der Keratinozyten statt (Welsch, 2010). Davon sind weiter apikal ca. drei Lagen Keratohyalingranula-enthaltende platte Zellen als Stratum granulosum abzugrenzen. Die Keratinozyten des Stratum granulosum produzieren verschiedene Lipide, die notwendig sind, um die Interzellularspalten der untersten Schicht des nachfolgenden Stratum corneum abzudichten. Somit wird die Kutis u.a. vor Wasserverlust geschützt und das Eindringen hydrophiler Substanzen eingedämmt. Die am weitesten oberflächlich gelegene Schicht der Epidermis wird als Stratum corneum bezeichnet und besteht aus polygonalen Plättchen toter Epithelzellen, die weder Zellkern noch Organellen enthalten und 25 - 100 Lagen bilden können. Jeder im Stratum basale neu gebildete Keratinozyt durchläuft in einem Zeitraum von vier Wochen alle Schichten der Epidermis, bis er letztendlich als Hornzelle im Stratum corneum durch mechanische Einflüsse einzeln abgeschilfert wird. Während dieses epidermalen Differenzierungsvorganges mit abschließendem Verhornungsprozess ändern sich die Expressionsmuster verschiedenster Proteine. Zum einen werden Proteine neu synthetisiert, wie das Profilaggrin, das im Stratum granulosum eine Keratinfilamentaggregation verursacht und schließlich im Stratum corneum als Filaggrin die Bildung von Keratin aus der vollständigen Aggregation von Filamenten hervorruft (Lüllmann-Rauch, 2012).

Neben diesen Syntheseprodukten lässt sich während der verschiedenen Differenzierungsstadien auch eine Modifikation in der Zusammensetzung der Zell-Zell-Kontakte zwischen den einzelnen Keratinozyten erkennen, die unter 1.2. näher beschrieben wird. Verschiedene Systeme von Strukturproteinen im Zytoplasma gewährleisten u.a. die Aufrechterhaltung der Zellform und die Stabilisierung der Zellmembran (Benninghoff und Drenckhahn, 2008). Mikrotubuli, Intermediärfilamente und Aktinfilamente können aufgrund des Durchmessers der jeweiligen Proteinfasern voneinander unterschieden werden. Keratine (auch Zytokeratine; engl. CK) gehören zur Gruppe der Intermediärfilamente, die einen Durchmesser von 8-10 nm aufweisen und in den Keratinozyten der Epidermis am Verhornungsprozess beteiligt sind (Benninghoff und Drenckhahn, 2008). Der Keratintyp ändert sich dabei schichtspezifisch (Welsch, 2010). In den basalen Zellen sind die Keratine K5 und K14 zu finden. Die Keratinozyten der weiter apikal liegenden Schichten exprimieren hingegen die Keratine K1 und K10.

Als ca. 2 m²-großes Kontaktorgan zwischen dem menschlichen Körper und der Umwelt erfüllt die Kutis, und somit auch die Epidermis als äußerste Gewebeschicht, lebenswichtige Funktionen (Lüllmann-Rauch, 2012; Welsch, 2010). Der oben beschriebene Verhornungsprozess der Keratinozyten stellt die Grundvoraussetzung zur Erfüllung dieser Funktionen dar (Proksch et al., 2008). Zum einen schützt das chemisch widerstandsfähige Keratin gegen azide Stoffe und zum anderen gewährleistet das Stratum corneum eine Diffusionsbarriere, durch die ein transepidermaler Wasseraustritt und das Eindringen hydrophiler Verbindungen eingeschränkt wird. Dazu dienen polare Lipide, die von vitalen Keratinozyten sezerniert werden und die Interzellularspalten im Stratum corneum versiegeln. Eine weitere wichtige Rolle für die Integrität und Barrierefunktion der Epidermis spielen die durch spezielle Zellverbindungen vermittelten Zell-Zell-Kontakte zwischen den Keratinozyten (Benninghoff und Drenckhahn, 2008; Kirschner und Brandner, 2012). Neben den Funktionen der durch Sonnenlicht induzierten Vitamin D₃-Bildung, der immunologischen Überwachung, der Sinneswahrnehmung, Temperaturregulation und Absorption schädlicher Strahlung gewährleistet die Kutis somit einen Schutz vor mechanischen und chemisch-toxischen Schädigungen und verhindert einen Wasserverlust des Organismus (Lüllmann-Rauch, 2012; Welsch, 2010). Der Großteil der menschlichen Haut ist behaart. Haare sind epidermale Gebilde, die aus dem aus der Haut herausragenden Haarschaft und dem Haarfollikel bestehen. Der Haarschaft besteht aus verhorntem Keratin und der Haarfollikel stellt eine schlauchförmige Einstülpung der Epidermis dar. Hier befinden sich, ebenso wie im Stratum basale der übrigen Epidermis, mitotisch aktive Matrixzellen, die zu Hornzellen differenzieren und den Haarschaft bilden. Der Haarfollikel lässt sich in die Haarzwiebel (Haarbulbus), die innere und äußere Haarwurzelscheide untergliedern. Die äußere

Haarwurzelscheide entspricht dabei der Einsenkung der Epidermis und somit lässt sich im oberen Anteil des Haarfollikels bis zur Einmündung der Talgdrüsen die gleiche Unterteilung in die Zellschichten Stratum basale, spinosum, granulosum und corneum erkennen. Unterhalb der Einmündung der Talgdrüsen kommt kein Stratum granulosum und corneum vor. Der Haarfollikel dient der Verankerung der Haare.

1.2. Zell-Zell-Kontakte der Keratinozyten

Zwischen den Keratinozyten der Epidermis sind verschiedene Arten von Zell-Zell-Kontakten ausgebildet (Benninghoff und Drenckhahn, 2008; Lüllmann-Rauch, 2012; Welsch, 2010). Diese sorgen einerseits für eine mechanische Stabilität innerhalb des Gewebes und die Gewährleistung der Barrierefunktion, andererseits werden sie auch als Rezeptoren für die Signaltransduktion zwischen den Zellen diskutiert. Aufgrund ihrer Funktion können drei Typen von Zell-Zell-Kontakten unterschieden werden: (1) Verschlusskontakte sorgen für die Gewährleistung der Barrierefunktion in Epithelien, (2) Kommunikationskontakte ermöglichen den Signalaustausch und die metabolische Kopplung zwischen den Intrazellularräumen benachbarter Zellen, (3) Adhäsionskontakte dienen der Verankerung der Zellen mit der jeweiligen Nachbarzelle. Zu dieser Gruppe gehören die Adhärenskontakte und die Desmosomen.

1.2.1. Verschlusskontakte

Die Funktion dieser Zell-Zell-Kontakte ist die Versiegelung des Interzellularraums (Benninghoff und Drenckhahn, 2008; Lüllmann-Rauch, 2012; Welsch, 2010). Somit sind sie notwendig für die Aufrechterhaltung der Diffusionsbarriere der Epidermis. Neben den Lipidverschlüssen im Stratum corneum sind die wichtigsten Verschlusskontakte die Zonulae occludentes (Tight junctions) im Stratum granulosum der Epidermis (Brandner et al., 2006). Den Zonulae occludentes kommt besonders in einfachen Epithelien und den Endothelien eine große Bedeutung zu, da sie hier wichtige Regulatoren des parazellulären Transportweges zwischen benachbarten Zellen sind. Diese Barrierefunktion erfüllen sie auch in der Epidermis. Hier sorgen die Transmembranproteine Claudin 1, 4, und 7, Occludin sowie das sog. junctionale Adhäsionsprotein (JAM) durch interzelluläre Interaktionen für eine Abdichtung des Raumes zwischen den Keratinozyten und damit einer Sperrung

des parazellulären Diffusionsweges. Auf der zytoplasmatischen Seite sind diesen Haftstrukturen in der Epidermis u.a. Cingulin, Zonula-occludens-(ZO)-Proteine und Aktin angelagert. Die verschiedenen transmembranen Proteine der Zonulae occludentes sind meist nur an den Zellgrenzen der Keratinozyten im Stratum granulosum kontinuierlich nachzuweisen (Brandner et al., 2006; Kirschner et al., 2010). Claudin 1 und Occludin sind außerdem am Haarfollikel zu finden (Brandner et al., 2006). Dies weist darauf hin, dass sich das System dieser Zell-Zell-Kontakte von der Epidermis bis in die Hautanhangsgebilde erstreckt, um die Barrierefunktion zu gewährleisten.

1.2.2. Kommunikationskontakte

Kommunikationskontakte (Gap junctions oder Nexus) kommen in vielen Geweben vor und dienen sowohl der chemischen als auch der elektrischen Kopplung benachbarter Zellen (Welsch, 2010). Um dies zu gewährleisten, stehen zwei benachbarte Zellen durch sog. Connexone in Kontakt, die einen hydrophilen Kanal zwischen den beiden Zellen ausbilden. Die einzelnen Connexone sind aus den Transmembranproteinen der Connexin (Cx)-Familie aufgebaut (Martin et al., 2014). Durch die so gebildeten Kanäle kann durch verschiedene Stimuli der Austausch von Ionen, kleinen Metaboliten und Molekülen, die kleiner als 1 kDa sind, gewährleistet werden. In humaner adulter Epidermis können verschiedene Connexine nachgewiesen werden, deren Expression im Laufe der Differenzierung der Keratinozyten deutlich zunimmt (Winterhager, 2005). In den Keratinozyten des Stratum basale ist überwiegend Cx43 zu finden (Martin et al., 2014). Die höchste Konzentration an Connexinen wird im Stratum spinosum und granulosum erreicht.

1.2.3. Adhäsionskontakte

In der Gruppe der sog. Adhäsionskontakte lassen sich die Adhärenskontakte von den Desmosomen unterscheiden (Benninghoff und Drenckhahn, 2008). Adhäsionskontakte dienen der mechanischen Kopplung benachbarter Zellen und sind notwendig, um die Integrität von Geweben zu gewährleisten, die einer hohen mechanischen Beanspruchung unterliegen.

1.2.3.1. Adhärenskontakte

Adhärenskontakte sind eine Gruppe der Adhäsionskontakte, die im gesamten Organismus vorkommen. Aufgrund ihrer Form lassen sich sog. Adhärensgrütel (Zonulae adherentes) und sog. Adhärensplatten bzw. -streifen (Fasciae adherentes) unterscheiden (Benninghoff und Drenckhahn, 2008). Letztere sind in den Glanzstreifen der Herzmuskelzellen zu finden und stellen hier eine flächenhafte Kontaktzone dar. Adhärenskontakte sind aus den sog. klassischen Cadherinen sowie intrazellulär aus den Plaque-Proteinen α -, β -, γ - und p120-Catenin, α -Actinin und Vinculin aufgebaut. Die klassischen Cadherine weisen ein gewebespezifisches Expressionsmuster auf. Während in Epithelien E-Cadherin-Dimere den Zell-Zell-Kontakt vermitteln, findet sich in den Adhärenskontakten des Nervengewebes, in der Augenlinse, in Skelett- und Herzmuskelzellen N-Cadherin. Im Gefäßendothel wird VE-Cadherin exprimiert und in der Plazenta P-Cadherin. Allen Adhärenskontakten ist gemeinsam, dass im Zytoplasma Aktinfilamente an diesen Haftstrukturen verankert sind. Dieses Kriterium grenzt nach bisherigem Wissensstand die Adhärenskontakte von der zweiten großen Gruppe der Adhäsionskontakte, den Desmosomen, ab (Benninghoff und Drenckhahn, 2008; Lüllmann-Rauch, 2012; Welsch, 2010).

1.2.3.2. Desmosomen

Auch die Desmosomen (Maculae adherentes) gehören zur Gruppe der Adhäsionskontakte (Lüllmann-Rauch, 2012). Beide Haftstrukturen besitzen intrazellulär eine Zytoplasmaverdichtung (Plaque). Im Unterschied zu den Adhärenskontakten inserieren bei den Desmosomen jedoch keine Aktinfilamente, sondern Intermediärfilamente. Aktinfilamente und Intermediärfilamente stellen zusammen mit den Mikrotubuli die Baueinheiten des Zytoskeletts der Epithelzellen dar. Die Intermediärfilamente, die in der Epidermis an Desmosomen inserieren sind die Keratine. Die Transmembranproteine, die im Extrazellulärraum den Kontakt zur Nachbarzelle vermitteln, gehören zur Superfamilie der Cadherine (Abb. 1) (Waschke, 2008). Hierzu gehören die verschiedenen Isoformen der Desmogleine (Desmoglein (Dsg) 1-4) und der Desmocolline (Desmocollin (Dsc) 1-3). Dsgs und Dscs sind Calcium (Ca^{2+})-abhängige Adhäsionsproteine, die neben ihrer Expression in Desmosomen auch außerhalb dieser Haftstrukturen an der Zellmembran vorkommen (Waschke und Spindler, 2014). Desmosomale Cadherine durchdringen die Zellmembran und sind aus einer extrazellulären, N-terminalen, und einer intrazellulären, C-terminalen Domäne aufgebaut (Garrod und Chidgey, 2008; Getsios et al., 2004b; Green und Gaudry, 2000; Waschke, 2008). Die N-terminalen

Domänen verschiedener desmosomaler Cadherine benachbarter Zellen können in Anwesenheit von Ca^{2+} in cis- bzw. trans-Stellung miteinander interagieren und somit die Haftung zwischen den Zellen gewährleisten. Der aus der Zellmembran herausragende Anteil aller desmosomaler Cadherine setzt sich aus vier hoch konservierten extrazellulären Domänen (EC1-4) zusammen. Diesen schließen sich eine variabelere extrazelluläre Verankerungsdomäne, eine transmembrane Domäne und eine intrazelluläre Verankerungsdomäne an. Die in das Zellinnere ragenden zytoplasmatischen Domänen stellen die Verbindung zu den Armadillo-Proteinen Plakoglobin (PG) und den Plakophilinen (Pkp 1-3) her. Diese sind über Desmoplakin (DP) mit den Intermediärfilamenten des Zytoskeletts der Zelle verbunden. DP, PG und Pkp bilden eine dichte Plaque unter der Membran, die in elektronenmikroskopischen Aufnahmen identifiziert werden kann. Die EC1-Domäne ist an der Vermittlung der Ca^{2+} -abhängigen Interaktion zweier desmosomaler Cadherine beteiligt. Für die desmosomalen Cadherine Dsg1, Dsg2, Dsg3, Dsc2 und Dsc3 ist eine homophile Bindungsweise, d.h. die Bindung zwischen einer Isoform mit der homologen Isoform der Nachbarzelle, beschrieben (Heupel et al., 2008; Lowndes et al., 2014; Nie et al., 2011; Spindler et al., 2009). Interessanterweise wurde jedoch in einigen Studien für die Bindungspartner Dsg1 und Dsc3 (Spindler et al., 2009), Dsc2 und Dsg2 (Syed et al., 2002) und Dsc2 und Dsg1 (Marcozzi et al., 1998) eine heterophile Bindungsweise nachgewiesen.

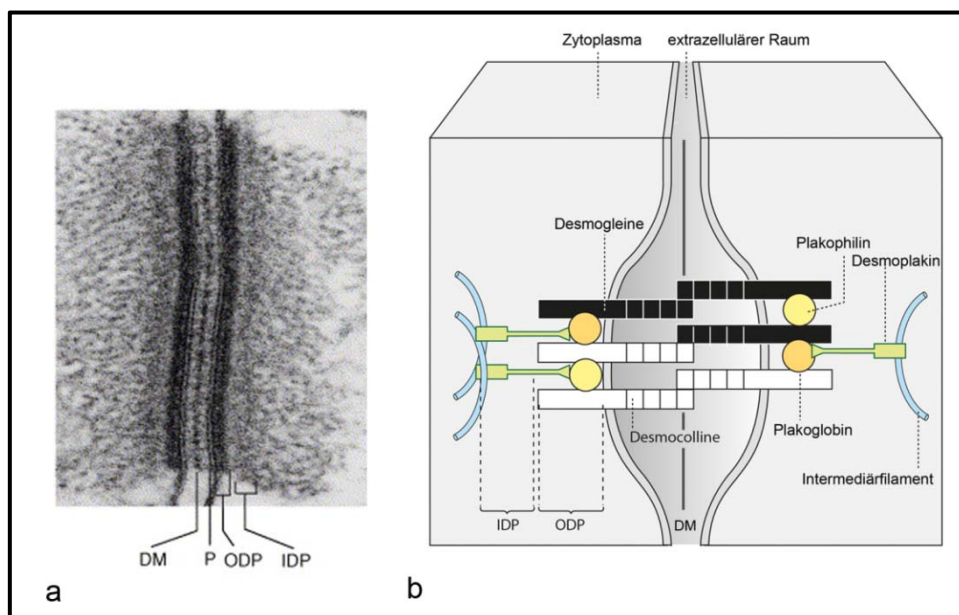


Abbildung 1: Aufbau eines Desmosoms

(a) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Desmosoms einer Rinderzunge. DM: engl. dense midline = dichte Mittellinie; P: engl. plasma membrane = Plasmamembran; ODP: engl. outer dense plaque = äußere dichte Plaque; IDP: engl. inner dense plaque = innere dichte Plaque [modifiziert nach (Yin und Green, 2004)] (b) Schematische Darstellung eines Desmosoms [modifiziert nach (Spindler und Waschke, 2011)]

1.3. Einzelne desmosomale Cadherine und ihre gewebespezifischen Funktionen

Das unterschiedliche Expressionsmuster desmosomaler Cadherine in verschiedenen Gewebetypen legt nahe, dass die einzelnen Mitglieder dieser Proteinfamilie verschiedene Aufgaben erfüllen. In allen einschichtigen Epithelien sowie zwischen Herzmuskelzellen werden nur Dsg2 und Dsc2 exprimiert (Waschke, 2008). Dagegen ist das einzige Gewebe, in dem bisher alle Isoformen der desmosomalen Cadherine identifiziert wurden, die Epidermis. Jedoch sind auch hier die einzelnen Transmembranproteine nicht in allen Epidermisschichten in gleicher Verteilung nachweisbar (Abb. 2). In der folgenden Abbildung ist das Verteilungsmuster der jeweiligen desmosomalen Komponenten zwischen den Epidermisschichten dargestellt.

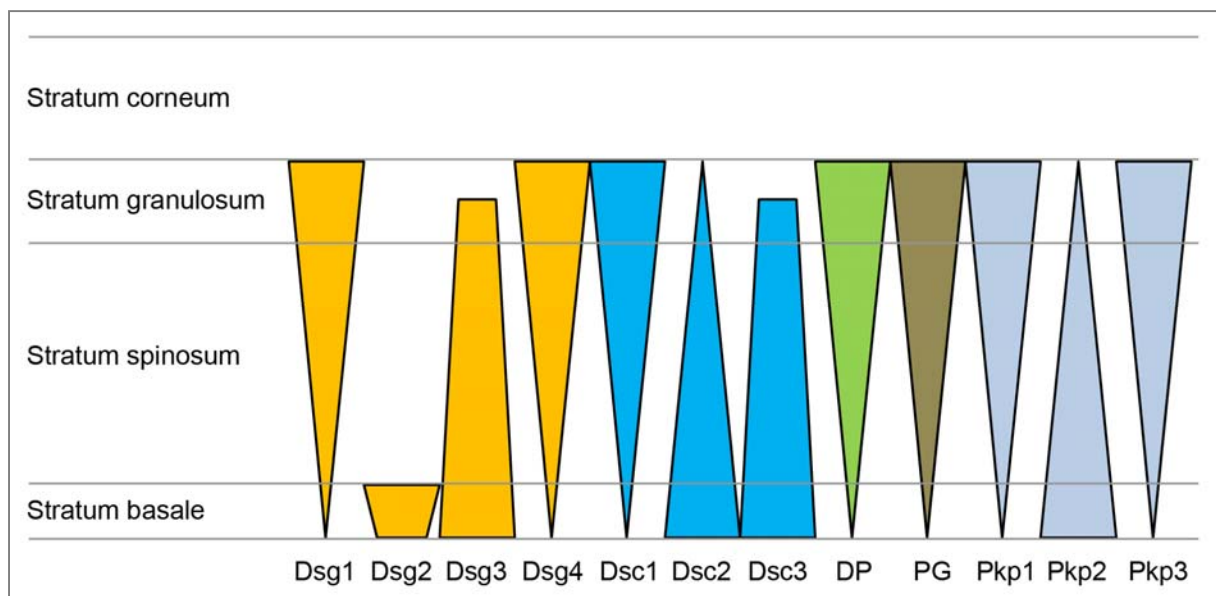


Abbildung 2: Expressionsmuster der einzelnen desmosomalen Komponenten im mehrschichtigen verhornten Plattenepithel humaner Epidermis

Dsg = Desmoglein; Dsc = Desmocollin; DP = Desmoplakin; PG = Plakoglobin; Pkp = Plakophilin
[modifiziert nach (Waschke, 2008)]

Es ist jedoch bis heute unklar, welche Rolle die einzelnen Isoformen für die Zellhaftung und auch für die Signaltransduktion im Einzelnen spielen und in wie weit sich ihre Funktionen dabei unterscheiden. Dsg1 ist z.B. notwendig zur Unterdrückung des EGFR-Erk1/2-Signalweges während der Keratinozyten Differenzierung (Getsios et al., 2009). Dies geschieht möglicherweise durch eine Interaktion mit Erbin, einem Erk-Regulator (Harmon et al., 2013). Zudem kommt Dsg1, im Gegensatz

zu Dsg3, womöglich eine besondere Bedeutung für die Regulierung der Desmosomenanzahl und -größe in humaner Epidermis zu (van der Wier et al., 2012; van der Wier et al., 2014). In einer aktuellen Studie wurde gezeigt, dass Dsg1 außerdem relevant ist zur Regulierung der Expression weiterer Differenzierungsmarker, wie Dsc1, Keratin 1 und Keratin 10 nach einer Belastung der Keratinozyten mit UVB-Strahlen und nachfolgender Regeneration der Epidermis (Johnson et al., 2014). Weiterhin wird ein ausgewogenes Expressionsverhältnis von Dsg1 und Dsc1 zur Aufrechterhaltung der Zelladhäsion postuliert (Getsios et al., 2004a). Eine weitere Funktion von Dsg1 wird in der sog. Kompensationstheorie postuliert (vgl. 1.4.2.1.), wonach Dsg1 in der Lage ist, den Verlust von Dsg3-vermittelten Bindungen in der Epidermis zu kompensieren. Zur Funktion von Dsc2 wurde berichtet, dass eine Reduzierung der Dsc2-Expression eine Aktivierung des Akt/ β -Catenin-Signalweges induziert und somit die Zellproliferation und das Tumorstadium fördert (Kolegraff et al., 2011). Eine relevante Rolle von Dsc3 für die Zelladhäsion konnte sowohl im Zellkultur-, als auch im Tiermodell nachgewiesen werden (Chen et al., 2008; Spindler et al., 2009). Genau wie Dsg3 scheint Dsc3 eine entscheidende Rolle für Zelladhäsion und die Verankerung von Haaren in der Kutis zu spielen (Chen et al., 2008). Dsg4 ist ausschließlich in differenzierten Keratinozyten und am Haarfollikel nachweisbar, wo für dieses Protein eine regulierende Funktion für den Übergang der Zellen zwischen Proliferation und Differenzierung diskutiert wird (Bazzi et al., 2006; Kljuic et al., 2003). Dieser kurze Einblick mit einigen der bisher beschriebenen Funktionen zu den einzelnen desmosomalen Cadherinen verdeutlicht die funktionelle Heterogenität dieser Proteinfamilie. Im Folgenden werden die Funktionen der beiden desmosomalen Cadherine Dsg2 und Dsg3 genauer beschrieben, da sie im Fokus der vorliegenden Arbeit stehen.

1.3.1. Desmoglein 2

Desmoglein 2 ist die ubiquitäre Isoform der desmosomalen Cadherine (Schäfer et al., 1994). Während das Vorkommen von Dsg1 und Dsg3 auf mehrschichtige Epithelien beschränkt ist, ist Dsg2 das einzige Desmoglein, das auch in einschichtigen Epithelien, dem Myokard und Lymphfollikeln auftritt. Es ist somit in jedem Desmosomen-enthaltenden Gewebe zu finden. Dsg2 stellt außerdem mit einem Molekulargewicht von 160 kDa die größte Isoform dieser Proteinfamilie dar.

Das weit verbreitete Vorkommen von Dsg2 im menschlichen Organismus führte dazu, dass es in den Fokus verschiedenster Studien rückte. Die Letalität von Dsg2-defizienten Mäusen verdeutlicht die Relevanz dieses Proteins in der frühen Embryonalentwicklung (Eshkind et al., 2002). Transgene Mäuse, mit einer herzspezifischen Deletion von Anteilen der extrazellulären Domänen 1 und 2 von

Dsg2 sind zwar lebensfähig, entwickeln aber eine arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC) (Krusche et al., 2011). Der fortschreitende Verlust von Herzmuskelzellen und die Zunahme von Fett- und Bindegewebezellen sind die Kennzeichen der Erkrankung. Bei einigen ARVC-Patienten konnte eine Mutation des Dsg2-Gens nachgewiesen werden (van der Zwaag et al., 2009). Wie in einfachen Epithelien sind Dsg2 und Dsc2 die einzigen desmosomalen Cadherine, die in den Glanzstreifen zwischen Kardiomyozyten identifiziert wurden. Eine aktuelle Studie zeigte außerdem, dass Dsg2 im Herzen von zentraler Bedeutung für die Zell-Zell-Haftung zwischen Kardiomyozyten ist (Schlipp et al., 2014).

Auch im Epithel des menschlichen Darms wird lediglich Dsg2 als einzige Isoform exprimiert (Schäfer et al., 1994; Schäfer et al., 1996). Neben der Relevanz von Dsg2 für die Aufrechterhaltung der Integrität der Barrierefunktion von intestinalen Epithelzellen (Schlegel et al., 2010) wurde in dieser Lokalisation außerdem eine Apoptose-regulierende Funktion von Dsg2 beschrieben (Nava et al., 2007). Die Beteiligung desmosomaler Komponenten im Zusammenhang mit der Entstehung von Tumoren ist Gegenstand aktueller Studien (Chidgey und Dawson, 2007; Kamekura et al., 2013; Kolegraff et al., 2011). Dsg2 spielt hierbei eine zentrale Rolle. Im Gegensatz zu Fibrosarkomen und Melanomen, ist die Proteinexpression von Dsg2 in Karzinomen signifikant erhöht (Brennan und Mahoney, 2009). Auch in einer anderen Studie wird Dsg2, als einziges desmosomales Cadherin, als Tumormarker diskutiert (Kurzen et al., 2003). Ein Zusammenhang zwischen einer veränderten Expression eines desmosomalen Cadherins und der Tumorentstehung könnte durch eine Änderung intrazellulärer Signalwege, u.a. unter dem Einfluss von PG und dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg, oder durch eine reduzierte Zell-Zell-Haftung bestehen (Chidgey und Dawson, 2007).

In der Epidermis ist ein Vorkommen von Dsg2 nur für die basale Zellschicht beschrieben (Mahoney et al., 2006). Allerdings finden sich in der Literatur auch Hinweise darauf, dass sich Dsg2 selbst in dieser Lokalisation nicht zuverlässig nachweisen lässt und dies stark vom verwendeten Primärantikörper abhängt (Brennan und Mahoney, 2009). Im Tiermodell führte eine suprabasale Expression von Dsg2 zu einem hyperproliferativen und Apoptose-resistenten Phänotyp in Keratinozyten (Brennan et al., 2007). Obwohl für Dsg2 eine wichtige Rolle in anderen Geweben, wie dem Darm (Nava et al., 2007; Schlegel et al., 2010) oder dem Herzen (Krusche et al., 2011; Schlipp et al., 2014) identifiziert wurde, ist über die Bedeutung von Dsg2 für die interzelluläre Adhäsion in Keratinozyten wenig bekannt.

1.3.2. Desmoglein 3

Mit der Identifikation von Dsg3 als einem der Autoantigene in der blasenbildenden Hauterkrankung Pemphigus vulgaris (PV) begann die gezielte Erforschung der Funktion dieses Transmembranproteins, das zunächst nur als PV-Antigen bezeichnet wurde (Amagai et al., 1991). In einer Studie aus dem Jahr 1993 wurde mittels Immun-Elektronenmikroskopie nachgewiesen, dass das PV-Antigen in den Desmosomen der Keratinozyten lokalisiert ist. Damit war neben Dsg1 und Dsg2 ein drittes desmosomales Cadherin identifiziert (Karpati et al., 1993). Dsg3 hat eine Molekularmasse von ca. 130 kDa und wird in mehrschichtigen Epithelien exprimiert. In der menschlichen Epidermis kann es im Stratum basale und dem Stratum spinosum nachgewiesen werden (Amagai et al., 1996; Getsios et al., 2004b; Waschke, 2008). Interessanterweise ist das Vorkommen von Dsg3 nicht alleine auf Desmosomen beschränkt, sondern es ist auch außerhalb dieser Haftstrukturen an der Zellmembran der Keratinozyten lokalisiert (Waschke und Spindler, 2014). In zahlreichen Studien wurde belegt, dass Dsg3 eine wichtige Funktion als Haftprotein in der Epidermis einnimmt (Di Zenzo et al., 2012; Heupel et al., 2008; Tsunoda et al., 2003). Außerdem ist es an der Verankerung der Haare im Follikel beteiligt (Hanakawa et al., 2004; Koch et al., 1998). In neueren Studien wurde außerdem eine Beteiligung von Dsg3 als Rezeptor und Regulator verschiedener intrazellulärer Signalwege postuliert, die im Zusammenhang mit der PV-Pathogenese stehen (Spindler et al., 2013; Tsang et al., 2012a; Tsang et al., 2012b; Tsang et al., 2010). Daher werden weitere Dsg3-spezifische Funktionen in Kapitel 1.4.2.2. zu den bei PV relevanten Dsg-abhängigen Signalwegen näher erläutert.

1.4. Pemphigus

1.4.1. Klinik

Pemphigus ist die Bezeichnung für eine seltene Autoimmunerkrankung, die mit einer jährlichen Inzidenz von 0,75 bis 5 Fällen pro eine Million auftritt (Grando, 2012; Schmidt und Zillikens, 2011; Waschke, 2008). In den meisten Fällen wird die Erkrankung bei Patienten im Alter von 40-60 Jahren diagnostiziert und lässt keine geschlechtsspezifische Prävalenz erkennen. Patienten leiden unter Erosionen und Blasenbildungen der Haut bzw. der Schleimhäute (Abb. 3 a-c). Dieser klinische Phänotyp ist verursacht durch eine intraepitheliale Spaltbildung. Diese Spaltbildung dient auch als eines der Kriterien, um die beiden Hauptformen der Erkrankung diagnostisch zu differenzieren. Bei PV tritt die Akantholyse, d.h. der Verlust der Zell-Zell-Kontakte und damit die intraepidermale Spaltbildung, unmittelbar über dem Stratum basale auf (Abb. 3 d) (Waschke, 2008). Im Gegensatz dazu kann die Akantholyse bei Pemphigus foliaceus (PF)-Patienten in der weiter oberflächlich gelegenen Schicht des Stratum granulosum identifiziert werden (Abb. 3 e). Des Weiteren lässt sich ein unterschiedliches Antikörperprofil in den Seren beider Patientengruppen nachweisen. Im Serum eines PF-Patienten können hauptsächlich gegen Dsg1 gerichtete Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 3 h), wohingegen bei PV-Patienten auch Dsg3-spezifische Antikörper zu finden sind (Abb. 3 f und g). Mit einem Anteil von 80-90% ist PV die häufigste Form der Pemphigus-Erkrankung. Es lassen sich zwei PV-Unterformen differenzieren, die meist in zwei aufeinanderfolgenden Krankheitsstadien auftreten. Ist die Blasenbildung anfangs auf Schleimhäute begrenzt (Schleimhaut-dominanter Typ), sind gewöhnlich nur Antikörper gegen Dsg3 zu finden, während im weiteren Krankheitsverlauf Antikörper gegen Dsg1 und Dsg3 nachgewiesen werden können und sowohl Kutis als auch Schleimhäute von der Blasenbildung betroffen sind (mukokutaner Typ). Nicht in allen beschriebenen Fällen korreliert jedoch dieses Antikörperprofil mit dem klinischen Phänotyp (Jamora et al., 2003; Zagorodniuk et al., 2005).

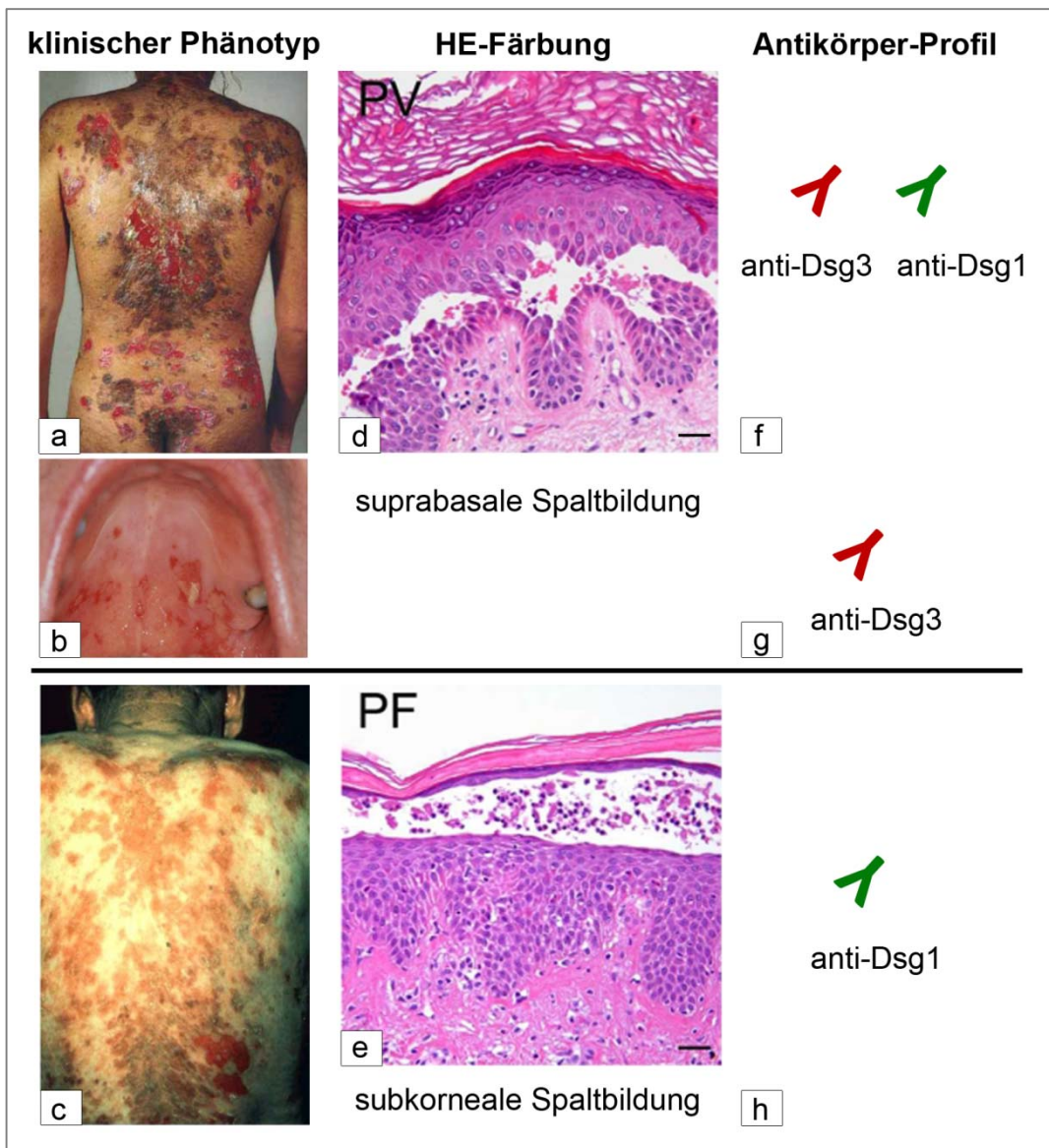


Abbildung 3: Gegenüberstellung von klinischem Phänotyp, HE-Präparat der Epidermis und Antikörperprofil von PV- und PF-Patienten

(a) Rücken eines PV-Patienten mit Blasen und Erosionen (b) entzündete Mundschleimhaut eines PV-Patienten (c) Rücken eines PF-Patienten mit verkrusteten Erosionen (d) HE-Präparat der Epidermis eines PV-Patienten mit basaler Spaltbildung (Maßstabsskala=50µm) (e) HE-Präparat der Epidermis eines PF-Patienten mit Spaltbildung im Stratum granulosum (Maßstabsskala=50µm) (f-h) charakteristisches Antikörperprofil zur Differenzierung zwischen Seren von Patienten mit (f) mukokutanem PV, (g) Schleimhaut-dominatem PV und (h) PF. [modifiziert nach (Waschke, 2008)]

Neben dem Nachweis der Akantholyse mittels HE-Färbung in Hautbiopsien und dem Autoantikörpernachweis mittels ELISA in Patienten-Serum dient eine indirekte Immunfluoreszenzdarstellung vorzugsweise auf Affenösoophagus-Proben zum Nachweis einer Pemphigus-Erkrankung (Schmidt und Zillikens, 2011). Dass die mechanische Stabilität der Haut eines Pemphigus-Patienten nicht nur an Stellen beeinträchtigt ist, an denen Blasen diagnostiziert werden

können, zeigt sich an einem positiven sogenannten Nikolski-Zeichen. Durch mechanischen Scherstress kann eine spontane Spaltbildung an normal erscheinender Haut eines Pemphigus-Patienten induziert werden (Waschke, 2008).

Die derzeit angewendete Therapie beruht auf dem Einsatz von hoch-dosierten Kortikoiden, der Gabe von Immunglobulinen und zytotoxischen Medikamenten (Schmidt und Zillikens, 2011). Zur Entfernung der Autoantikörper werden auch Plasmapheresen durchgeführt. Um die Anzahl an autoantikörperproduzierenden B-Zellen einzudämmen, wird außerdem das Medikament Rituximab eingesetzt. Hierbei handelt es sich um einen Antikörper, der gegen das auf B-Zellen exprimierte Protein CD20 gerichtet ist (Diaz, 2007).

1.4.2. Pathogenesemechanismen

Um langfristig alternative Behandlungsmethoden zur Immunsuppression für Pemphigus-Patienten entwickeln zu können, ist es notwendig, die genauen Pathogenesemechanismen der Erkrankung zu entschlüsseln. Die Erkenntnis, dass die Störung der Haftung desmosomaler Cadherine zwischen benachbarten Keratinozyten zur epidermalen Spaltbildung führt, war Ausgangspunkt für die Entstehung von zwei unterschiedlichen Hypothesen zur Ursache der reduzierten Zell-Zell-Haftung (Waschke, 2008). Zunächst ging man davon aus, dass alleine die direkte Inhibierung der Cadherinbindung zur Blasenbildung führt. Es wurde jedoch in zahlreichen Studien gezeigt, dass auch intrazelluläre Signalwege an der Pemphiguspathogenese beteiligt sind (Spindler und Waschke, 2014; Waschke, 2008; Waschke und Spindler, 2014).

Die Entschlüsselung der Pathogenesemechanismen der Pemphigus-Erkrankung trägt nicht nur dazu bei, effiziente Behandlungsmethoden zu entwickeln, sondern hilft außerdem, das Verständnis der Haftung desmosomaler Cadherine zu erweitern und dieses Wissen von der Epidermis auf andere Gewebe, zum Beispiel das Herz oder den Darm zu übertragen. Pemphigus dient somit als Modellerkrankung und bietet eine Grundlage zur Entwicklung verschiedenster *in vitro*- und *in vivo*-Modellsystemen zur Untersuchung der durch desmosomale Cadherine vermittelten Haftung (Amagai und Stanley, 2012). Die Seren von Pemphigus-Patienten sowie gegen desmosomale Cadherine gerichtete kommerzielle oder aus PV-Mausmodellen generierte Antikörper (Tsunoda et al., 2003) werden daher zur Simulation der Krankheit im Zellkultur-, Gewebe- oder Mausmodell eingesetzt.

1.4.2.1. Direkte Inhibierung der Cadherinbindung und Kompensationstheorie

Nach der Identifizierung desmosomaler Cadherine als Antigene des Pemphigus ging man zunächst davon aus, dass Autoantikörper direkt mit der extrazellulären Domäne der Desmogleine interagieren und dadurch eine trans-Interaktion der Desmogleine benachbarter Zellen behindern könnten (Amagai et al., 1991). Inzwischen wurde mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM) nachgewiesen, dass sowohl ein monoklonaler Dsg3-Antikörper (AK23), als auch aufgereinigte IgG-Fractionen von PV-Patienten die direkte Interaktion zweier isolierter extrazellulärer Domänen von Dsg3 inhibieren können (Heupel et al., 2008; Spindler et al., 2013). AK23 ist ein aus einem PV-Mausmodell gewonnener pathogener Antikörper, der gegen die EC1 von Dsg3 gerichtet ist und bei intradermaler Injektion eine Blasenbildung im Mausmodell induziert (Tsunoda et al., 2003). Antikörper, die gegen andere Bereiche des Dsg3-Proteins gerichtet waren, führten hingegen nicht zu einer Blasenbildung. Autoantikörper, die an extradesmosomale Desmogleine binden, verhindern, dass diese in Desmosomen eingebaut werden können. Diese „fehlerhaften“ Desmosomen führen dann zu einer reduzierten Zelladhäsion zwischen den Keratinozyten (Oktarina et al., 2011).

Die Hypothese, dass alleine die direkte Inhibierung der Cadherinbindung für den Haftungsverlust der Keratinozyten bei Pemphigus-Patienten verantwortlich ist, beeinflusste auch die lange Zeit gängige Erklärung für die unterschiedliche Lokalisation der intraepidermalen Spaltbildung in Hautbiopsien von PF- und PV-Patienten (Waschke, 2008). Diese wird als „Kompensationstheorie“ bezeichnet. Grundlage für diese Theorie ist zunächst das Expressionsmuster von Dsg1 und Dsg3 in der Epidermis. Während Dsg1 vor allem im Stratum spinosum und granulosum zu finden ist, ist die Expression von Dsg3 auf das Stratum basale und spinosum beschränkt. Die Kompensationstheorie beruht auf der Annahme, dass Dsg1 und Dsg3 gegenseitig einen Verlust der Bindungsfähigkeit des jeweiligen anderen desmosomalen Cadherins kompensieren können. Bei PF-Patienten, in deren Serum keine Dsg3-Autoantikörper nachgewiesen werden können, tritt die Spaltbildung daher nur in den apikalen Epidermisschichten auf, also dort, wo kein Dsg3 vorhanden ist. Bei PV-Patienten mit der Schleimhaut-dominanten Form ist die Spaltbildung auf die Schleimhäute beschränkt, da hier die Dsg3-Expression gegenüber der Dsg1-Expression deutlich überwiegt. Zu einer Beteiligung der Epidermis kommt es bei PV-Patienten nur, wenn auch Dsg1-Antikörper im Serum vorhanden sind, denn somit wird sowohl die Dsg1- als auch die Dsg3-vermittelte Bindung blockiert und der kompensatorische Effekt aufgehoben (Waschke, 2008). Dies wurde durch Injektion aufgereinigter Antikörper gegen Dsg1 und Dsg3 im neonatalen Mausmodell etabliert (Mahoney et al., 1999). Bei neugeborenen Kindern von Müttern mit PF-Diagnose wurde keine Blasenbildung nachgewiesen,

obwohl davon ausgegangen werden kann, dass die Autoantikörper über die Plazenta auch den kindlichen Organismus erreichen. In einer Studie von Wu und Kollegen wurde dies damit begründet, dass sich das Expressionsmuster der desmosomalen Cadherine zwischen der neonatalen und der adulten Epidermis unterscheidet (Wu et al., 2000). Im Unterschied zur Epidermis eines Erwachsenen ist Dsg3 in allen Epidermisschichten der neonatalen Haut vorhanden und kann somit auch in den apikalen Zelllagen den Verlust der Dsg1-vermittelten Bindungen kompensieren. Einen weiteren Hinweis zur Kompensationstheorie lieferte eine Studie aus dem Jahr 2002 (Hanakawa et al., 2002). Transgene Mäuse, die kein Dsg3 exprimieren, zeigen einen deutlichen Haarverlust. Dies konnte durch eine Expression von Dsg1 unter Kontrolle des Keratin 14-Promoters verzögert und reduziert werden. Dieser protektive Effekt einer Dsg1-Expression im transgenen Dsg3-Mausmodell wurde durch eine weitere Studie bestätigt. Hier wurde Dsg1 unter Kontrolle eines Keratin 5-Promotors exprimiert, was zu einer ektopischen Expression von Dsg1 in den basalen Epidermisschichten und der Mundschleimhaut führte (Hata et al., 2011). Diese Mäuse zeigten einen reduzierten Gewichtsverlust, was auf das Fehlen von Erosionen in der Mundschleimhaut zurückgeführt wurde. Auch für Dsg2 und Dsg1 wurde eine kompensatorische Funktion im Tiermodell beschrieben (Brennan et al., 2010). Eine kompensatorische Funktion zwischen Dsg2 und Dsg3 ist dagegen bisher nicht bekannt.

Trotz der deutlichen Hinweise für die Richtigkeit der Kompensationstheorie aus *in vivo*-Studien gibt es Untersuchungen, die dieses Prinzip widerlegen. Bei der Interpretation der Ergebnisse aus den Tiermodellstudien muss berücksichtigt werden, dass sich das Expressionsmuster desmosomaler Cadherine zwischen der humanen und der murinen Epidermis unterscheidet und detaillierte Untersuchungen nötig sind, um die Ergebnisse von einer Spezies auf die andere zu übertragen. Immunfluoreszenzuntersuchungen von Hautbiopsien unmittelbar an der Läsion von PV-Patienten zeigen deutlich, dass ober- und unterhalb der intraepidermalen Spalte sowohl Dsg1 als auch Dsg3 vorhanden ist (Waschke, 2008). Da nach der Kompensationstheorie zu erwarten wäre, dass bei Vorhandensein von Dsg1- und 3-Autoantikörpern anstatt einer nur suprabasalen Spaltbildung in allen Schichten der Epidermis ein Haftungsverlust auftreten sollte, wird diese Theorie als alleinige Erklärung des klinischen Phänotyps bei Pemphigus-Patienten angezweifelt (Amagai et al., 2006; Waschke, 2008). Auch in einem *ex vivo*-Hautmodell trat eine sowohl durch PV- als auch PF-IgG induzierte epidermale Spaltbildung in Epidermisschichten auf, in denen mittels Immunfluoreszenzdarstellung sowohl Dsg1 als auch Dsg3 nachgewiesen wurde (Spindler et al., 2007). Auch die direkte Inhibition der Cadherin-Bindung kann nicht zur Begründung der Kompensationstheorie herangezogen werden. Im zellfreien System wurde für Dsg1 in rasterkraftmikroskopischen (AFM)-Studien keine direkte Inhibierung der homophilen Bindung durch

PF-IgGs nachgewiesen. Dennoch verursachten die Autoantikörper der PF-Patienten eine Lückenbildung zwischen den Keratinozyten und eine Loslösung von mit Dsg1-beschichteten Mikroperlen von der Zelloberfläche. Dies deutete an, dass die Blockierung der Dsg1-vermittelten Bindung alleine nicht ausreichend ist, um einen Haftungsverlust zu induzieren, sondern dass zusätzlich zelluläre Vorgänge eine Rolle spielen (Waschke et al., 2005). Ebenso wurde gezeigt, dass die Bindung von PV-IgG alleine nicht für einen Haftungsverlust von Keratinozyten ausreicht (Calkins et al., 2006). Eine Dsg3-Internalisation und eine Retraktion der Keratinfilamente von der Zellmembran sind Ereignisse, die unter dem Einfluss von PV-IgG in den Zellen ablaufen und zu einem Haftungsverlust führen. Erfolgt die Zugabe von PV-IgG allerdings bei einer Temperatur von 4°C, laufen diese intrazellulären Prozesse nicht ab und die Haftung der Keratinozyten wird nicht beeinträchtigt. Erst nach einer weiteren Inkubation der Zellen mit PV-IgG bei 37°C war der Haftungsverlust nachzuweisen. Somit deuten mehrere Studien darauf hin, dass sich die Pemphigus-Pathogenese nicht alleine durch eine direkte Inhibierung der Cadherinbindung erklären lässt, sondern dass hierbei auch andere zelluläre Signalwege von Bedeutung sind. Womöglich lassen sich durch schichtspezifische Unterschiede dieser Signalwege in der Epidermis auch die Unterschiede in den klinischen Bildern der PF- und PV-Patienten erklären, für die die Kompensationstheorie alleine nicht ausreicht (Waschke, 2008).

1.4.2.2. Desmoglein-abhängige intrazelluläre Signalwege

Erste Hinweise, dass auch Signalwege relevant für die Pemphigus-Pathogenese sind, lieferten Arbeiten aus dem Jahr 1995. Die Inkubation einer Keratinozyten-Zelllinie mit PV-IgG induzierte einen Anstieg des sekundären Botenstoffes Inositoltriphosphat und der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Seishima et al., 1995). Durch die Zugabe eines spezifischen Phospholipase C-Inhibitors wurden diese Effekte verhindert und somit auch eine Beteiligung dieses Enzyms an der hier stattfindenden Signaltransduktion nachgewiesen (Esaki et al., 1995).

Ein weiterer wichtiger Hinweis für die Relevanz verschiedener Signalwege sind Studien, in denen pharmakologische Inhibitoren eingesetzt wurden, die in der Lage waren die durch PV-Autoantikörper induzierte spontane Blasenbildung im neonatalen Mausmodell zu verhindern (Mao et al., 2014; Spindler et al., 2013; Spindler et al., 2010). Für diese Untersuchungen werden neugeborenen Mäusen einen Tag nach der Geburt PV-Autoantikörper intradermal injiziert. Nach einer Inkubationszeit von

12-24 Stunden wird die Haut an der Injektionsstelle einem definierten Scherstress ausgesetzt und makroskopisch auf eine spontan auftretende Blasenbildung untersucht. Außerdem werden mit den betreffenden Hautstellen nach dem Töten der Mäuse weitere histologische und proteinbiochemische Untersuchungen durchgeführt, die Rückschlüsse auf die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden in der Epidermis geben können. Pharmakologische Inhibitoren dieser Signalwege werden dazu entweder intradermal injiziert oder topisch appliziert verabreicht. Zu den Signalwegsmolekülen, die im Zuge der Pemphigus-Pathogenese *in vivo* eine Rolle spielen, zählen besonders p38MAPK (Berkowitz et al., 2008; Berkowitz et al., 2006), die Proteinkinase C (PKC) (Spindler et al., 2011) sowie Tyrosinkinasen wie Src und EGFR (Bektas et al., 2013; Saito et al., 2012; Sanchez-Carpintero et al., 2004). Bis heute sind die genauen Mechanismen der Dsg-vermittelten intrazellulären Signalwege und ihre Beteiligung an der Pemphigus-Pathogenese nicht entschlüsselt. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass die Loslösung desmosomaler Komponenten von den Intermediärfilamenten und eine Beeinträchtigung des kontinuierlich stattfindenden Auf- und Abbaus der Desmosomen die zentralen Ereignisse darstellen, die für den Verlust der Zellhaftung verantwortlich sind (Spindler und Waschke, 2014; Waschke und Spindler, 2014).

Die Herausforderung der aktuellen Pemphigus-Forschung besteht darin, die diesen Prozessen vorgeschalteten Signalkaskaden miteinander in Verbindung zu bringen. Aufgrund der Relevanz für die Studien der vorliegenden Arbeit wird im Folgenden der p38MAPK-vermittelte Signalweg näher erläutert.

1.5. p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase in der Pemphigus-Pathogenese

Die p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (p38MAPK) wurde erstmals im Jahr 1994 charakterisiert und der Zusammenhang zwischen der Stress-induzierten Genexpression und der Aktivierung der p38MAPK beschrieben (Lee et al., 1994; Rouse et al., 1994). Bisher sind 4 Isoformen dieser Kinase bekannt, die eine Homologie von 75% aufweisen (Mavropoulos et al., 2013). Die α -Isoform dominiert in Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen und CD4 T-Zellen, wohingegen die β -Isoform hauptsächlich in Endothelzellen zu finden ist. Über die in Myozyten vorkommende γ -Isoform ist, ebenso wie für die δ -Isoform, wenig bekannt (Kumar et al., 2003). Extrazelluläre Stimuli, die den MAP-Kinase-Signalweg induzieren sind z.B. Wachstumsfaktoren oder Stress, der auf die Zellen durch UV-Licht oder einen veränderten osmotischen Druck ausgeübt wird. In *in vitro*-Studien wird häufig das Antibiotikum Anisomycin eingesetzt, um den MAP-Kinase-Signalweg zu aktivieren (Geiger et al., 2005; Spindler et al., 2013). Die eigentliche Kaskade läuft dann intrazellulär in mehreren Phosphorylierungsschritten durch drei hintereinander geschaltete Proteinkinasen ab (Abb. 4) (Kumar et al., 2003). Zunächst werden die sog. MAPKK-Kinasen aktiviert, die dann wiederum zur Phosphorylierung der MAPK-Kinasen führen. Anschließend erfolgt die Aktivierung der MAP-Kinasen. Zu dieser Proteinfamilie zählen die ER (engl. extracellular signal-related kinases)-Kinasen (ERK), die p38MAP-Kinasen und die c-Jun-N-terminalen Kinasen (JNK). Die verschiedenen Isoformen all dieser Kinasen werden durch eine duale Phosphorylierung an den Aminosäuren Threonin und Tyrosin aktiviert. Die p38MAPK wird durch eine Phosphorylierung an Threonin an Position 180 (Thr¹⁸⁰) und Tyrosin an Position 182 (Tyr¹⁸²) durch die MAPKK MAP2K6 aktiviert.

Der Einsatz pharmakologischer Inhibitoren ermöglicht es, Signaltransduktionsmoleküle wie die p38MAPK gezielt auf ihren Wirkmechanismus und ihre Rolle in intrazellulären Signalkaskaden zu untersuchen (Kumar et al., 2003; Mavropoulos et al., 2013). Bei diesen Inhibitoren handelt es sich um Pyridinylimidazolderivate (Frantz et al., 1998). Die Phosphorylierung der p38MAPK an Thr¹⁸⁰ und Tyr¹⁸² induziert eine Zunahme der Affinität von ATP zur p38MAPK im Vergleich zur unphosphorylierten Form der Kinase. Das Prinzip der pharmakologischen Inhibitoren beruht ebenfalls auf ihrer Affinität zur ATP-Bindungstasche am p38MAPK-Protein. Die p38MAPK wird aktiviert, d.h. phosphoryliert, wenn ATP an das Protein bindet. Der Inhibitor konkurriert mit ATP um diese Bindungsstelle und kann somit die Aktivierung der p38MAPK blockieren. Gut charakterisierte und für Studien häufig eingesetzte Inhibitoren sind die beiden zellpermeablen Imidazolderivate SB203580 [4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole] und SB202190 [4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole] (Bogdanos, 2012). SB203580

inhibiert spezifisch die Aktivität der p38MAPK, jedoch nicht die Aktivierung der Kinase selbst durch vorgeschaltete Proteine (Kumar et al., 1999). Das heißt, dass p38MAPK auch in Anwesenheit von SB203580 an Thr¹⁸⁰ und Tyr¹⁸² phosphoryliert werden kann, die weitere Aktivierung der Substrate der p38MAPK durch eine kompetitive Bindung an die ATP-Bindungsstellen der Kinase aber verhindert wird. Gemäß den Herstellerangaben der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) ist SB202190 ein Inhibitor der Aktivität der α - und β -Isoform der p38MAPK. Im Gegensatz zu SB203580 inhibiert SB202190 nicht nur die katalytische Aktivität der phosphorylierten Form der p38MAPK, sondern ist außerdem in der Lage die Phosphorylierung der p38MAPK selbst zu blockieren. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass SB202190 die Phosphorylierung der p38MAPK, die durch das Antibiotikum Anisomycin als einem bekannten Aktivator des MAPK-Signalweges induziert wird, inhibiert (Geiger et al., 2005; Spindler et al., 2013).

Die aktivierten MAPKs führen schließlich zur Aktivierung verschiedener zytosolischer Proteine und Transkriptionsfaktoren, die dann wiederum zelluläre Prozesse, wie den Zellzyklus, das Migrationsvermögen, die Zellproliferation, apoptotische Vorgänge und Änderungen in der Genexpression und der Organisation des Zellzytoskeletts hervorrufen (Kumar et al., 2003).

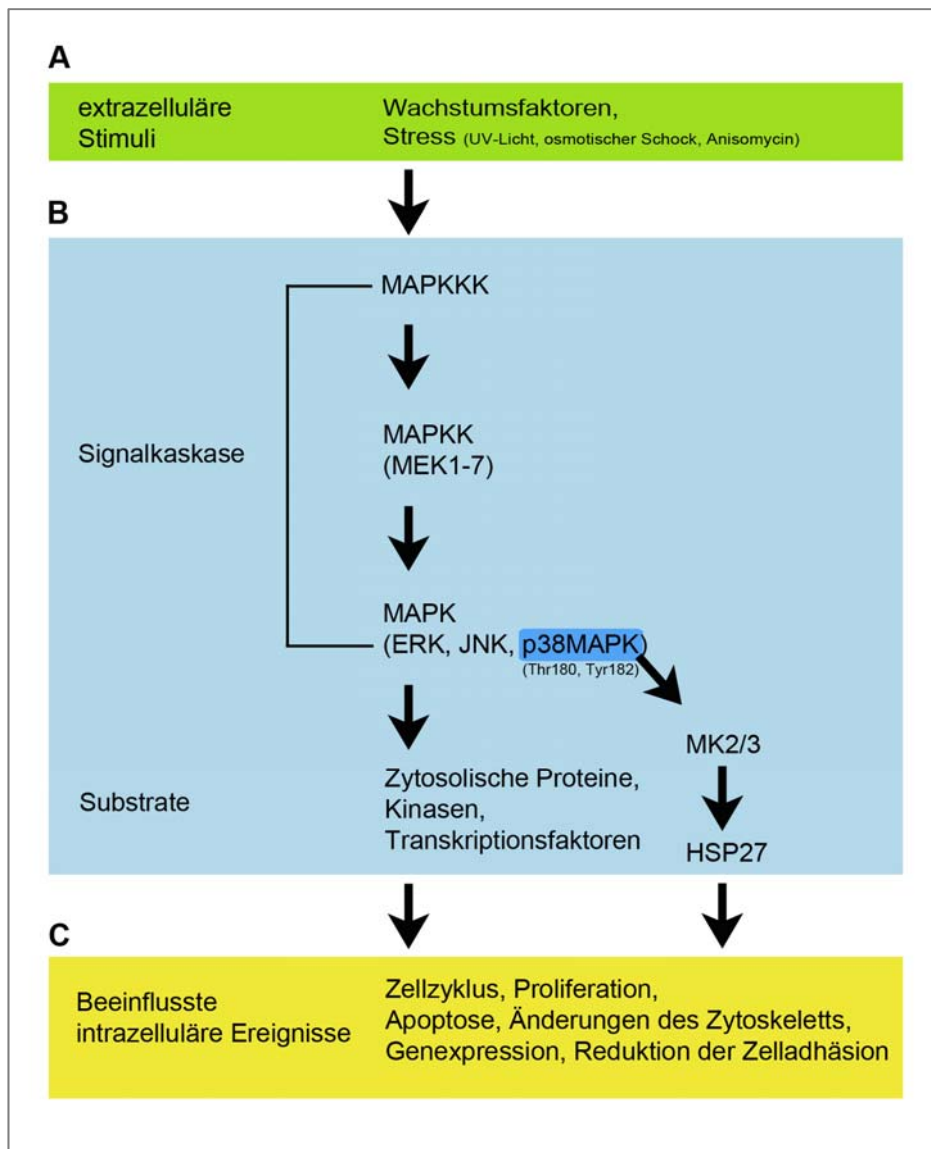


Abbildung 4: MAPK-Signalweg

(A) Extrazelluläre Stimuli; Anisomycin = Antibiotikum, das die Proteinsynthese inhibiert und u.a. MAP Kinasen aktiviert. (B) intrazellulär ablaufende Signalkaskade und relevante Substrate; MAPKKK = MAPKK-Kinase; MAPKK = MAPK-Kinase; MAPK = MAP-Kinase; ERK = engl. extracellular signal-regulated kinase; JNK = engl. c-Jun N-terminal kinase; MK2/3 = MAPKAPK2/3 = engl. MAPK-activated protein kinase 2/3; HSP27 = engl. heat-shock protein 27 (C) Infolge der Signalkaskade beeinflusste intrazelluläre Ereignisse; schwarze Pfeile symbolisieren eine Aktivierung bzw. Phosphorylierung [modifiziert nach (Kumar et al., 2003)]

Über den genauen Ablauf der Phosphorylierung der p38MAPK, d.h. den vorgeschalteten Prozessen innerhalb der Zelle ist bisher wenig bekannt. Für die Pemphigus-Pathogenese konnte gezeigt werden, dass p38MAPK zusammen mit PG an Dsg3 gebunden ist und durch Bindung von Autoantikörpern aktiviert wird (Abb. 5) (Spindler et al., 2014; Spindler et al., 2013). Es wurden zahlreiche Proteine

identifiziert, die als Folge der p38MAPK-Phosphorylierung aktiviert werden. Ein spezifisches Zielmolekül der p38MAPK ist die MAPK-aktivierte Proteinkinase 2 (engl. mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2, MAPKAPK2, Kurzform MK2) (Mao et al., 2014; Rouse et al., 1994), deren Aktivierung wiederum die Phosphorylierung der Hitzeschockproteine (HSP) zur Folge hat (Stokoe et al., 1992). Die Aktivierung der HSPs führt zu einer Modellierung des Aktin-Zytoskeletts. Dieser Signalweg stellt eine direkte Verknüpfung der p38MAPK mit der Pemphigus-Pathogenese dar. In Hautproben von Pemphigus-Patienten konnte sowohl eine Aktivierung der p38MAPK, als auch des HSP27 nachgewiesen werden (Berkowitz et al., 2008). Die p38MAPK beeinflusst über MAPKAPK2 und HSP27 eine Umorganisation des Zytoskeletts der Keratinozyten (Abb. 5) (Berkowitz et al., 2005). Dies wird wiederum als entscheidender Mechanismus der Pemphigus-Pathogenese diskutiert (Spindler und Waschke, 2014). Außerdem beeinflusst die Aktivierung der p38MAPK das Zytoskelett auch über die Guanosintriphosphatase (GTPase) RhoA (Abb. 5). Die Inkubation von Keratinozyten mit PV-IgGs führte zu einer Reduzierung der RhoA-Aktivität und einer damit verbundenen Fragmentierung der Dsg3-Membranfärbung. Beide Effekte wurden durch den p38MAPK-Inhibitor SB202190 blockiert (Waschke et al., 2006). Somit führt die Aktivierung der p38MAPK zu einer Verminderung der RhoA-Aktivität und damit zu einer Umorganisation der Aktinfilamente. Interessanterweise wurde für extradesmosomales Dsg3 ein Komplex mit den GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42, die den Aufbau des Zytoskeletts regulieren, identifiziert (Tsang et al., 2012a). Es ist denkbar, dass eine Störung des Aktinzytoskeletts den Einbau des extradesmosomalen Dsg3 in die Desmosomen verhindert. Eine Umorganisation des Aktinzytoskeletts steht in direktem Zusammenhang mit einem Verlust der Zelladhäsion in Keratinozyten (Gliem et al., 2010). Eine andere Arbeit deutet darauf hin, dass RhoA über Pkp2 die Verankerung zwischen DP und den Intermediärfilamenten und somit die Ausbildung des desmosomalen Plaques reguliert (Godsel et al., 2010).

PV-IgGs induzieren nicht nur eine Aktivierung der p38MAPK, sondern können auch durch eine Zunahme der Spiegel an zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) in Keratinozyten diese Aktivierung wieder reduzieren (Spindler et al., 2010). So wurde der durch PV-Autoantikörper induzierter Zelladhäsionsverlust sowie die intraepidermale Spaltbildung im neonatalen Mausmodell durch eine zusätzliche Erhöhung der cAMP-Spiegel mittels spezifischer Mediatoren blockiert. Dies deutete an, dass erhöhtes cAMP in einen protektiven Signalweg der Pemphigus-Pathogenese involviert ist, der an der Regulation von p38MAPK beteiligt ist.

Die Bedeutung von p38MAPK für die Pemphigus-Pathogenese *in vivo* ist von Studien belegt worden, in denen die durch PV- und PF-IgG induzierte Blasenbildung im neonatalen Mausmodell durch eine Inhibierung der p38MAPK blockiert wurde (Berkowitz et al., 2008; Berkowitz et al., 2006).

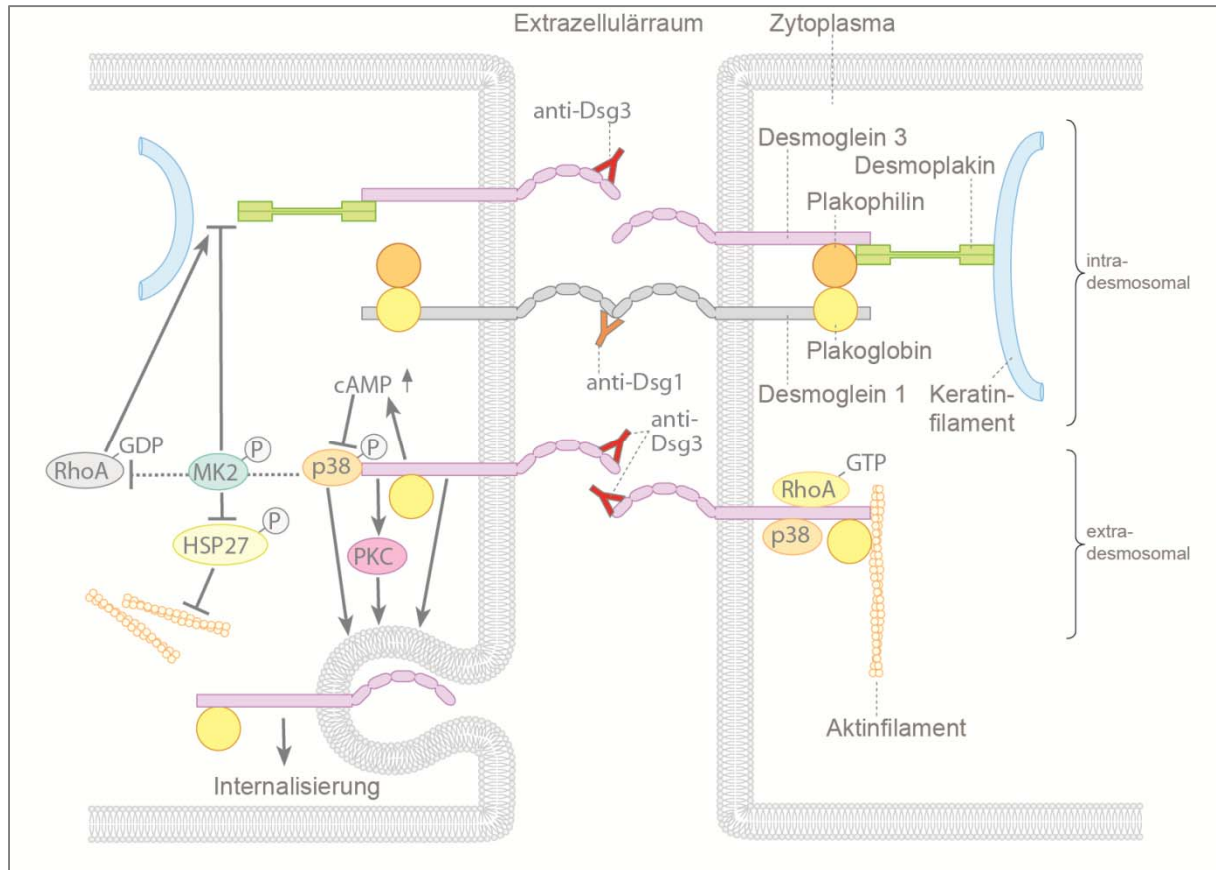


Abbildung 5: Schematische Darstellung der durch Autoantikörper induzierten relevanten Signalwege in der PV-Pathogenese

Dargestellt sind die bisher beschriebenen extradesmosomal ablaufenden Prozesse, die durch die Bindung von Dsg3-Autoantikörpern induziert werden. Die Signalwege resultieren in einer Dsg3-Internalisierung und einer Loslösung der Keratinfilamente von den Desmosomen. cAMP = zyklisches Adenosinmonophosphat; Dsg = desmoglein; GDP = Guanosindiphosphat; GTP = Guanosintriphosphat; HSP27 = engl. heat-shock protein 27; MK2 = MAPKAPK2 = engl. MAPK-activated protein kinase 2; p38 = p38MAPK; P = Phosphatgruppe; PKC = Proteinkinase C; [modifiziert nach (Waschke und Spindler, 2014)]

1.6. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung der desmosomalen Cadherine Dsg2 und Dsg3 für die interzelluläre Adhäsion in Keratinozyten zu untersuchen. Dazu sollte zunächst die Expression beider Proteine an humanen Hautproben und im Zellkulturmodell anhand immortalisierter humaner Keratinozyten analysiert werden. Für das in den unterschiedlichsten Geweben vorhandene desmosomale Cadherin Dsg2 sind bisher keine spezifischen Funktionen in der Epidermis beschrieben. Um diese zu untersuchen, wurden im Zuge dieser Arbeit vergleichende Studien zwischen Dsg2 und Dsg3 durchgeführt, da die Relevanz von Dsg3 als Haftprotein in Keratinozyten aufgrund seiner Identifizierung als Antigen in der blasenbildenden Hauterkrankung Pemphigus erwiesen ist. Pemphigus eignet sich als Modellerkrankung zur Untersuchung der Funktionen desmosomaler Cadherine, da durch zahlreiche Studien bereits für Dsg1 und Dsg3 eine Schlüsselrolle in der Pathogenese dieser Erkrankung identifiziert wurde und sowohl Zellkultur- als auch Tiermodelle etabliert sind. Zahlreiche Studien belegen außerdem eine zentrale Rolle von Dsg3 als Transduktor und Modulator verschiedener intrazelluläre Signalwege, u.a. dem p38MAPK-Signalweg, für die ein Zusammenhang mit der Pemphigus-Pathogenese gezeigt wurde. Anhand dieser Arbeit sollte nun zum einen die Relevanz von Dsg2 in Keratinozyten identifiziert und zum anderen die Rolle von Dsg2 und Dsg3 als Modulator im p38MAPK-Signalweg näher charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zelllinien

Tabelle 1: Zelllinien

Name	Zellart, Gewebe, Spezies	Hersteller
Caco-2	Epithelzellen, Kolonkarzinom, Mensch	American Type Culture Collection (ATCC)
CHO	Ovarialzellen, chinesischer Hamster	American Type Culture Collection (ATCC)
HaCaT	Keratinozyten, Epidermis, Mensch	Petra Boukamp, Heidelberg, Deutschland (Boukamp et al., 1988)
MEK	Keratinozyten, Epidermis, Maus	selbst präpariert, aus neonatalen Mäusen
NHEK	Keratinozyten, Epidermis, Mensch	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
SCC9	Epithelzellen, Plattenepithelkarzinom, Zunge, Mensch	American Type Culture Collection (ATCC)

2.1.2. verwendete Antikörper und Mediatoren

Tabelle 2: Primärantikörper

Primärantikörper	Spezies	Hersteller
anti- α -Tubulin	Maus, monoklonal	Abcam, Cambridge, USA
anti- β -Aktin	Maus, monoklonal	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
anti-Pan Keratin	monoklonal	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
anti-Desmocollin 1 (L-15)	Ziege, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA
anti-Desmocollin 2	Kaninchen	Progen, Heidelberg, Deutschland
anti-Desmocollin 3 (U114)	Maus, monoklonal	Progen, Heidelberg, Deutschland
anti-Desmoglein 1 (P124) (WB 1:200)	Maus, monoklonal	Progen, Heidelberg, Deutschland

anti-Desmoglein 2 (10G11) (IF 1:50; WB 1:200)	Maus, monoklonal	Progen, Heidelberg, Deutschland
anti-Desmoglein 2 (rb5)	Kaninchen, polyklonal	Progen, Heidelberg, Deutschland
anti-Desmoglein 2	Kaninchen, monoklonal	Abcam, Cambridge, England
anti-Desmoglein 3 (AK23)	Maus, monoklonal	Biozol, Eching, Deutschland
anti-Desmoglein 3 (H-145)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA
anti-Desmoglein 3 (5G11)	Maus, monoklonal	Life Technologies, Carlsbad, USA
anti-Desmoglein 3 (M-20) (WB 1:500)	Ziege, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA
anti-Desmoplakin	Kaninchen, monoklonal	Epitomics, Burlingame, USA
anti-E-Cadherin	Maus	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
anti-Plakoglobin	Maus, monoklonal	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
anti-p38MAP Kinase	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling, Danvers/Boston, USA
anti-phospho p38MAP Kinase	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling, Danvers/Boston, USA

Alle Primärantikörper wurden für Immunfluoreszenzdarstellungen in einer 1:100-Verdünnung in PBS eingesetzt und alle Primärantikörper für Western Blot-Analysen in einer 1:1000-Verdünnung in einer Milchlösung (5% Magermilchpulver in TBS-Tween). Abweichende Verdünnungen sind in der ersten Spalte der Tabelle 2 angegeben. Die Antikörper anti-Dsg2 (10G11), anti-p38MAP-Kinase und anti-phospho-p38MAP-Kinase wurden ausschließlich in einer Lösung aus 5% BSA in TBS-Tween anstelle von Magermilch inkubiert.

Tabelle 3: Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Spezies	Hersteller
anti-goat IgG, HRP-gekoppelt	Esel	Dianova, Hamburg, Deutschland
anti-mouse IgG + IgM, HRP-gekoppelt	Ziege	Dianova, Hamburg, Deutschland
anti-rabbit IgG, HRP-gekoppelt	Ziege	Cell Signaling, Danvers/Boston, USA
anti-goat IgG, cy3-gekoppelt	Esel	Dianova, Hamburg, Deutschland
anti-human IgG, cy3-gekoppelt	Ziege	Dianova, Hamburg, Deutschland
anti-mouse IgG, cy3-gekoppelt	Ziege	Dianova, Hamburg, Deutschland
anti-rabbit IgG, cy2-gekoppelt	Ziege	Dianova, Hamburg, Deutschland
anti-rabbit IgG, cy3-gekoppelt	Ziege	Dianova, Hamburg, Deutschland

Alle Sekundärantikörper wurden für Immunfluoreszenzdarstellungen (cy2- oder cy3-gekoppelt) in einer 1:600-Verdünnung in PBS eingesetzt und alle Sekundärantikörper für Western Blot-Analysen (HRP-gekoppelt) in einer 1:3000-Verdünnung in einer Milchlösung (5% Magermilchpulver in TBS-Tween).

Tabelle 4: Mediatoren

Mediator (eingesetzte Konzentration)	Spezifikation	Hersteller
Dispase II (>2,4 U/ml)	unspezifische neutrale Protease	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
SB202190 (30 µmol/l)	p38MAPK-Inhibitor	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.1.3. verwendete Chemikalien

Tabelle 5: kommerzielle Reaktionsansätze

Reaktionsansätze	Hersteller
EvaGreen Supermix, RT-PCR	Bio-Rad, München, Deutschland
Pierce™ BCA Protein Assay Kit; Proteinbestimmung	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RNeasy Plus Mini Kit; RNA-Isolierung	Qiagen, Venlo, Niederlande
SuperScript Reverse Transcriptase Kit	Life Technologies, Carlsbad, USA

Tabelle 6: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Accutase	CELLnTEC, Bern, Schweiz
Acrylamid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Agarose	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Alexa Fluor® 488 Phalloidin	Life Technologies, Carlsbad, USA
Amphotericin B	CELLnTEC, Bern, Schweiz
Aprotenin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
APS	Merck, Darmstadt, Deutschland
Aquabator-Clean	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Bleinitrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bradford-Reagenz	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Coomassie Brilliantblau	VWR, Radnor, USA
DDSA	Serva, Heidelberg, Deutschland
DMEM	Life Technologies, Carlsbad, USA
DMP-30	Serva, Heidelberg, Deutschland
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
dNTP-Mix	Promega, Madison, USA
DTT	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Einbettmedium für Gefrierschnitte	Leica, Wetzlar, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt, Deutschland
FCS	Merck Millipore, Billerica, USA
G418	Biochrom, Berlin, Deutschland
GeneRuler DANN Ladder (100 bp)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gentamycin	CELLnTEC, Bern, Schweiz
Glutaraldehyd (25%)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycid Ether 100 (Epon 812)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
GoTaqPolymerase	Promega, Madison, USA
Green Buffer	Promega, Madison, USA
HBSS	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	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MES	Biomol, Hamburg, Deutschland
MeOH	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

MgCl ₂	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
MMA	Serva, Heidelberg, Deutschland
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NaCl	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
NaF	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaOH	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NGS	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
NDS	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
NPG	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Osmiumtetroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
PCA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin G	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Pepstatin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
PMSF	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Proteaseinhibitoren	Roche, Basel, Schweiz
SDS	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Streptomycinsulfat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
TEMED	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Triton-X-100	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Trypsin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Tween 20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Uranylacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Zitronensäure-Monohydrat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 7: Agarose-Konjugate

Bezeichnung	Hersteller
Protein-A-Agarose-Konjugat	Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA
Protein A/G-Agarose-Konjugat	Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA

2.1.4. Rezepte

Tabelle 8: Rezepte

Bezeichnung	Zusammensetzung
Blei-Lösung (TEM)	1,33 g Bleinitrat in 30 ml Wasser lösen; 1,76 g Natriumcitrat zugeben (30 min im Dunkeln lösen); mit 8 ml 1mol/l NaOH klären; mit Wasser auf 50 ml auffüllen; im Dunkeln lagern (maximal 6 Wochen)
Blot-Puffer (WB)	15,15 g Tris, 73,2 g Glycin, 1 l MeOH, 5 g SDS auf 5 l mit dest. Wasser auffüllen
Coomassie	2,5 g Serva Blau G250, 454 ml Isopropanol, 454 ml dest. Wasser und 92 ml Eisessig mischen; alles durch einen Faltenfilter filtrieren
ECL-Lösung I (WB)	500 µl Luminol-Lösung (250 mmol/l in DMSO) , 220 µl PCA-Lösung (90 mmol/l in DMSO), 5 ml 1 mol/l Tris-HCl auf 50 ml mit dest. Wasser auffüllen
ECL-Lösung II (WB)	32 µl H ₂ O ₂ , 5 ml 1 mol/l Tris-HCl auf 50 ml mit dest. Wasser auffüllen
Einfriermedium	DMEM mit 20% FCS und 10% DMSO
Elektrophorese-Puffer (WB)	30 g Tris, 144 g Glycin, 10 g SDS auf 2 l mit dest. Wasser auffüllen
Epon-Gemisch (TEM)	Lösung A: 62 ml Glycidol, 100 ml DDSA; Lösung B: 100 Glycidol, 89 ml MNA (Lösung A und B können für 6 Monate unter Argon bei -20°C gelagert werden) 3 ml Lösung A, 7 ml Lösung B und 0,15 ml DMP-30 mischen
HBSS	4,92 g HBSS-Pulver, 0,18 g NaHCO ₃ in 500 ml dest. Wasser lösen
Laemmli-Puffer (WB)	2,27 g Tris, 6 g SDS, 37,8 g Glycin, 0,02 g Bromphenolblau in 100 ml dest. Wasser lösen, pH 6,9 (3-fach Laemmli-Puffer)
Natriumcitratlösung	0,42 g Natriumcitrat (20 mmol/l) in 100 ml dest. Wasser lösen, pH 2,4
PBS	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,36 g Na ₂ HPO ₄ , 0,2 g KH ₂ PO ₄ in 1 l dest. Wasser lösen
2%iges PFA (IF)	6 g Paraformaldehyd in 300 ml PBS bei 60°C lösen
RIPA-Puffer (IP)	0,05 mol/l Tris-HCl, 0,15 mol/l NaCl, 0,1% SDS, 1% NP-40, 0,0001 mol/l EDTA
RIPA-Wasch-Puffer (IP)	0,05 mol/l Tris-HCl, 0,15 mol/l NaCl, 0,1% SDS, 0,1% NP-40
Sammelgel (WB)	1,55 ml dest. Wasser, 0,3 ml Polyacrylamidlösung, 0,65 ml Tris Puffer (0,5

	mol/l, pH 6,8), 25 µl SDS (10%), 11,25 µl APS (10%), 5,625 µl TEMED
SDS-Lyse-Puffer (WB)	25 mmol/l HEPES, 2 mmol/l EDTA, 25 mmol/l NaF, 1% SDS, pH 7,6
Stripping-Puffer (WB)	25 mmol/l Glycin, 1% SDS, pH 2
TBS	2,42 g Tris-Base (20 mmol/l), 8 g NaCl (137 mmol/l) in 1 l dest. Wasser lösen und pH-Wert mit HCl auf 7,6 einstellen
Trenngel WB; 10% (WB)	2,025 ml dest. Wasser, 1,675 ml Polyacrylamidlösung, 1,25 ml Tris Puffer (1,5 mol/l, pH 8,8), 0,05 ml SDS (10%), 22,5 µl APS (10%), 11,25 µl TEMED
Triton-Puffer	0,5% Triton-X-100, 50 mmol/l MES, 25 mmol/l EGTA, 5 mmol/l MgCl ₂ , pH 6,8

2.1.5 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Deckgläschen (Glas)	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Handschuhe	VWR, Radnor, USA
Nitrozellulosemembran; Hybond-C extra	Amersham-Biosciences, Freiburg, Deutschland
Objektträger (Glas)	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße	Bio-Rad, München, Deutschland
Pipetten (Zellkultur; steril)	VWR, Radnor, USA
Pipetten (PCR; steril, DNA-frei, RNase-frei)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zellkulturflaschen	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturgefäße	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich

Tabelle 10: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Auflichtmikroskop, AE30	Motic, Wetzlar, Deutschland
Binokularmikroskop, MZ75	Leica, Wetzlar, Deutschland
CCD-Kamera, 2048x2028 (TEM)	Tröndle Restlichtverstärkersysteme, Moorenweis, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop, Axiophot mit	Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Fluoreszenzlampe HXP 120 C	
Heizblock, HBT-2-132	Haep Labor Consult, Bovenden, Deutschland
CO ₂ -Inkubator, C150 (E2)	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Konfokalmikroskop, TCS SP5	Leica, Wetzlar, Deutschland
Kritischer-Punkt-Trockner, K850	Quorum Technologies, Guelph, Kanada
Kühlrotator, Enviro-Genie	Scientific Industries, New York, USA
Kühlzentrifuge, 5430R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rotor: FA-45-24-11-Kit (1,5 und 2 ml Reaktionsgefäße)	
Rotor: F-35-6-30 (50 ml Reaktionsgefäße)	
Rasterelektronenmikroskop, Leo 1550	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
PCR-Maschine, CFX96	Bio-Rad, München, Deutschland
pH-Meter, pH 211	Hanna Instruments, Woonsocket, USA
Pipette, FINNPIPETTE, elektrisch	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Rotator, Rotator-Genie	Scientific Industries, New York, USA
Sonifiziergerät, Sonifier 250	Branson, Danbury, USA
Spektrophotometer, Infinite M200 PRO	Tecan, Männedorf, Schweiz
Sputter, 108auto	Cressington Scientific Instruments, Watford, England
Transmissionselektronenmikroskop, Libra 120	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Trimmgerät, EM TRIM	Leica, Wetzlar, Deutschland
Ultramikrotom, Ultracut E, Reichert-Jung	LABTEC, München, Deutschland
Wasserbad, SUB Aqua 34 Plus	Grant Instruments, Royston, England
Western Blot-Detektor, FluorchemE	Protein Simple, Kalifornien, USA
Western Blot-Kammern	Bio-Rad, München, Deutschland
Sterile Werkbank, Herasafe, KS 12	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vortexer, Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Waage, KB 600-2	KERN & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Zentrifuge (Zellkultur), Rotina 420R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge (Zellkultur), Rotanta 460R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

2.2. Methoden

2.2.1. Kultivierung der Zelllinien

Die immortalisierten Zelllinien (Caco-2, CHO, HaCaT) wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Life Technologies) kultiviert, angereichert mit 10% FCS und den beiden Antibiotika Penicillin (302,5 mg/l) und Streptomycin (65 mg/l). Für die Epithelzelllinie SCC9 wurde eine 1:1 Mischung aus DMEM und Ham's F-12 Flüssigmedium (Life Technologies) verwendet und in gleicher Weise mit Penicillin, Streptomycin und FCS angereichert. Für die selbst präparierten, primären murinen Keratinozyten (MEK) sowie die primären human Keratinozyten (NHEK) wurde spezielles Keratinozyten-Medium (Keratinocyte Growth Medium 2, Promocell) verwendet, dem eine Antibiotikallösung aus Gentamycin (Endkonzentration: 10 µg/ml) und Amphotericin B (Endkonzentration: 0,25 µg/ml) zugesetzt wurde. Alle Zellen wurden bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert. CHO-, HaCaT-, SCC9-, MEK- und NHEK-Zellen wurden bis zum Erreichen einer Konfluenz von 90-100% für 4-5 Tage kultiviert. Caco-2-Zellen wurden nach Erreichen einer 100%igen Konfluenz für weitere 14 Tage bis zur Versuchsdurchführung gehalten. CHO-, HaCaT-, SCC9- und Caco-2-Zellen wurden stets in einem Medium mit einer Ca²⁺-Konzentration von 1,8 mmol/l kultiviert. Die primären Zellen, MEK und NHEK, wurden zunächst bis zum Erreichen einer Konfluenz von 90% in Medium mit einer Ca²⁺-Konzentration von 0,8 mmol/l kultiviert und 24 Stunden vor der jeweiligen Versuchsdurchführung bzw. Inkubation in Medium mit einer Ca²⁺-Konzentration von 1,8 mmol/l überführt.

2.2.2. Einfrieren und Auftauen der Zellen

Um die Zellen über längere Zeiten zu lagern, wurden pro Zelllinie die konfluenten Zellen in einer T75-Zellkulturflasche mit 3 ml Trypsin bei 37°C vom Flaschenboden abgelöst, in Zellkulturmedium resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur (RT) und 280 g zentrifugiert. Das so entstandene Zellpellet konnte dann in 3 ml Einfriermedium (DMEM, 20% FCS, 10% DMSO) resuspendiert und auf zwei 1,5 ml Einfriergefäße verteilt werden. Diese wurden nach 3-tägiger Lagerung bei -80°C in flüssigen Stickstoff überführt.

Um das zelltoxische DMSO während des Auftauens zu entfernen, wurde der Inhalt des Einfriergefäßes nach kurzem Antauen mit Zellkulturmedium resuspendiert und sofort für 5 min bei

RT und 280 g zentrifugiert. Der DMSO-enhaltende Überstand wurde dann sorgfältig abgesaugt, das Zellpellet im jeweiligen Kulturmedium resuspendiert, in eine T75-Zellkulturflasche überführt und bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator kultiviert.

2.2.3. Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1. Anfertigung von Zelllysaten

Zur Anfertigung eines Zelllysats wurde zunächst das Zellkulturmedium abgesaugt und die adhärenen Zellen mit sterilem PBS einmal gewaschen. Pro 2 cm² des Zellkulturgefäßes wurde anschließend 60 µl SDS-Lyse-Puffer (25 mmol/l HEPES, 2 mmol/l EDTA, 25 mmol/l NaF, 1% SDS, pH 7,6; mit Proteaseinhibitoren) zugegeben und der komplette Inhalt des jeweiligen Wells abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Unter Kühlung wurde das Lysat sonifiziert, um die Zellwände vollständig aufzuschließen. Die Lysate wurden bis zur Proteinbestimmung bzw. weiterer proteinbiochemischer Analysen bei -20°C gelagert.

2.2.3.2. Proteinmengenbestimmung

Bradford

Die Proteinbestimmungsmethode nach Bradford wurde angewendet, um die Konzentration der aufgereinigten rekombinanten Proteine zu ermitteln. Nach dem Mischen von 1 ml Bradford-Reagenz mit 10 µl eines Standards aus einer Konzentrationsreihe von 0,1 - 1 µg/µl bzw. mit 10 µl aufgereinigtem Protein wurde der Proteingehalt nach 10-minütiger Inkubationszeit photometrisch ermittelt.

BCA-Proteinbestimmung

Diese Methode basiert auf der Biuret-Reaktion und ermöglicht einen kolorimetrischen Proteinnachweis und die Ermittlung der Proteinkonzentration. In einem alkalischen Milieu bilden Peptide mit drei oder mehreren Aminogruppen einen Komplex mit Kupfer (Cu²⁺)-Ionen. Die dabei entstanden reduzierten Kupfer (Cu¹⁺)-Ionen bilden in einem zweiten Reaktionsschritt mit Bicinchoninsäure (BCA) einen lila-gefärbten Komplex, dessen Konzentration photometrisch bestimmt

wird und Rückschlüsse auf die Proteinkonzentration der jeweiligen Probe gibt. Die Reagenzien zur BCA-Proteinbestimmung wurden gemäß den Herstellerangaben eingesetzt, um die Proteingehalte der Zell- und Gewebelysate in den verschiedenen Puffersystemen zu bestimmen. Dazu musste lediglich eine separate Standardreihe von 2 mg/ml BSA in dem jeweiligen Puffer hergestellt werden.

2.2.3.3. Gelelektrophorese, Western Blot

Um die im Zell- bzw. Gewebelysate enthaltenen Proteine entsprechend ihrer Größe aufzutrennen, wurden Polyacrylamid-Gele mit einem Acrylamidgehalt von 10% angefertigt. Nach Ermittlung der Proteinkonzentrationen der verschiedenen Proben wurden diese mit gleichen Anteilen Laemmli-Puffer (Laemmli, 1970) und DTT versetzt und für 5 min auf 95°C erhitzt. Jeweils gleiche Proteinmengen wurden pro Tasche in das Sammelgel aufgetragen und die Proteine bei einer angelegten Spannung von 80 - 120 V ihrer Größe nach aufgetrennt. Dabei werden die größeren Proteine stärker zurückgehalten und die kleineren Proteine gelangen schneller durch das Polyacrylamidgel. Anschließend wurden die im Gel enthaltenen Proteine bei 350 mA innerhalb von 90 min auf eine Membran aus Nitrozellulose transferiert. Die Membran wurde im Anschluss für 40 min in einer 5%igen Magermilchlösung inkubiert, um die freien Bindungszellen zu blockieren. Die Inkubation mit dem entsprechenden Primärantikörper erfolgte bei 4°C über Nacht unter gleichmäßiger Rotation. Ungebundene Antikörper wurden am nächsten Tag durch dreimaliges Waschen mit TBS entfernt. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde für 2 Stunden bei RT durchgeführt. Für alle Western Blot-Analysen wurden ausschließlich Zweitantikörper verwendet, die mit der Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt waren. Daher wurde zur Visualisierung des gebundenen Zweitantikörpers das ECL-System angewendet und die Membranen entweder im eigenen Fotolabor oder mittels automatischer Chemilumineszenzdetektion (Fluorchem E; Firma Biozym) analysiert.

2.2.4. Immunfluoreszenzfärbung

Zur immunhistochemischen Detektion verschiedener Proteine ist es notwendig, die zu untersuchenden Proben zu fixieren und die Zellmembranen zu permeabilisieren. Dabei müssen sowohl die Antigenität der Zielproteine als auch die übrigen Zellstrukturen bestmöglich erhalten werden. Daher wurden zur Probenvorbereitung von Zellkulturen bzw. Gewebeproben zwei

verschiedene Fixierungsprotokolle angewendet. Nach der Fixierung wurde die Immunfluoreszenzfärbung sowohl auf den Zellkulturen als auch den Gewebeschnitten nach dem gleichen Protokoll durchgeführt. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, wurden die Proben zunächst für 40 min bei RT mit BSA/NGS bzw. NDS inkubiert, je nach entsprechender Spezies des verwendeten Sekundärantikörpers. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte bei 4°C über Nacht in einer dunklen, feuchten Kammer. Alle verwendeten Primärantikörper wurden im Verhältnis 1:100 in PBS verdünnt. Durch dreimaliges Waschen mit PBS wurde anschließend ungebundener Primärantikörper entfernt und dann der cy2- bzw. cy3-gebundene Sekundärantikörper auf den Proben für zwei Stunden bei RT inkubiert. Alle verwendeten Sekundärantikörper wurden im Verhältnis 1:600 mit PBS verdünnt. Nach drei Waschschritten mit PBS wurden die Deckgläschen mit den Zellkulturen bzw. die Objektträger mit den Gewebeschnitten mit Hydromount bzw. NPG eingedeckt und im Dunkeln bei 4°C gelagert.

2.2.4.1. Kulturzellen

Zur Darstellung verschiedener Proteine mittels Immunfluoreszenz wurden die Zellen zunächst auf Glasplättchen mit einem Durchmesser von 12 mm kultiviert und dann entsprechend des jeweiligen Versuchsansatzes transfiziert oder mit Mediatoren behandelt. Nach einem kurzen Waschschritt mit PBS wurden die Glasplättchen dann für 10 min bei RT mit aus Paraformaldehyd frisch angesetzter Formaldehydlösung (2%) fixiert und anschließend dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Eine Inkubation mit 0,1%igen Triton-X-100 für 5 min gewährleistete die Permeabilisierung der Zellmembran und somit die Detektion der intrazellulär gelegenen Zielstrukturen. Nach wiederholtem Waschen mit PBS wurde dann die Detektion der jeweiligen Proteine nach dem unter 2.2.4. beschriebenen Protokoll durchgeführt.

2.2.4.2. Gewebeproben

Gewebeproben wurden zunächst in Kryo-Einbettmedium überführt und bei -20°C gelagert. Von den ausgehärteten Blöckchen wurden anschließend mit dem Kryostat 8 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und für 30 min bei 60°C auf Glasobjektträgern eingebrannt. Nach einem 10-minütigen Waschschritt in PBS wurden die Objektträger für eine Stunde mit einer 1%igen Triton-X-100 Lösung

in PBS inkubiert. Die Detektion der entsprechenden Proteine wurde anschließend wie unter 2.2.4. beschrieben durchgeführt.

2.2.5. Rasterelektronenmikroskopie

Für die Untersuchung mittels Rasterelektronenmikroskopie wurden HaCaT-Zellen bis zur Konfluenz auf Glasplättchen mit einem Durchmesser von 13 mm kultiviert. Vor der Fixierung wurden die Zellen mit PBS bei 37°C gewaschen. Auch der Fixierungsprozess erfolgte mit einer auf 37°C-temperierten 1%igen Glutaraldehyd-Lösung in PBS für 10 min. Die Fixierlösung wurde einmal erneuert und insgesamt für 1 Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal für 5 min mit PBS bei 4°C gewaschen. Zum besseren Erhalt der Strukturen erfolgte eine Nachfixierung mit einer 2%igen Osmiumtetroxid-Lösung für 1 Stunde bei 4°C. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Proben in einer aufsteigenden Reihe verschiedener Ethanolkonzentrationen (von 20 bis 100% Ethanol, für jeweils 15 min) entwässert und eine sog. Kritische-Punkt-Trocknung durchgeführt. Durch das Überziehen einer feinen Goldschicht wurde den Proben eine elektrisch-leitfähige Oberfläche verliehen und anschließend Aufnahmen am Rasterelektronenmikroskop erstellt. Dazu wurde eine Spannung von 10 000 V angelegt und ein InLens-Detektor verwendet.

2.2.6. Transmissionselektronenmikroskopie

Für die Untersuchung mittels Transmissionselektronenmikroskopie wurden HaCaT-Zellen bis zur Konfluenz in 24-Well-Platten kultiviert und zunächst einmal mit auf 37°C-temperiertem PBS gewaschen. Zur Fixierung wurde eine 37°C-warme Glutaraldehyd-Lösung (1% in PBS) verwendet und nach 10 min erneuert. Insgesamt wurden die Zellen für 1 Stunde in Glutaraldehyd fixiert. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten stets bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in einer Osmiumtetroxid-Lösung (2% in Wasser) für 1 Stunde inkubiert. Nach erneuten Waschschritten mit PBS erfolgte die Entwässerung der Proben in einer aufsteigenden Reihe verschiedener Ethanolkonzentrationen (von 20 bis 100% Ethanol, für jeweils 10-20 min). Das Epon wurde wie in Tabelle 8 angegeben angesetzt. Die Zellkulturgefäße wurden anschließend mit einem Gemisch aus Epon und Ethanol (1:1) für 1,5 Stunden oder über Nacht ausgegossen, sodass der Alkohol verdampfte und das Epon langsam in die Proben eindringen konnte. Dieses Gemisch wurde dann wieder abgenommen und die Zellkulturgefäße mit purem Epon ausgegossen und zur

Auspolymerisation über Nacht bei 80°C in den Heihschrank gestellt. Nach dem Abkühlen der Proben wurden die einzelnen Zellkulturgefäße ausgesägt und der Plastikboden der Zellkulturschalen in flüssigem Stickstoff vom Epon-Block abgesprengt. Die Epon-Blöcke wurden mit einer elektrischen Säge für das Schneiden am Ultramikrotom entsprechend vorbereitet. Mit einem Diamantmesser wurden von jeder Probe 60 - 80 nm dicke Schnitte angefertigt, in einem Wasserbecken gesammelt und auf Elektronenmikroskopie-Netzchen aufgezogen. Da sich die Zellen unmittelbar an der Kontaktstelle zwischen Epon und Luft befanden, waren nur wenige Schnitte nötig, um den Zellrasen flächig zu schneiden. Der Kontrastvorgang wurde in mit Parafilm ausgelegten Petrischalen hinter einer Plexiglasscheibe durchgeführt. Die Netzchen wurden, mit der die Schnitte enthaltenden Seite nach unten, für 20 - 40 min auf Tropfen einer gesättigten, kurz zuvor zentrifugierten Uranylacetat-Lösung (in Methanol) gelegt und anschließend einmal mit Methanol (35%) und dreimal mit Wasser gespült. Danach wurden die Netzchen in gleicher Orientierung für 5 min auf eine Bleicitrat-Lösung gelegt und dreimal mit Wasser gespült. Zuletzt wurden alle Netzchen zusammen mit NaOH-Plätzchen in einer mit Filterpapier ausgelegten Petrischale getrocknet. Die NaOH-Plätzchen sollten die Entstehung eines Bleiniederschlages auf den Proben verhindern. Die Aufnahmen wurden mit einem Transmissionselektronenmikroskop (Libra 120) bei einer Hochspannung von 80 000 V und einem Emissionsstrom von 5 µA einer Wolframkathode erzeugt und mit einer CCD-Kamera aufgenommen.

2.2.7. Aufreinigung rekombinanter Proteine

Zur Gewinnung rekombinanter Proteine (Dsg2-Fc; Dsg3-Fc) wurden stabil transfizierte CHO-Zellen verwendet. Da die CHO-Zellen, die in der Lage sind das jeweilige Konstrukt zu exprimieren, auch eine Gentamycin-Resistenz besitzen, wurde dem Kulturmedium stets das Antibiotikum G418 zugesetzt. Zunächst wurden die Zellen in 15 großen Zellkulturschalen bis zu einem Konfluenzstadium von 80% kultiviert und dann für 24 Stunden in FCS-freies Medium überführt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und das im Überstand enthaltene Zellkulturmedium mit Proteaseinhibitoren versetzt. Nach einer Zentrifugation bei 7197 g bei 4°C für 20 min wurde der Überstand über einen Faltenfilter geklärt und anschließend mittels einer mit Protein-A-Agarose-Konjugaten bestückten Säule aufgereinigt. Die von den Zellen ins Medium sezernierten rekombinanten Proteine sind aus der extrazellulären Domäne des jeweiligen desmosomalen Cadherins aufgebaut. Diese ist mit einem humanen Fc-Teil verknüpft. Dieses Gesamtkonstrukt liegt als Dimer vor und wird über Disulfidbrücken miteinander verbunden. Während das Medium durch die Säule fließt, wird das

rekombinante Protein aufgrund der Wechselwirkung des Fc-Teils mit dem Protein-A des Säulenmaterials an der Säule zurückgehalten. Nach einem Waschschrift mit 20 ml HBSS wurde das an die Säule gebundene Konstrukt mit einer Natriumcitratlösung (20 mmol/l, pH 2,4) tropfenweise eluiert und das Eluat in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gesammelt. Üblicherweise wurden insgesamt 6 Fraktionen mit jeweils 500 µl eluiert. Um eine Denaturierung durch die saure Natriumcitratlösung zu verhindern, wurden in jedem Reaktionsgefäß zuvor 10 µl einer Natriumcarbonatlösung (2 mol/l) vorgelegt und anschließend der pH-Wert des gesamten Eluats auf einen Wert von 7 eingestellt. Mittels der Proteinbestimmungsmethode nach Bradford wurden dann die beiden Fraktionen mit höchstem Proteingehalt ermittelt und für 24 Stunden in einem Dialyseschlauch gegen HBSS dialysiert. Anschließend wurde nochmals der exakte Proteingehalt ermittelt und das gewonnene rekombinante Protein mittels Western Blot und Coomassie-Färbung charakterisiert. Die aufgereinigten rekombinanten Proteine wurden für die AFM-Studien eingesetzt und dazu von Prof. Volker Spindler an spezielle AFM-Spitzen und Probenoberflächen gebunden und anschließend an einem Rasterkraftmikroskop der Firma Bruker (Rosenheim, Deutschland) vermessen.

2.2.8. Transfektionen mit siRNA

Zur Durchführung transienter Transfektionen mit siRNA wurden die Zellen in 24-Well-Platten ausgesät und für 24 Stunden kultiviert, sodass sie am Tag der Transfektion ein Konfluenzstadium von 75 - 80% erreichten. Pro Transfektionsansatz wurden 95 µl DMEM-Medium (ohne Zusatz von FCS), 3 µl siRNA (entsprechen 0,6 µg siRNA) und 2 µl Transfektionsreagenz (TurboFect™) vermischt und für 40 min bei RT inkubiert. Um die sich gebildeten siRNA-enthaltenden Komplexe nicht zu zerstören, wurde der Ansatz vorsichtig tropfenweise auf die zu transfizierenden Zellen pipettiert und diese für 24 Stunden im Inkubator kultiviert. Anschließend erfolgte ein Mediumswechsel mit 10% FCS-haltigem DMEM. In Vorversuchen zeigte sich die beste Transfektionseffizienz zu einem Zeitpunkt von 72 Stunden nach Transfektion. Daher wurden alle folgenden Experimente mit transfizierten Zellen zu diesem Zeitpunkt durchgeführt.

In der folgenden Tabelle sind alle zur Transfektion mit siRNA verwendeten Reagenzien aufgelistet.

Tabelle 11: Reagenzien für die siRNA-Transfektion

Bezeichnung, Spezifikation	Hersteller
ON-TARGETplus SMARTpool siRNA J-011645-00-0005 DSG2, human	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

ON-TARGETplus SMARTpool siRNA J-011646-00-0005 DSG3, human	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ON-TARGETplus SMARTpool siRNA L-003512-00-0005 MAPK14, human	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ON-TRAGETplus non-targeting Pool D-001810-10-05 5 x siRNA Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Transfektionsreagenz: TurboFect™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.2.9. Dispase-basierter Dissoziationsversuch

Um die Zellhaftung funktionell zu untersuchen wurde ein auf dem Einsatz von Dispase basierender Dissoziationsversuch durchgeführt (Ishii et al., 2005). Dazu wurden die Zellen bis zum Erreichen einer 100%igen Konfluenz bzw. bis zu 3 Tagen nach der Transfektion mit siRNA in 24-Well-Platten kultiviert. Nach einem Waschschriff mit PBS wurden die Zellen mit jeweils 150 µl Dispase für 20 min bei 37°C inkubiert, um den kompletten Zellrasen vom Boden der Kulturschalen abzulösen. Dispase ist eine neutrale nicht-spezifische Protease, die für ihre Aktivität eine optimale Ca²⁺-Konzentration von 2 mmol/l benötigt. Die Vorteile von Dispase gegenüber anderen proteolytischen Enzymen wie Trypsin oder Kollagenasen sind, dass Zellmembranen intakt bleiben und adhärenente Epithelzellen so vom Boden des Zellkulturgefäßes abgelöst werden können, dass sie nicht in Einzelzellen dissoziieren. Durch Zugabe von 200 µl HBSS pro Zellkulturschale wurde die Dispase-Reaktion anschließend abgestoppt und der abgelöste Zellrasen mit einer elektrischen Pipette mit definiertem Volumen (350 µl), definierter Geschwindigkeit und Häufigkeit (5 mal bzw. 12 mal) auf und ab pipettiert, um auf die Zellen unter allen Bedingungen einen vergleichbaren mechanischen Scherstress auszuüben. Die so entstandenen Fragmente wurden mit einem Binokularmikroskop ausgezählt und zur Interpretation des Kohäsionsvermögens der Zellen herangezogen. Eine erhöhte Anzahl der Fragmente entspricht einer geringen interzellulären Haftung.

2.2.10. Triton-vermittelte Zellfraktionierung

Triton-X-100 ist ein ungeladenes neutrales Detergent, das Proteine relativ schwach denaturiert und in der Lage ist, Membranproteine in ihrer nativen Konformation aus der biologischen Zellmembran herauszulösen. Hierzu wurden die Zellen in 24-Well-Platten ausgesät und entsprechend den

jeweiligen Fragestellungen mit Antikörpern inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS wurden die Zellen mit 60 µl Triton-Puffer (0,5% Triton-X-100, 50 mM MES, 25 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, pH 6,8) für 15 min auf Eis inkubiert. Um Proteasen zu inhibieren, wurden dem Puffer Lösungen von Leupeptin, Pepstatin und Aprotinin im Verhältnis 1:1000 zugesetzt sowie PMSF im Verhältnis 1:100. Um das so erhaltene Zelllysat in eine Triton-X-100-löslichen und eine -unlösliche Fraktion zu trennen, erfolgte eine Zentrifugation (18516 g) bei 4°C für 5 min. Anschließend wurde der Zentrifugationsüberstand, der alle Triton-löslichen Bestandteile und damit die nicht am Zytoskelett-verankerten, extradesmosomalen Proteine enthält, in ein separates Reaktionsgefäß überführt, sonifiziert und 5 min bei 95°C gekocht. Im Pellet verbleiben die Triton-unlöslichen, am Zytoskelett-verankerten, d.h. unter anderem die in den Desmosomen lokalisierten Proteine. Das Pellet wurde anschließend mit SDS-Lyse-Puffer resuspendiert, sonifiziert und 5 min für 95°C gekocht. In beiden Fraktionen (Pellet und Überstand) wurde aufgrund der unterschiedlichen Pufferzusammensetzung eine separate Proteinbestimmung mittels BCA-Bestimmung durchgeführt.

2.2.11. Immunpräzipitation

Um gezielt einzelne Proteine im Zelllysat anzureichern und mögliche Interaktionspartner zu identifizieren, wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in T75-Zellkulturflaschen bis zur Konfluenz kultiviert, mit kaltem PBS gewaschen und für 30 min mit 1 ml RIPA-Puffer bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Das Zelllysat wurde anschließend für 5 min bei 18516 g bei 4°C zentrifugiert und der Proteingehalt im Überstand mittels BCA-Bestimmung ermittelt. Daraus wurden 600-1000 µg Protein entnommen und mit RIPA Puffer auf ein Gesamtvolumen von 500-1000 µl aufgefüllt. Um unspezifische Bindungen zwischen Proteinen des Lysates und den verwendeten Agarose-Konjugaten zu minimieren, wurden zunächst 25 µl vorgewaschener mit Protein A- und G-beschichteter (A/G) Agarose-Konjugate vorsichtig zum Lysat pipettiert und für eine Stunde bei 4°C in einem Rotator inkubiert. Die Agarose-Konjugate wurden nach einem Zentrifugationsschritt bei 7012 g verworfen. Das somit vorgereinigte Lysat wurde dann mit 1 µg des entsprechenden Antikörpers versetzt und für 3 Stunden bei 4°C in einem Rotator inkubiert. Um den nun im Zelllysat gebildeten Antigen-Antikörper-Komplex an die Agarose-Konjugate zu binden, wurden 40 µl der vorgewaschenen A/G-Agarose-Konjugate hinzugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Ungebundene Proteine wurden dann durch dreimaliges Waschen mit RIPA-Wasch-Puffer und Zentrifugation (7012 g, 4°C) entfernt. Der somit erhaltene Antigen-Antikörper-Komplex und

dessen Bindungspartner wurden im letzten Schritt durch Zugabe von Laemmli-Puffer (Laemmli, 1970) und 10-minütigem Kochen bei 95°C voneinander gelöst und die gebundenen Proteine nach dem Abzentrifugieren (18516 g, bei RT, da bei 4°C das im Laemmli-Puffer enthaltenen SDS ausfällt) mittels Western Blot analysiert.

2.2.12. Transgenes Dsg3-Mausmodell

Aus einem transgenen Dsg3-Mausmodell wurden homozygote Tiere des Mausstammes B6;129X1-*Dsg3^{tm1Stan}/J* (Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) gezüchtet. Der resultierende Phänotyp spiegelt das klinische Bild eines PV-Patienten wieder (Koch et al., 1997). Ab einem Alter von 15-20 Tagen macht sich bereits ein reduziertes Körpergewicht der Tiere bemerkbar, das wahrscheinlich auf eine verminderte Nahrungsaufnahme aufgrund von Erosionen im Epithel der Speiseröhre und damit verursachten Schmerzen bei der Nahrungsaufnahme zurückzuführen ist. Bereits bei 3 Wochen alten Tieren kann ein unterschiedlich stark ausgeprägter Haarausfall beobachtet werden. Bei älteren Tieren treten außerdem Läsionen an den Schleimhäuten und vereinzelt der Epidermis auf, die sich auch histologisch als suprabasale Akantholyse nachweisen lassen.

2.2.12.1. DNA-Isolierung

Um die genomische DNA zur Genotypisierung zu isolieren, wurden den Mäusen nach dem Absetzen von 4 Wochen 2 mm der Schwanzspitze gekappt. Die Schwanzspitzen wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 75 µl Natronlauge (25 mM NaOH; 0,2 mM EDTA) versetzt und in einem Heizblock für 1 Stunde bei 98°C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf RT und der Zugabe von 75 µl 40 mM Tris HCl (pH 5.5) wurden die Proben für 3 min bei 7012 g zentrifugiert, der Überstand entnommen und bis zur PCR-Reaktion bei 4°C aufbewahrt.

2.2.12.2. Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion

Zur Genotypisierung wurden jeweils 2 µl der isolierten DNA eingesetzt. Pro Reaktionsansatz wurden folgende Komponenten für die PCR-Reaktion verwendet: 5 µl 5-fach Green Buffer, 0,5 µl dNTP-Mix, 1 µl Primer (forward), 1 µl Primer (reverse), 0,13 µl GoTaqPolymerase. In diesem Reaktionsansatz fand

die PCR-Reaktion nach einer entsprechenden Zugabe von Wasser in einem Gesamtvolumen von 25 µl pro DNA-Probe statt.

Primer:

Tabelle 12: Primer für die Genotypisierung

	forward	reverse
DSG3	5'-GGAGGAACAGACTAACAGGC-3'	5'-ACCATCAGGAGGGCCAGAGA-3'
Neomycin-Resistenzgen	5'-CTTGGGTGGAGAGGCTATTC-3'	5'-AGGTGAGATTACAGGAGATC-3'

PCR-Programm

Tabelle 13: PCR-Programm für die Genotypisierung

	Temperatur	Zeit
1.	95°C	3 min
2.	95°C	30 s
3.	60°C	30 s
4.	72°C	25 s
5.	35 Zyklen ab Schritt 2.	
6.	72°C	7 min
7.	10°C	bis zur Entnahme aus dem Gerät

Nach Ablauf der PCR Reaktion wurden jeweils 6 µl der Proben auf ein 1,8%iges Agarose-Gel aufgetragen, eine Elektrophorese bei 120 V durchgeführt und das Gel anschließend für 10 min im Ethidiumbromidbad inkubiert und die DNA-Produkte unter UV-Licht detektiert (FluochemE). Das Produkt der DSG3-Primer konnte bei 200 bp detektiert werden und das Produkt der Neomycin-Resistenzgen-Primer bei 300 bp.

2.2.12.3. Gewebeentnahme und -untersuchung

Zur Entnahme von Gewebeproben wurden die Mäuse nach eindeutiger Genotypisierung durch zervikale Dislokation getötet und unmittelbar danach ein ungefähr 5 mm²-großes Hautstück (Epidermis und Dermis) der jeweiligen Körperregion abpräpariert, mit insgesamt 500 µl SDS-Lyse-

Puffer und Proteaseinhibitoren versetzt und durch 10-maliges Umdrehen eines Glaspistills in einem Reibgefäß zerkleinert. Anschließend wurde das Lysat mehrmals sonifiziert und bei 18516 g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Aus einem Aliquot des Überstandes wurde anschließend mittels BCA-Bestimmung die Proteinmenge ermittelt und das restliche Lysat in einem 1:1 Mischungsverhältnis mit Laemmli-Puffer (Laemmli, 1970) und DTT versetzt und bis zur proteinbiochemischen Analyse bei -20°C gelagert.

Zur mikroskopischen Untersuchung wurden die Hautproben der Mäuse unmittelbar nach der Präparation in Einbettmedium für Gefrierschnitte eingebettet und zum Aushärten bei -20°C gelagert. Anschließend wurden Schnitte mit einer Schnittdicke von 8 µm angefertigt und auf Glasobjektträger aufgezogen.

2.2.12.4. Präparation muriner primärer Keratinozyten

Auch für die Präparation der murinen primären epidermalen Keratinozyten macht man sich die Eigenschaften der neutralen unspezifischen Protease Dispase zu Nutze (vgl. 2.2.9.). Diese ist gemäß den Angaben des Herstellerfirma Roche (Basel, Schweiz) bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 2 mmol/l und einem pH Wert zwischen 6,0 und 8,5 in der Lage intakte Epidermis von der Dermis zu trennen und dabei die Zellmembranen nicht anzugreifen. Dazu wurden die abpräparierten Häute der neonatalen Mäuse für 16 Stunden bei 4°C mit Dispase inkubiert. Der Disapselösung wurden zuvor die beiden Antibiotika Gentamycin (Endkonzentration: 10 µg/ml) und Amphotericin B (Endkonzentration: 0,25 µg/ml) zugesetzt. Anschließend ließ sich leicht die Epidermis von der Dermis ablösen. Die Epidermis wurde dann für 20 min bei RT auf einem Tropfen Accutase ausgebreitet, um dann die murinen Keratinozyten mit Medium anzulösen und vorsichtig herauszuschaben. Die so gewonnene Zellsuspension wurde zentrifugiert (1020 g) und das entstandene Pellet in Medium resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und die Zellen auf die Kulturgefäße verteilt ($1,2 \times 10^5$ Zellen/cm²).

2.2.12.5. RNA-Isolierung und Präparation der komplementären DNA

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurden frisch präparierte murine Keratinozyten in Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm² bis zu einer Konfluenz von 90% kultiviert und dann für 24 Stunden mit Medium mit einem Ca^{2+} -Gehalt von 1,8 mmol/l versetzt. Zur anschließenden Isolierung der Gesamt-RNA wurde das RNeasy Plus Mini Kit gemäß den Angaben des Herstellers eingesetzt und die

isolierte RNA mittels eines Spektrophotometers quantifiziert (Infinite M200 PRO Tecan Reader). Zum Umschreiben der RNA in die komplementäre cDNA wurde das SuperScript II Reverse Transcriptase Kit gemäß den Herstellerangaben verwendet. Pro Reaktionsansatz wurden 3 µg der Gesamt-RNA und oligo (dt) 15 Primer eingesetzt.

2.2.12.6. Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Zur Bestimmung der relativen mRNA-Expression von DSG2 in den primären murinen Keratinozyten wurde eine quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) durchgeführt. Dazu wurden pro Reaktionsansatz 4 µl einer Verdünnung der wie unter 2.2.12.5. isolierten RNA eingesetzt. Diese Menge entsprach 60 ng der Gesamt-RNA. Zuvor wurde die Spezifität der beiden Primerpaare durch eine PCR getestet und die Größe der erhaltenen Produkte mittels Ethidiumbromidfärbung auf einem Agarose-Gel überprüft.

In der nachfolgenden Tabelle sind alle für die qRT-PCR eingesetzten Primer aufgelistet.

Tabelle 14: Primer für die RT-PCR

	forward	reverse
DSG2	5'-CGCACCAGGAAAGTACCAG-3'	5'-CCACAGTGGCATATCAACAGC-3'
ACTB	5'-TTCGTTGCCGGTCCACA-3'	5'-ACCAGCGCAGCGATATCG-3'

Pro Reaktionsansatz wurden 350 nmol/l des jeweiligen „forward“ bzw. „reverse“ Primers in einem 20 µl Reaktionsansatz entsprechend der Anleitung zum EvaGreen Supermix eingesetzt.

Folgendes Programm wurde für die qRT-PCR verwendet.

Tabelle 15: Programm für die qRT-PCR

	Temperatur	Zeit
1.	95°C	2 min
2.	95°C	5 s
3.	56°C	3 s
4.	40 Zyklen ab Schritt 2.	
5.	Schmelzkurve: 60°C-95°C mit einer Steigerung von 0,5°C für 5 s	
6.	10°C	bis zur Entnahme aus dem Gerät

Alle Messungen wurden im Duplikat durchgeführt. Zur Berechnung der relativen mRNA-Expression von DSG2 wurde die DSG2-Expression auf die Expression des Referenzgenes ACTB normalisiert. Da die Reaktionseffizienz (E) beider Primerpaare bei annähernd 100% lag, wurde für E der Wert 2 eingesetzt. Des Weiteren wurde der sogenannte Quantifizierungszyklus (engl. quantification cycle, C_t), d.h. der Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal den gesetzten Schwellwert überschreitet, in die Berechnung mit einbezogen. Somit wurde die relative DSG2-mRNA-Expression nach folgender Formel berechnet: relative DSG2-mRNA-Expression = 2^(Ct ACTB - Ct DSG2)

2.2.13. Grafische Darstellung und statistische Auswertung der Datensätze

Western Blot-Banden wurden mittels der Software ImageJ ausgewertet und in Säulendiagrammen grafisch dargestellt. Angegebene Fehlerbalken repräsentieren die ermittelten Werte für den Standardfehler (SEM). Auf statistische Signifikanz (p) wurde entweder mit dem t-Test oder mittels ANOVA, gefolgt von einer Bonferroni-Korrektur für Probengruppen, bei denen sich mehrere Gruppen auf eine Kontrollgruppe beziehen, geprüft. Eine statistische Signifikanz wurde für alle Werte für p<0,05 festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. Dsg2 und Dsg3 zeigen eine spezifische Expression in humanen Hautproben

Zunächst wurde die Expression von Dsg2 und Dsg3 in humanen Hautproben, die aus der Schulter- und Oberarmregion von Körperspendern der Anatomischen Anstalt München vor Beginn des Fixierungsprozesses entnommen wurden, untersucht. Dazu wurden diese Proben eingebettet und gegen Dsg2 und Dsg3 immungefärbt (Abb. 6). Die für Dsg2 in der Literatur beschriebene basale Färbung (Garrod und Chidgey, 2008; Getsios et al., 2004b; Waschke, 2008) konnte in diesen Präparaten mit dem verwendeten Antikörper (Dsg2-mAK, Klon 10G11, Progen) nicht nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich eine deutlich positive Färbung an den Keratinozyten der Haarfollikel, sodass eine mangelnde Funktionalität des Antikörpers ausgeschlossen werden konnte. Für Dsg3 bestätigte sich das in der Literatur beschriebene Verteilungsmuster vom Stratum basale zum Stratum spinosum (Getsios et al., 2004b; Waschke, 2008).

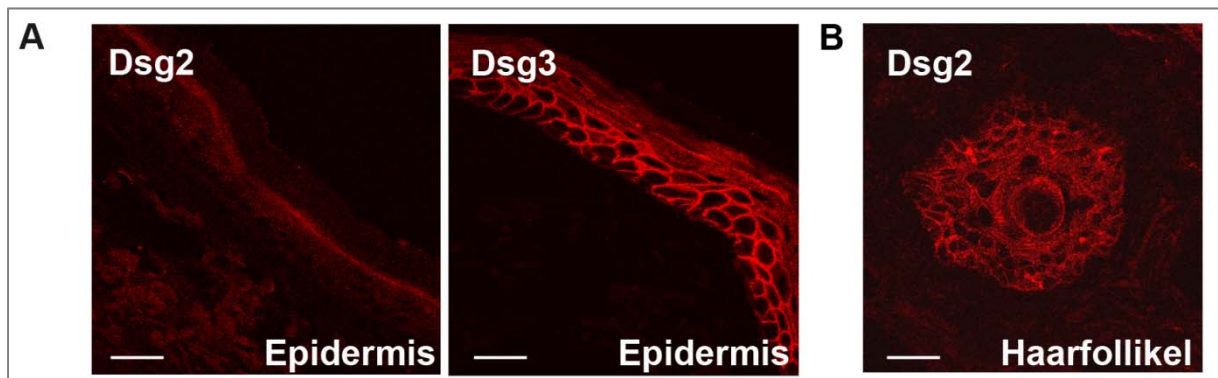


Abbildung 6: Nachweis von Dsg2 und Dsg3 in humanen Hautproben

(A) In humanen Hautproben konnte keine schichtspezifische Dsg2-Lokalisation (rot) nachgewiesen werden. Für Dsg3 (rot) zeigte sich eine deutliche Färbung im Stratum basale und Stratum spinosum der Epidermis. (Maßstabsskala=20µm; n=3) (B) In Haarfollikeln humaner Hautproben konnten hingegen deutlich Dsg2-positive Zellen (rot) identifiziert werden. (Maßstabsskala=20µm; n=3) [modifiziert nach (Hartlieb et al., 2013)]

3.2. Dsg2 und Dsg3 sind unterschiedlich an der Zellmembran von Keratinozyten lokalisiert

Zur weiteren Untersuchung der Rolle der beiden desmosomalen Cadherine Dsg2 und Dsg3 wurde das eingesetzte Zellkulturmodell im Hinblick auf die Expression der beiden Proteine untersucht. HaCaT-Zellen stammen aus einer immortalisierten Zelllinie humaner Epithelzellen, die ursprünglich aus der Peripherie eines primären malignen Melanoms der Rückenhaut eines 62-jährigen Patienten isoliert wurden (Boukamp et al., 1988). Die Herkunft der Zellen und die Bedingungen bei der Etablierung der Zelllinie sind in der Abkürzung „HaCaT“ enthalten, die für die englische Bezeichnung „human adult low Ca^{2+} high temperature“ steht. Bei der Kultivierung von HaCaT-Zellen spielt der Ca^{2+} -Gehalt des Kulturmediums eine entscheidende Rolle. Die Zellen sind in der Lage den für Keratinozyten bekannten Differenzierungsprozess auch unter Kulturbedingungen durchzuführen. Der Differenzierungsgrad steigt dabei mit zunehmender Ca^{2+} -Konzentration. Hohe Ca^{2+} -Konzentrationen ($>1,0$ mmol/l) führen daher zu einer terminalen Differenzierung. Für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurden HaCaT-Zellen stets unter physiologisch hohen Ca^{2+} -Konzentrationen (1,8 mmol/l) so kultiviert, dass die Zellen nach einem Zeitraum von vier Tagen einen zu 100% konfluenten Zellrasen bildeten. Dieser Zeitraum entspricht einem mittleren Differenzierungsgrad (Spindler et al., 2011). Zunächst wurden die Zellen unter diesen Bedingungen mittels Elektronenmikroskopie morphologisch untersucht. Rasterelektronenmikroskopie (REM) zeigte deutlich die Pseudopodien mit denen benachbarte Zellen miteinander in Kontakt stehen (Abb. 7 B, Pfeil) und durch Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) konnte hier die Lokalisation der Desmosomen nachgewiesen werden (Abb. 8, Pfeile).

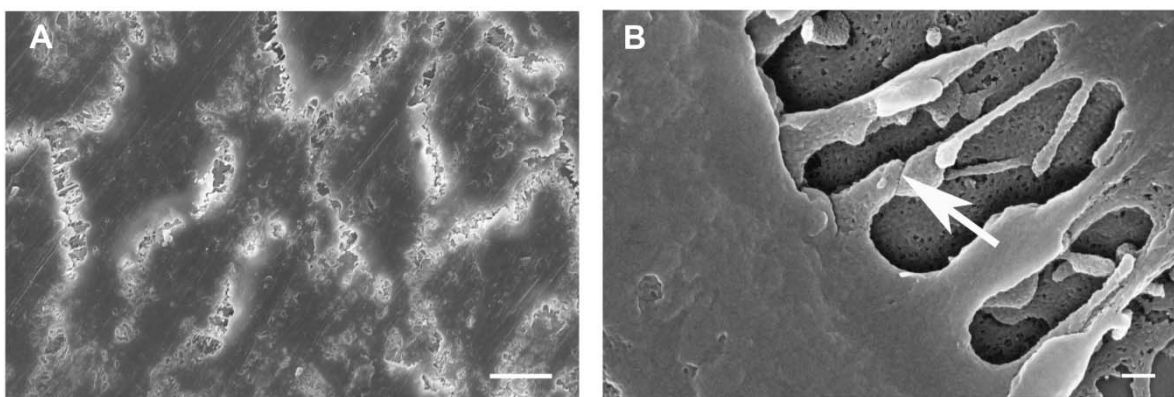


Abbildung 7: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von HaCaT-Zellen

HaCaT-Zellen wurden für vier Tage in Medium mit einer Ca^{2+} -Konzentration von 1,8 mmol/l kultiviert und anschließend mittels REM untersucht. Zwischen den Keratinozyten sind deutlich die Kontakte zur Nachbarzelle zu erkennen. [(A) Maßstabsskala=10 μm (B) Maßstabsskala=200nm]

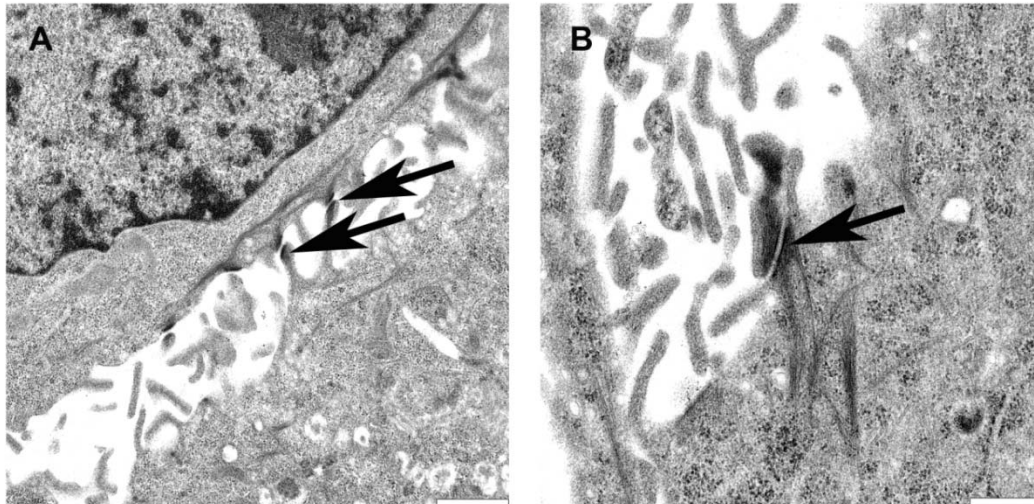


Abbildung 8: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von HaCaT-Zellen

HaCaT-Zellen wurden für vier Tage in Medium mit einer Ca^{2+} -Konzentration von 1,8 mmol/l kultiviert und anschließend mittels TEM untersucht. An den zuvor mittels REM identifizierten Zellkontakten waren hier Desmosomen nachzuweisen. [(A) Maßstabsskala=1000nm (B) Maßstabsskala=500nm]

Mittels Immunfluoreszenzmarkierung konnte eine Dsg2- und eine Dsg3-Expression nachgewiesen werden. Beide Proteine waren unter den hier angewandten Kulturbedingungen an der Zellmembran lokalisiert (Abb. 9). Auch für weitere desmosomale Cadherine (Dsc2 und Dsc3) konnte eine membranständige Lokalisation nachgewiesen werden. Dsg1 und Dsc1 waren zu diesem Zeitpunkt nicht an der Zellmembran nachweisbar, was in Übereinstimmung mit früheren Studien ist (Waschke et al., 2005). Die Expression von Dsg4 wurde in dieser Studie nicht untersucht, da Dsg4 nur in hoch differenzierten Keratinozyten exprimiert ist (Bazzi et al., 2006).

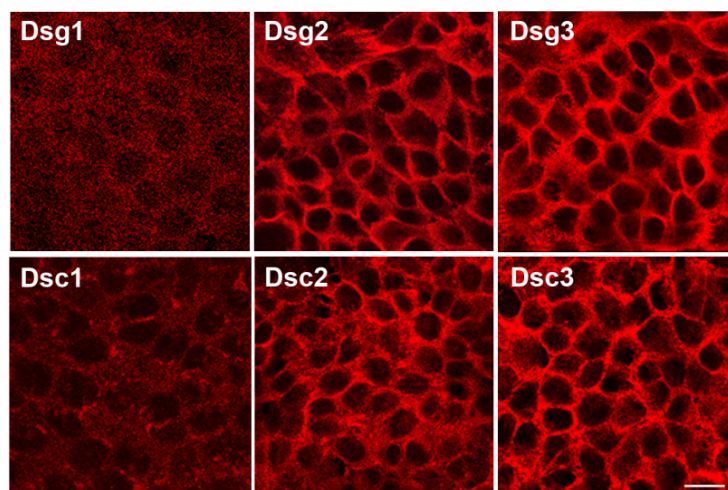


Abbildung 9: Expressionsprofil verschiedener desmosomaler Cadherine in HaCaT-Zellen

Nach vier Tagen Kultivierung mit 1,8 mmol/l Ca^{2+} konnte mittels Immunfluoreszenzdarstellung eine eindeutige Membranlokalisierung für Dsg2, Dsg3, Dsc2 und Dsc3 nachgewiesen werden. (Maßstabsskala=20µm; n=3) [modifiziert nach (Hartlieb et al., 2013)]

Interessanterweise zeigte sich für Dsg2 teilweise eine punktförmige Verteilung an der Zellmembran, im Gegensatz zu einer häufiger linearisierten und damit kontinuierlichen Verteilung von Dsg3 (Abb. 10).

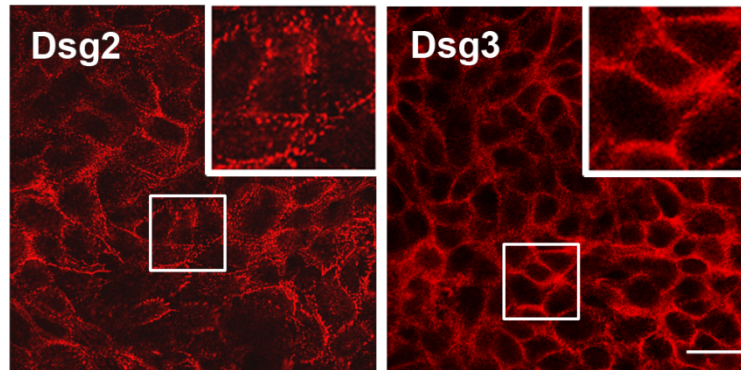


Abbildung 10: Detaillierte Immunfluoreszenzdarstellung von Dsg2 und Dsg3 in HaCaT-Zellen
Nach vier Tagen Kultivierung mit 1,8 mmol/l Ca^{2+} zeigte sich teilweise eine punktförmige Verteilung von Dsg2 an der Zellmembran, während Dsg3 an vielen Stellen deutlich linearisierter angeordnet war. (Maßstabsskala=20 μm ; n=3)
[modifiziert nach (Hartlieb et al., 2013)]

Um zellspezifische Effekte auszuschließen, wurde außerdem eine zusätzliche Keratinozyten-Zelllinie hinsichtlich ihrer Expression der desmosomalen Cadherine untersucht und in den im Folgenden beschriebenen Dissoziationsversuchen eingesetzt. Die verwendete SCC9-Zelllinie wurde ursprünglich aus einem Plattenepithelkarzinom der Zunge eines 25-jährigen Mannes isoliert (Rheinwald und Beckett, 1981). Auch diese Zellen wurden bis zur Konfluenz (fünf Tage) in Medium mit einer Ca^{2+} -Konzentration von 1,8 mmol/l kultiviert. Unter diesen Kulturbedingungen war eine vergleichbare Membranlokalisation von Dsg2 und Dsg3 nachweisbar und im Western Blot zeigte sich ein ähnliches Expressionsmuster der desmosomalen Cadherine wie in HaCaT-Zellen, sogar mit einer deutlicheren Dsg1-Expression (Abb. 11).

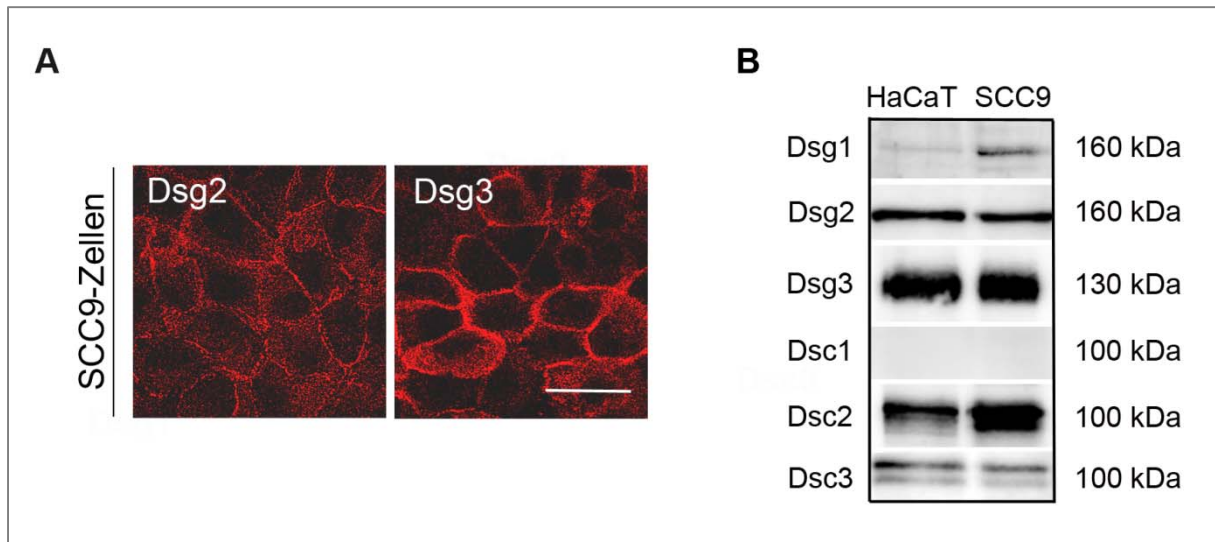


Abbildung 11: Charakterisierung der SCC9-Zellen hinsichtlich der Expression desmosomaler Cadherine

(A) Immunfluoreszenzdarstellung von Dsg2 (rot) und Dsg3 (rot) in SCC9-Zellen nach einer Kultivierung von fünf Tagen in Medium mit einem Ca^{2+} -Gehalt von 1,8 mmol/l. (Maßstabsskala=20µm; n=3) (B) Expressionsprofil desmosomaler Cadherine in für fünf Tage kultivierten HaCaT- und SCC9-Zellen. Dargestellt ist die Detektion der jeweiligen Proteine mittels Western Blot. (n=3) [modifiziert nach (Hartlieb et al., 2013)]

Um das Verteilungsmuster der beiden Proteine an der Zellmembran und die Verankerung am Zytoskelett der HaCaT-Zellen genauer zu untersuchen, wurde eine Triton-X-100-vermittelte Zellfraktionierung durchgeführt. Triton-X-100 ist ein Detergens, das die nicht mit dem Zytoskelett verbundenen Proteine aus dem Zellverband herauslöst. Die Zytoskelett-gebundenen Proteine befinden sich somit in der Triton-X-100-unlöslichen Fraktion. Da Desmoplakin (DP) nur in der Zytoskelett-gebundenen Fraktion vorkommt, diente dieses Protein als Marker für dieses Kompartiment. Nach erfolgter Zellfraktionierung wurden die beiden Fraktionen mittels Western Blot hinsichtlich Dsg2 und Dsg3 untersucht (Abb. 12). Dabei zeigte sich ein deutlich prominenteres Vorhandensein von Dsg3 in der Zytoskelett-ungebundenen und damit extradesmosomalen Fraktion (18,62% der Gesamtproteinmenge von Dsg3) im Vergleich zu Dsg2 (4,35% der Gesamtproteinmenge von Dsg2), das überwiegend in Zytoskelett-gebundener Form vorlag (95,65% der Gesamtproteinmenge).

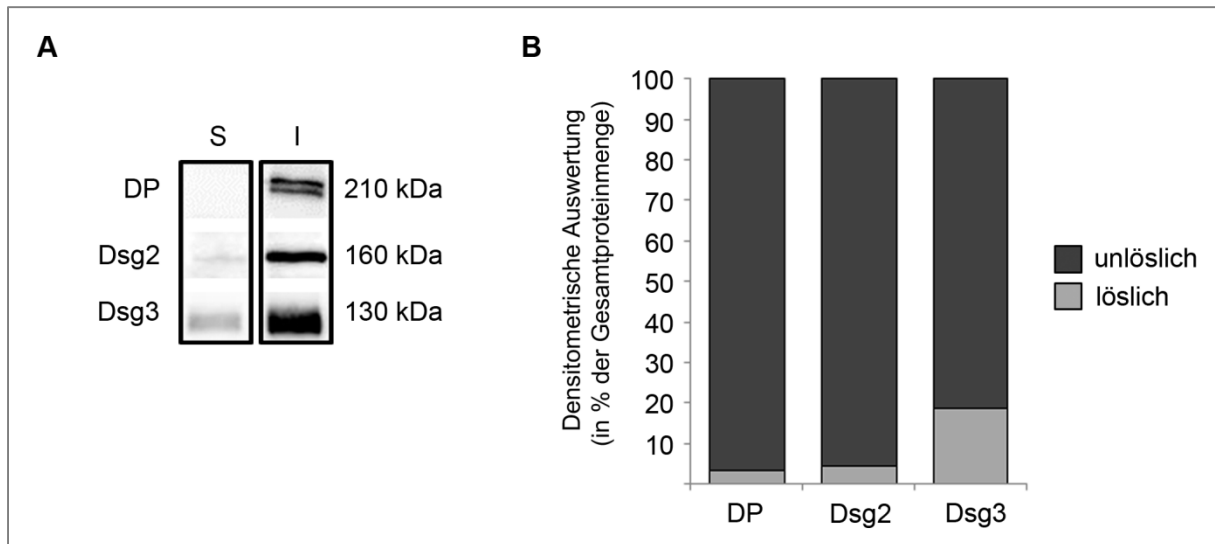


Abbildung 12: Verteilungsmuster von Dsg2 und Dsg3 zwischen der Zytoskelett-ungebundenen und -gebundenen Proteinfraction

(A) Detektion von DP, Dsg2 und Dsg3 mittels Western Blot nach erfolgter Zellfraktionierung durch Triton-X-100 in eine Triton-lösliche, Zytoskelett-ungebundene (engl. soluble; S) und eine Triton-unlösliche, zytoskelett-gebundene (engl. insoluble; I) Fraktion. (n=4) (B) Grafische Darstellung der Bandenintensität für DP, Dsg2 und Dsg3 nach erfolgter Zellfraktionierung. In dunkelgrau ist der prozentuale Anteil des jeweiligen Proteins in der Triton-X-100-unlöslichen Fraktion dargestellt. Der hellgraue Balken spiegelt den Anteil des jeweiligen Proteins dar, der in der Triton-X-100-löslichen Fraktion nachgewiesen wurde. (n=4) [modifiziert nach (Hartlieb et al., 2014)]

Somit konnten Kulturbedingungen für HaCaT-Zellen ermittelt werden, unter denen eine Lokalisation von Dsg2 und Dsg3 an der Zellmembran nachzuweisen ist. HaCaT-Zellen stellen also ein geeignetes *in vitro*-Modell zur Untersuchung der Rollen von Dsg2 und Dsg3 dar.

3.3. Die durch Antikörper gestörte Haftung von Dsg2 führt im Gegensatz zu Dsg3 nicht zu einem Adhäsionsverlust

Der Identifizierung von Dsg3 als Antigen der Autoantikörper im Serum von PV-Patienten folgten zahlreiche Untersuchungen, die belegten, dass Dsg3 ein entscheidendes Protein zur Gewährleistung der Zelladhäsion in Keratinozyten ist. Unter anderem wurde in Zellkulturmodellen nachgewiesen, dass AK23, ein monoklonaler, pathogener und gegen Dsg3 gerichteter Antikörper, der aus einem PV-Mausmodell gewonnen wird, zu einem Haftungsverlust in Keratinozyten und einer direkten Inhibition der Dsg3-Haftung führt (Heupel et al., 2008; Tsunoda et al., 2003). Außerdem wurde für Dsc3 gezeigt, dass ein spezifischer Antikörper, der gegen die extrazelluläre Domänen von Dsc3 gerichtet ist, homophile Bindungen dieses desmosomalen Cadherins blockiert (Spindler et al., 2009). Um nun zu untersuchen, ob auch ein gegen die extrazelluläre Domänen von Dsg2 gerichteter Antikörper zu einem Haftungsverlust in Keratinozyten führt, wurden konfluente HaCaT-Zellen mit einem kommerziell erwerblichen, monoklonalen Dsg2-Antikörper (Dsg2-mAK; Klon 10G11) der Firma Progen für 24 Stunden inkubiert und anschließend Dispase-basierte Dissoziationsversuche durchgeführt. In ersten Vorversuchen wurde schnell deutlich, dass das in der Antikörper-Lösung zur Konservierung enthaltene Azid (0,09% NaN_3) zu einem Haftungsverlust der Keratinozyten führt. Der deutliche Haftungsverlust, der nicht auf den Dsg2-Antikörper zurückzuführen war, wurde dadurch nachgewiesen, dass die Zellen lediglich mit einer Azid-Lösung inkubiert und anschließend Scherstress unterworfen wurden. Um diesen verfälschenden Effekt zu vermeiden, wurde auf Anfrage bei der Firma Progen der Antikörper eigens für diese Versuche ohne Azid produziert. HaCaT-Zellen wurden für 24 Stunden mit diesem Azid-freien Dsg2-Antikörper und vergleichsweise mit ebenfalls Azid-freiem AK23 in verschiedenen Konzentrationen (2,5-12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert. Mit PBS behandelte Zellen dienten als Kontrolle. Nach der Durchführung des Dissoziationsversuches konnte eine im Vergleich zur Kontrolle (Anzahl der Fragmente \pm Standardfehler: $1,4 \pm 0,1$) erhöhte Anzahl der Fragmente nur nach Inkubation mit AK23 detektiert werden ($16,1 \pm 4,9$; bei einer Konzentration von 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Abb. 13). Selbst nach einer Inkubation mit 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ des Dsg2-mAK war kein deutlicher Haftungsverlust erkennbar ($2,1 \pm 0,7$). Für diese Experimente wurden die konfluenten Zellrasen nach dem Ablösen mit Dispase fünfmal mit einer elektrischen Pipette auf und ab pipettiert und somit einem genau definierten Scherstress ausgesetzt. In einem weiteren Experiment wurden die Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Dsg2-mAK bzw. AK23 einem erhöhten Scherstress unterworfen (zehnmaliges pipettieren). Die Anzahl der Fragmente nach AK23-Inkubation nahm dabei drastisch zu ($66,0 \pm 12,0$), wohingegen nach Dsg2-mAK-Inkubation ($6,2 \pm 1,9$) das Kontrollniveau nicht

überschritten wurde ($8,7 \pm 2,2$). Um auszuschließen, dass es sich hierbei um zellspezifische Effekte handelt, wurden die Dissoziationsversuche auch in SCC9-Zellen durchgeführt (Kontrollbedingungen: $5,4 \pm 1,4$). Auch hier war eine Beeinträchtigung der Zellhaftung nur durch AK23 ($21,4 \pm 4,6$) und nicht durch Inkubation mit Dsg2-mAK nachzuweisen ($8,6 \pm 2,1$).

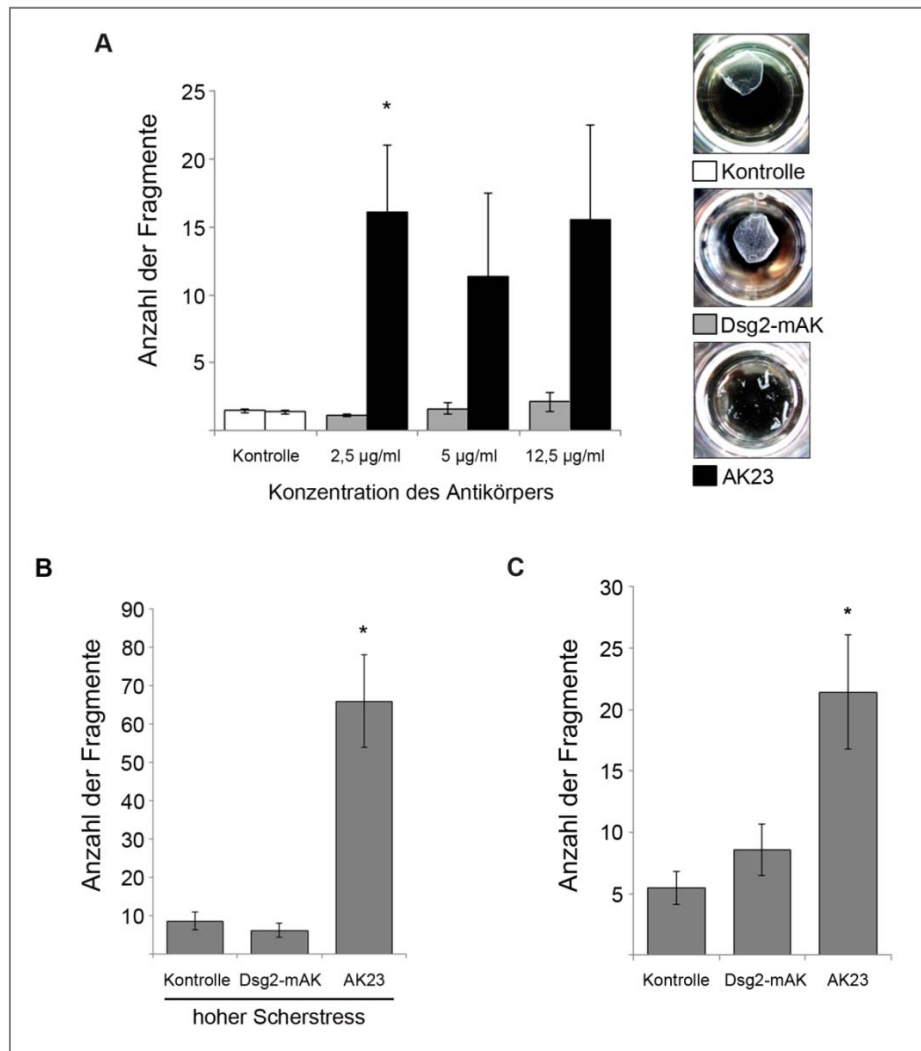


Abbildung 13: Effekte der Antikörper-induzierten Modulation der Dsg2- bzw. Dsg3-Haftung

(A) HaCaT-Zellen wurden nach einer dreitägigen Kultivierung in Medium mit einer Ca^{2+} -Konzentration von 1,8 mmol/l mit verschiedenen Konzentrationen eines monoklonalen Dsg2-(Dsg2-mAK) bzw. eines monoklonalen Dsg3-Antikörpers (AK23) für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde ein Dissoziationsversuch durchgeführt. In der Grafik sind die Mittelwerte der Fragmentanzahl pro Versuchsbedingung dargestellt. (weiß = Kontrolle; grau = Dsg2-mAK; schwarz = AK23) ($n=8$; * $p<0,05$ im Vergleich zur Kontrolle) Am rechten Abbildungsrand sind repräsentative Fotoaufnahmen einzelner Zellkulturgefäße nach Durchführung des Dissoziationsversuches abgebildet. Die Versuchsbedingung ist unter den einzelnen Aufnahmen beschrieben. (B) Auswertung der Dissoziationsversuche, bei denen beide Antikörper jeweils in einer Konzentration von 2,5 µg/ml für 24 Stunden inkubiert und die Zellen anschließend einem doppelt so hohen Scherstress wie unter den Versuchsbedingungen der Abbildung (A) unterworfen wurden. ($n=6$; * $p<0,05$ im Vergleich zur Kontrolle) (C) Auch in SCC9-Zellen war mittels Dissoziationsversuch ein Haftungsverlust nur nach 24-stündiger Inkubation mit AK23 (2,5 µg/ml), nicht aber mit Dsg2-mAK (2,5 µg/ml) erkennbar. ($n \geq 7$, * $p<0,05$ im Vergleich zur Kontrolle) [modifiziert nach (Hartlieb et al., 2013)]

Um zu untersuchen, ob die unterschiedlichen Effekte der beiden monoklonalen Antikörper auf die Zelladhäsion in Keratinozyten auf Unterschiede in der bindungsblockierenden Effektivität oder der Zugänglichkeit der Antikörper zu ihrem jeweiligen Zielprotein zurückzuführen sind, wurden diese Antikörpereigenschaften näher charakterisiert. Mittels AFM wurde zunächst nachgewiesen, dass der Dsg2-mAK in der Lage ist, homophile Bindungen zwischen rekombinanten Dsg2-Proteinen signifikant zu blockieren (Bindungshäufigkeit in % der Kontrolle: $51,3\% \pm 3,7\%$) (Abb. 14 A). Auch für diese Experimente wurde der Azid-freie Antikörper eingesetzt. Auf homophile Dsg3-Bindungen konnte mit dem Dsg2-spezifischen Antikörper kein Effekt nachgewiesen werden ($128,8\% \pm 42,9\%$). Im Unterschied dazu konnte durch Inkubation mit AK23 eine deutliche Reduzierung der homophilen Dsg3-Bindungshäufigkeit erreicht werden ($52,1\% \pm 8,4\%$), während kein Einfluss auf homophile Dsg2-Bindungen zu erkennen war ($115,4\% \pm 12,2\%$). Die AFM Experimente zeigen deutlich, dass beide Antikörper in der Lage sind, homophile Bindungen ihres Zielproteins im zellfreien System durch sterische Hinderung zu blockieren. Um zu untersuchen, ob die beiden Antikörper aufgrund der Verteilung von Dsg2 und Dsg3 an der Zellmembran in Keratinozyten (Abb. 10 und 12) unterschiedlichen Zugang zu ihrer Zielstruktur haben, wurden HaCaT-Zellen für 24 Stunden mit Dsg2-mAK bzw. AK23 (jeweils $2,5 \mu\text{g/ml}$) inkubiert und anschließend eine Triton-X-100-vermittelte Zellfraktionierung durchgeführt (Abb. 14 B). Mittels Western Blot konnte sowohl die schwere, als auch die leichte Kette beider Antikörper in der Triton-unlöslichen d.h. der Zytoskelett-gebundenen, Desmosomen-enthaltenden Proteinfraction detektiert werden. Dazu wurde die Western Blot-Membran lediglich für zwei Stunden bei RT mit einem gegen murine Antikörper gerichteten HRP-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert (gam-HRP = gam-pox). Für AK23 konnte im Vergleich zu Dsg2-mAK eine deutliche Bindung nachgewiesen werden, sodass nicht auszuschließen ist, dass eine kritische Menge in den Desmosomen nicht erreicht wurde.

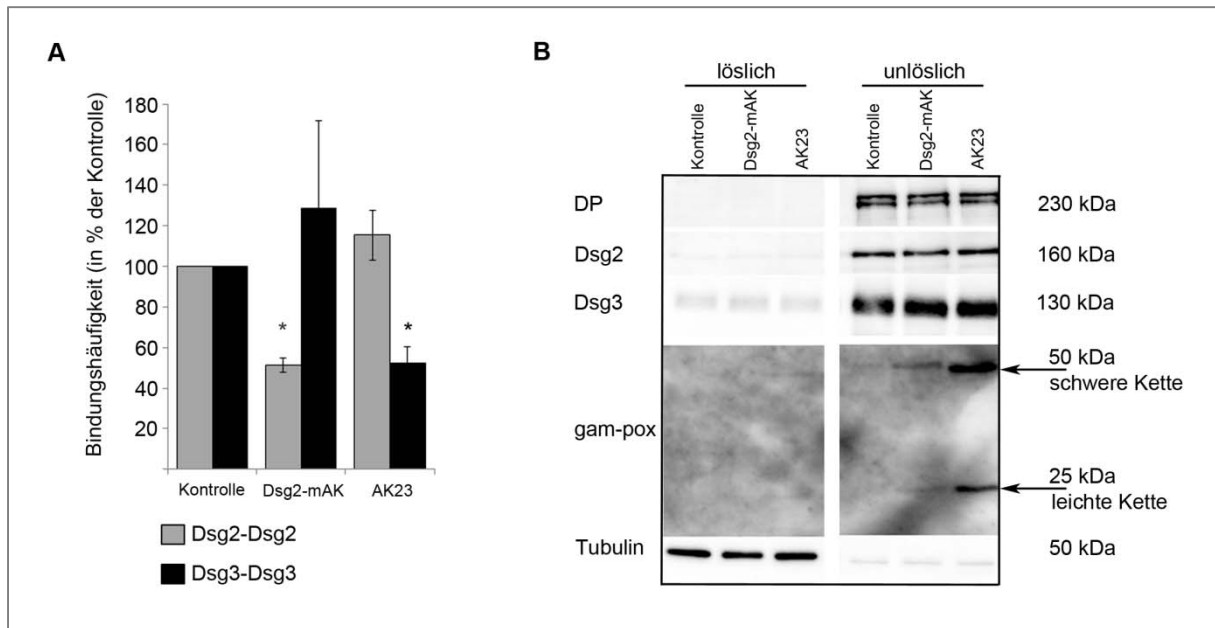


Abbildung 14: Untersuchungen zur Effektivität von Dsg2-mAK und AK23

(A) Grafische Darstellung der Bindungshäufigkeit für homophile Dsg2 (grau) bzw. homophile Dsg3 (schwarz) Bindungsereignisse, die mittels AFM gemessen wurden. Für jede Bedingung wurden mindestens zwei unabhängige Messungen mit jeweils $n > 1000$ Kraft-Abstandsmessungen durchgeführt. Bei jeder Messung kamen neue mit dem entsprechenden Protein funktionalisierte AFM-Spitzen und Probenoberflächen zum Einsatz. (* $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle) (B) Repräsentativer Western Blot zum Nachweis der Antikörper-Bindung nach 24-stündiger Inkubation mit Dsg2-mAK bzw. AK23 (jeweils $2,5 \mu\text{g/ml}$) an konfluenten HaCaT-Zellen. Dargestellt ist die Detektion der schweren und leichten Kette der beiden Antikörper in der Triton-unlöslichen Proteinfraktion. ($n=3$) [modifiziert nach (Hartlieb et al., 2013)]

Daher wurde die Enterozyten-Zelllinie Caco-2 für weitere Experimente verwendet. Aus Arbeiten von Schlegel und Kollegen ist bekannt, dass die Dsg2-vermittelte Haftung eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der Integrität der Barriere im Darmepithel spielt. Ein für diese Studien eigens generierter Antikörper, der gegen die extrazelluläre Domänen von Dsg2 gerichtet ist, blockierte homophile Dsg2-Bindungen in AFM-Experimenten und führte in Dissoziationsversuchen zu einem Adhäsionsverlust in Caco-2-Zellen (Schlegel et al., 2010). Um die Effektivität des in den Experimenten der vorliegenden Arbeit eingesetzten Dsg2-mAK zu überprüfen, wurden Caco-2-Zellen für 24 Stunden mit $2,5 \mu\text{g/ml}$ des Azid-freien Dsg2-mAK inkubiert und anschließend Dissoziationsversuche durchgeführt. Die von Schlegel und Kollegen beschriebenen Ergebnisse konnten auch mit diesem Antikörper nachvollzogen und somit ein weiterer Beweis für die Effektivität des Antikörpers erbracht werden (Abb. 15).

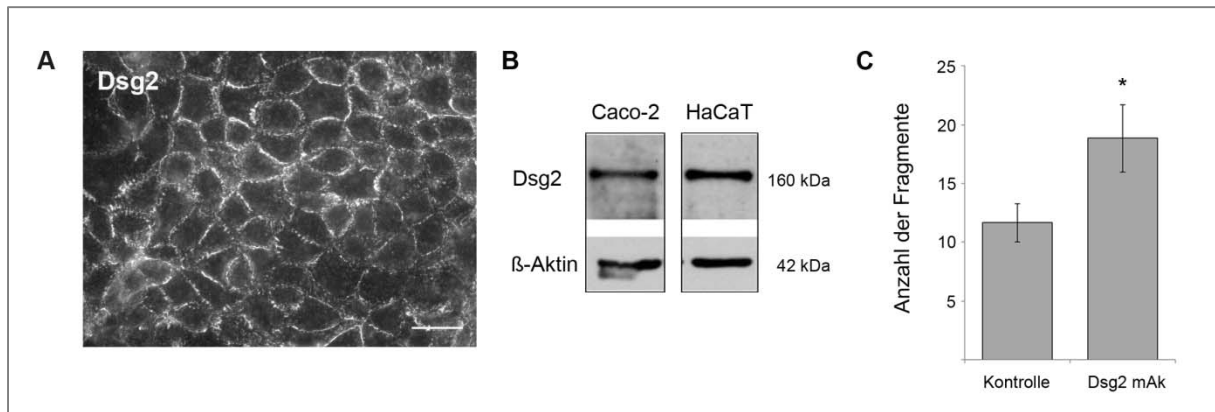


Abbildung 15: Relevanz von Dsg2 für die Zelladhäsion von Darmepithelzellen

(A) Immunfluoreszenzdarstellung von Dsg2 in Caco-2-Zellen, die für 14 Tage in Medium mit einer Ca^{2+} -Konzentration von 1,8 mmol/l kultiviert wurden. (Maßstabsskala=20 μm) (B) Repräsentative Western Blot-Analyse zur vergleichenden Proteinexpression von Dsg2 in Caco-2- und HaCaT-Zellen. Caco-2-Zellen wurden für 14 Tage und HaCaT-Zellen für vier Tage in Kulturmedium mit einer Ca^{2+} -Konzentration von 1,8 mmol/l kultiviert. β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. (C) Grafische Darstellung der Fragmentanzahl der Dissoziationsversuche in Caco-2-Zellen, nach 24-stündiger Inkubation mit 2,5 $\mu\text{g/ml}$ des Azid-freien Dsg2-mAK. ($n \geq 20$; * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle) [modifiziert nach (Hartlieb et al., 2013)]

3.4. siRNA-induzierte Depletion von Dsg2 resultiert nur unter erhöhter mechanischer Belastung in einem Adhäsionsverlust

In weiteren Versuchen sollte ausgeschlossen werden, dass die verschiedenen Effekte der beiden monoklonalen Antikörper auf einer unterschiedlichen Affinität der Antikörper zu ihrem Zielprotein im Zellkultursystem basieren. Um nun gezielt die Rollen von Dsg2 und Dsg3 für die Mechanismen der Zelladhäsion in Keratinozyten zu untersuchen, wurde eine transiente siRNA-induzierte Reduktion der Dsg2- bzw. Dsg3-Proteinexpression etabliert. Dazu wurden HaCaT-Zellen mit Dsg2- bzw. Dsg3-spezifischer siRNA transfiziert. Für Kontrolluntersuchungen und zur Vermeidung von durch die Transfektion hervorgerufenen Artefakten wurden HaCaT-Zellen mit einer unspezifischen siRNA (engl. non-targeting siRNA; n.t.-siRNA) und sonst gleichen Transfektionsbedingungen behandelt. Die erfolgreiche Reduzierung der Proteinmenge konnte mittels Immunfluoreszenzmarkierung (Abb. 16) sowie Western Blot-Analyse (Abb. 18) des entsprechenden desmosomalen Cadherins nachgewiesen werden.

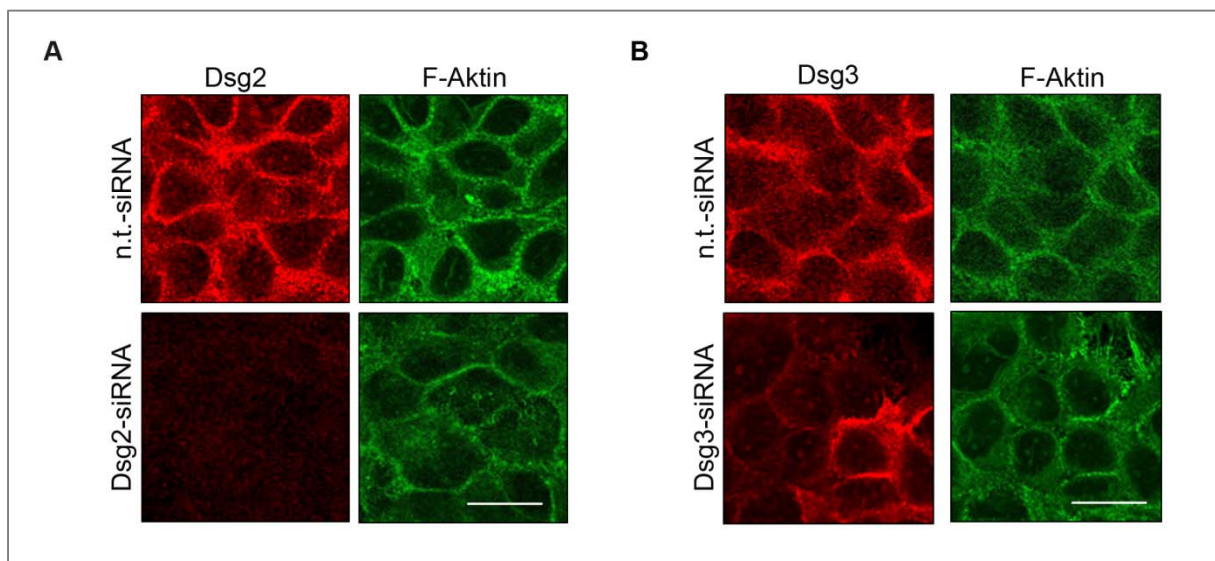


Abbildung 16: Immunfluoreszenzdarstellung nach siRNA-induzierter Depletion von Dsg2 und Dsg3 in HaCaT-Zellen

(A) Immunfluoreszenzdarstellung von Dsg2 (rot) und F-Aktin (grün) in HaCaT-Zellen nach Transfektion mit n.t.- bzw. Dsg2-siRNA. (Maßstabsskala=20µm; n=3) (B) Immunfluoreszenzdarstellung von Dsg3 (rot) und F-Aktin (grün) in HaCaT-Zellen nach Transfektion mit n.t.- bzw. Dsg3-siRNA. (Maßstabsskala=20µm; n=3) F-Aktin wurde mit Alexa Fluor® 488 Phalloidin angefärbt. [modifiziert nach (Hartlieb et al., 2013)]

Drei Tage nach erfolgter Transfektion wurden mit diesen Zellen Dissoziationsversuche durchgeführt (Abb. 17). Entsprechend der Versuche nach Antikörper-Inkubation konnte nur in den Dsg3-depletierten Zellen ein Adhäsionsverlust nachgewiesen werden (Anzahl der Fragmente \pm Standardfehler: $13,8 \pm 2,4$). Die Fragmentanzahl erreichte ähnliche Werte wie nach AK23-Inkubation ($23,0 \pm 2,1$). Eine Depletion von Dsg2 führte hingegen nicht zu einer gesteigerten Fragmentanzahl ($2,1 \pm 0,3$). Interessanterweise konnten die Dsg2-depletierten Zellen nach einer deutlichen Erhöhung des Scherstresses (zwölfmaliges auf und ab pipettieren, statt fünfmaliges) den Scherkräften nicht standhalten und zeigten unter dieser Bedingung eine signifikante Steigerung der Anzahl der Fragmente ($23,3 \pm 3,6$) im Vergleich zur Kontrolle ($8,2 \pm 1,8$).

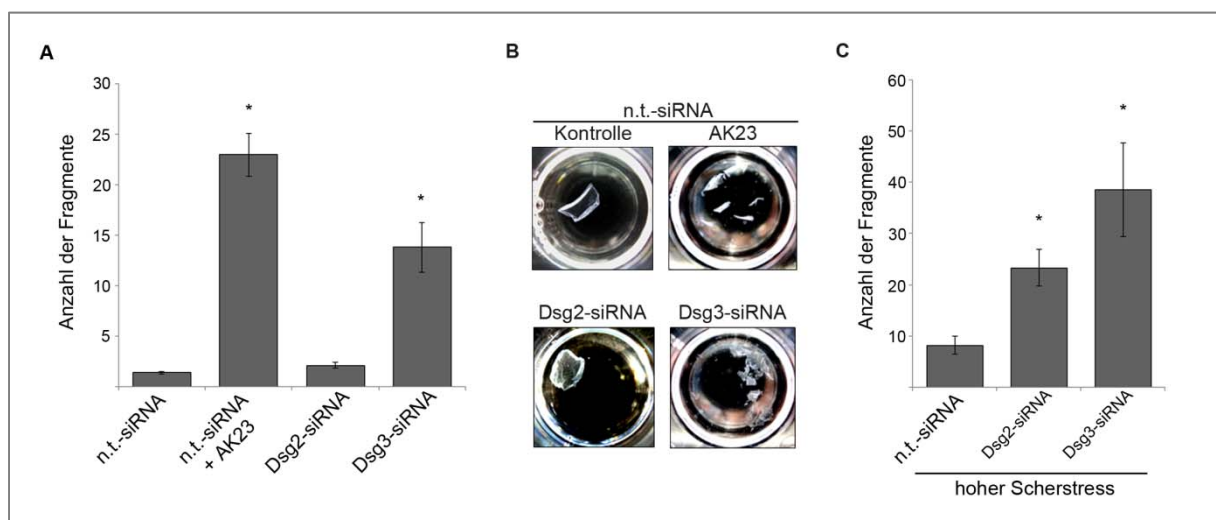


Abbildung 17: Dissoziationsversuche in HaCaT-Zellen nach Transfektion mit siRNA

(A) Grafische Darstellung der Mittelwerte der Fragmentanzahl nach Durchführung der Dissoziationsversuche unter Bedingungen, bei denen mit n.t.-siRNA transfizierte Zellen Werte zwischen eins und drei erreichten. ($n \geq 20$; * $p < 0,05$ im Vergleich zu n.t.-siRNA) (B) Repräsentative Fotoaufnahmen der Zellkulturgefäße nach Durchführung der Dissoziationsversuche. (C) Grafische Darstellung der Mittelwerte der Fragmentanzahl nach Durchführung der Dissoziationsversuche unter erhöhtem Scherstress. ($n \geq 5$; * $p < 0,05$ im Vergleich zu n.t.-siRNA) [modifiziert nach (Hartlieb et al., 2013)]

3.5. siRNA-induzierte Depletion von Dsg2 führt zu einer Reduzierung der Dsg3-Proteinmenge

Interessanterweise führte eine Behandlung der Zellen mit Dsg2-spezifischer siRNA zu einer signifikanten Reduktion der Dsg3-Proteinexpression (Proteinmenge nach erfolgter Dsg-spezifischer Transfektion in Prozent der Proteinmenge nach Transfektion mit n.t.-siRNA \pm Standardfehler: $71,7\% \pm 10,4\%$) (Abb. 18). Umgekehrt konnte keine Verminderung der Dsg2-Proteinexpression nach Behandlung mit Dsg3-siRNA nachgewiesen werden ($111,4\% \pm 8,0\%$). Die Proteinmengen von Dsc2 und E-Cadherin (Ecad) blieben sowohl nach Dsg2- als auch nach Dsg3-spezifischer siRNA-Transfektion unverändert.

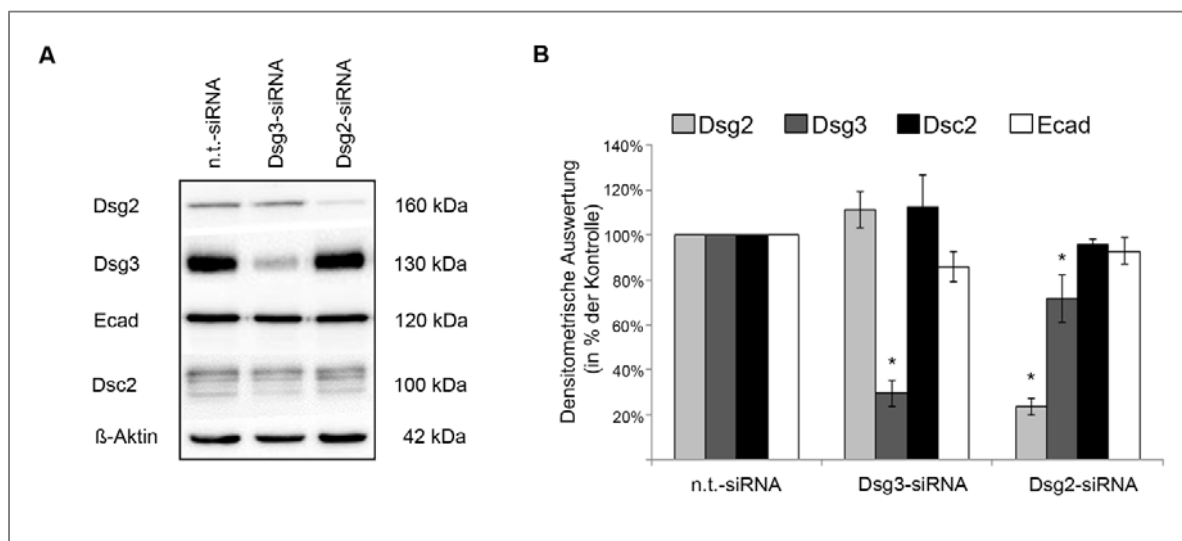


Abbildung 18: Western Blot-Analyse nach siRNA-induzierter Depletion von Dsg2 und Dsg3 in HaCaT-Zellen

(A) Repräsentativer Western Blot nach Transfektion von HaCaT-Zellen mit n.t.-, Dsg3- oder Dsg2-siRNA. β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. (n=6) (B) Densitometrische Auswertung der Bandenintensität für Dsg2, Dsg3, Dsc2 und Ecad nach Transfektion von HaCaT-Zellen mit n.t.-, Dsg3- oder Dsg2-siRNA. (n=6; * $p < 0,05$ im Vergleich zu n.t.-siRNA) [modifiziert nach (Hartlieb et al., 2013)]

Die Ergebnisse deuten an, dass sich desmosomale Cadherine gegenseitig in ihrer Expression beeinflussen können und dass Dsg2 in der Lage ist, das Vorhandensein von Dsg3 zu regulieren.

Zusammenfassend wurden in den ersten hier beschriebenen Versuche gezeigt, dass Dsg2 und Dsg3 ein unterschiedliches Expressionsmuster in humanen Hautbiopsien und an der Zellmembran von differenzierten Keratinozyten aufweisen. Weiterhin bestätigte sich die für die Zellhaftung entscheidende Rolle von Dsg3, die für Dsg2 nicht gezeigt werden konnte. Dsg2 scheint nur unter Bedingungen von erhöhter mechanischer Belastung als Adhäsionsmolekül von Bedeutung zu sein und darüber hinaus eine regulierende Funktion für die Dsg3-Proteinexpression in Keratinozyten auszuüben.

3.6. Die Störung der Dsg3-Haftung induziert einen p38MAPK-abhängigen Haftungsverlust in Dsg2-depletierten Keratinozyten

Es ist denkbar, dass Dsg2 nur unter von den Normalbedingungen abweichenden, eventuell auch bei pathologischen Veränderungen, eine für die Zelladhäsion relevante Rolle spielt. Um dies und das Zusammenspiel der beiden desmosomalen Cadherine Dsg2 und Dsg3 für die interzelluläre Adhäsion in Keratinozyten genauer zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Versuchsansätze gewählt, in denen die Funktion beider Proteine moduliert wurde.

Zum einen wurde eine simultane Depletion von Dsg2 und Dsg3 mittels siRNA in HaCaT-Zellen induziert und zum anderen wurden Dsg2-depletierte Zellen mit AK23 inkubiert, um zusätzlich die Funktion von Dsg3 zu modulieren (Abb. 19). Auch nach gleichzeitiger Transfektion mit Dsg2- und Dsg3-spezifischer siRNA wurde eine erfolgreiche Reduzierung der Proteinmengen beider Desmogleine erzielt. Interessanterweise zeigte sich in den unter diesen Bedingungen durchgeführten Dissoziationsversuchen eine drastische Fragmentierung der Zellverbände. Unter simultaner Modulation von Dsg2 und Dsg3 konnten HaCaT-Zellen schon geringstem Scherstress nicht standhalten. Gleiches galt für AK23-Behandlung unter alleiniger Dsg2-Depletion. Um zu untersuchen, ob dieses Phänomen allein durch den Verlust der beiden Membranproteine und einer daraus resultierenden mechanischen Destabilisierung begründet ist oder ob eventuell zelluläre Signalwege involviert sind, wurden die Zellen zusätzlich mit dem spezifischen p38MAPK-Inhibitor SB202190 für 24 Stunden inkubiert. Aufgrund des Nachweises erhöhter p38MAPK-Phosphorylierung in der Haut von PV-Patienten werden zahlreiche Studien zur Abhängigkeit des Haftungsverlust der Keratinozyten und vom p38MAPK-Signalweg durchgeführt (Berkowitz et al., 2008). Besonders die zeitliche Abfolge der beiden Ereignisse steht dabei im Fokus (Jolly et al., 2010; Mao et al., 2011). Sowohl der durch die simultane Dsg2-Dsg3-Depletion induzierte Haftungsverlust ($120,4 \pm 23,7$) als auch der AK23-induzierte Haftungsverlust in Dsg2-depletierten Zellen ($364,6 \pm 30,6$) wurden durch p38MAPK-Inhibition signifikant reduziert ($48,2 \pm 19,5$ bzw. $209,8 \pm 20,1$). Somit wurde ein erster Hinweis geliefert, dass auch unter diesen Versuchsbedingungen Signalwege involviert sind und in weitere Studien einbezogen werden müssen.

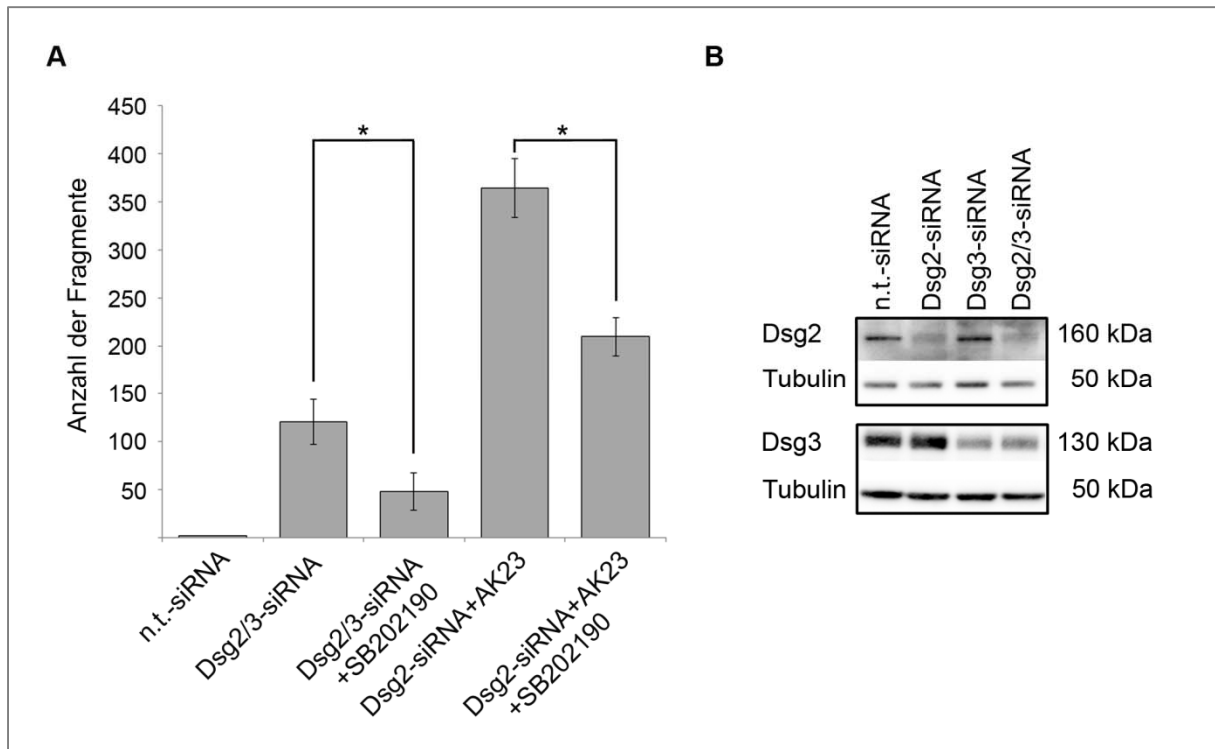


Abbildung 19: Dissoziationsversuche nach simultaner Modulation von Dsg2 und Dsg3 in HaCaT-Zellen (A) Grafische Darstellung der Mittelwerte der Fragmentanzahl der Dissoziationsversuche nach simultaner Modulation von Dsg2 und Dsg3, mit und ohne Inhibierung der p38MAPK durch SB202190. ($n \geq 6$; * $p < 0,05$) (B) Repräsentativer Western Blot zur Überprüfung der Depletions-Effizienz nach Dsg2-, Dsg3- und Dsg2/Dsg3-siRNA. ($n \geq 5$) [modifiziert nach (Hartlieb et al., 2014)]

Darüber hinaus geben diese Experimente erste Hinweise auf eine kompensatorische Funktion von Dsg2 unter Bedingungen einer reduzierten bzw. eingeschränkten Dsg3-Funktion.

3.7. Dsg3-Depletion verstärkt die Membranlokalisation von Dsg2 in Keratinozyten

Durch Immunfluoreszenzdarstellungen von Dsg2 nach erfolgter Dsg3-Depletion mittels siRNA in HaCaT-Zellen war es möglich, eine Aussage über mögliche Lokalisationsänderungen des Proteins zu treffen, die zur Gewährleistung der kompensatorischen Funktion notwendig sein könnten. In Zellen mit siRNA-vermittelter reduzierter Dsg3-Expression zeigte sich eine deutliche Zunahme der Dsg2-Färbung (Abb. 20). Zusätzlich änderte sich das eher punktförmige Erscheinungsbild der Dsg2-Membranfärbung (Abb. 10) und lies eine deutliche Linearisierung erkennen.

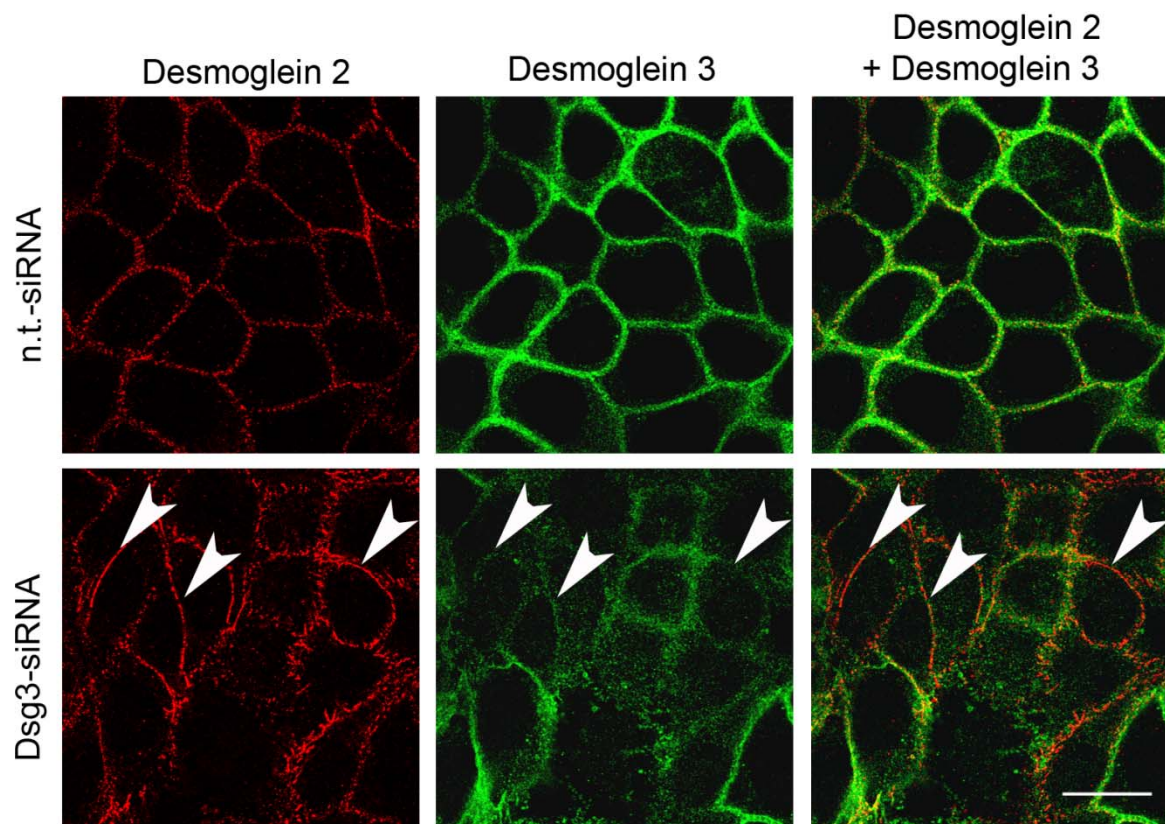


Abbildung 20: Immunfluoreszenzdarstellung von HaCaT-Zellen nach Transfektion mit Dsg3-siRNA. Dsg2 ist in rot dargestellt und Dsg3 in grün. In der dritten Spalte wurden Mischbilder aus den jeweiligen Aufnahmen von Dsg2 und Dsg3 erzeugt. In Zellen mit reduzierter Dsg3-Proteinexpression ist eine Zunahme und Linearisierung der Dsg2-Membranfärbung zu erkennen (Pfeilspitzen). (Maßstabsskala=20µm; n=3) [modifiziert nach (Hartlieb et al., 2014)]

3.8. Charakterisierung und Genotypisierung des transgenen Dsg3-Mausmodells

Dem desmosomalen Cadherin Dsg2 scheint unter Bedingungen einer eingeschränkten Dsg3-Funktion besondere Bedeutung für die interzelluläre Adhäsion in Keratinozyten zuzukommen. Um diese Hypothese aus Versuchen mit immortalisierten Kulturzellen zu verifizieren, wurden weitere Experimente mit primären Keratinozyten aus einem transgenen Dsg3-Mausmodell durchgeführt. Das von Stanley und Kollegen etablierte Mausmodell spiegelt den Phänotyp eines PV-Patienten wider (Koch et al., 1997). In Hautpräparaten homozygoter Mäuse, die kein Dsg3 exprimieren, ist eine deutliche suprabasale Spaltbildung in der Epidermis nachzuweisen. Diese Mauslinie (B6; 129X1-Dsg3^{tm1Stan}/J) wurde im Tierhaus der Ludwig-Maximilians-Universität München gehalten und eine heterozygote Zucht angesetzt. Die Tiere wurden zur Charakterisierung ihres spezifischen Phänotyps ab dem Zeitpunkt der Geburt in regelmäßigen Abständen optisch beurteilt. Der von Stanley und Kollegen beschriebene Phänotyp trat auch in dieser Zucht deutlich in Erscheinung. Die geringere Körpergröße und der Haarverlust der Dsg3^{-/-} Tiere waren bereits zum Zeitpunkt des Absetzens im Alter von drei Wochen bei den meisten Tieren zu erkennen (Abb. 21). Heterozygote Geschwistertiere zeigten keine optischen Auffälligkeiten. Zur Genotypisierung der Mäuse wurden entweder Schwanzspitzen oder die durch die Ohrmarkierungen anfallenden Ohrmuschelstücke bei drei Wochen alten Tieren entnommen und daraus die genomische DNA isoliert. Mit diesen Proben wurde eine PCR mit für murines DSG3 spezifischen Primern und eine zusätzliche PCR mit für das Neomycin-Resistenzgen spezifischen Primern durchgeführt. Bei heterozygoten Mäusen (Dsg3^{+/-}) kann sowohl DSG3 als auch das Neomycin-Resistenzgen nachgewiesen werden. Sogenannte Wildtyp-Mäuse (Dsg3^{+/+}) exprimieren kein Neomycin-Resistenzgen und bei für die Mutation homozygoten Mäusen (Dsg3^{-/-}) ist nur das Neomycin-Resistenzgen und kein DSG3 detektierbar.



Abbildung 21: Transgenes Dsg3-Mausmodell

(A) Repräsentative Fotoaufnahmen einer heterozygoten (+/-) und einer für die Mutation homozygoten (-/-) Maus des transgenen Dsg3-Mausmodells im Erwachsenenalter. (Pfeil: deutlicher Haarausfall an der Schnauze) (B) PCR Analyse zur Genotypisierung einer +/-, Wildtyp (+/+) und -/- Maus. [Abb. 21 B modifiziert nach (Hartlieb et al., 2014)]

3.9. Die PG-Proteinmenge ist in Dsg3^{-/-}-Keratinocyten reduziert

Zur Untersuchung der Dsg3^{-/-}-Mäuse hinsichtlich ihrer Dsg2-Expression wurden zunächst primäre Keratinocyten (MEK) aus der Epidermis neonataler Mäuse isoliert und bis zur 90%igen Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden anschließend für 24 Stunden mit einem Medium mit einem Ca²⁺-Gehalt von 1,8 mmol/l versetzt und dann mittels Western Blot die Dsg2- und PG-Expression untersucht (Abb. 22). Im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen waren keine Unterschiede in der Dsg2-Proteinexpression erkennbar (85,2% ± 25,5%). Im Gegensatz dazu war die PG-Proteinexpression in Folge des Fehlens von Dsg3 deutlich reduziert (43,9% ± 13,5%).

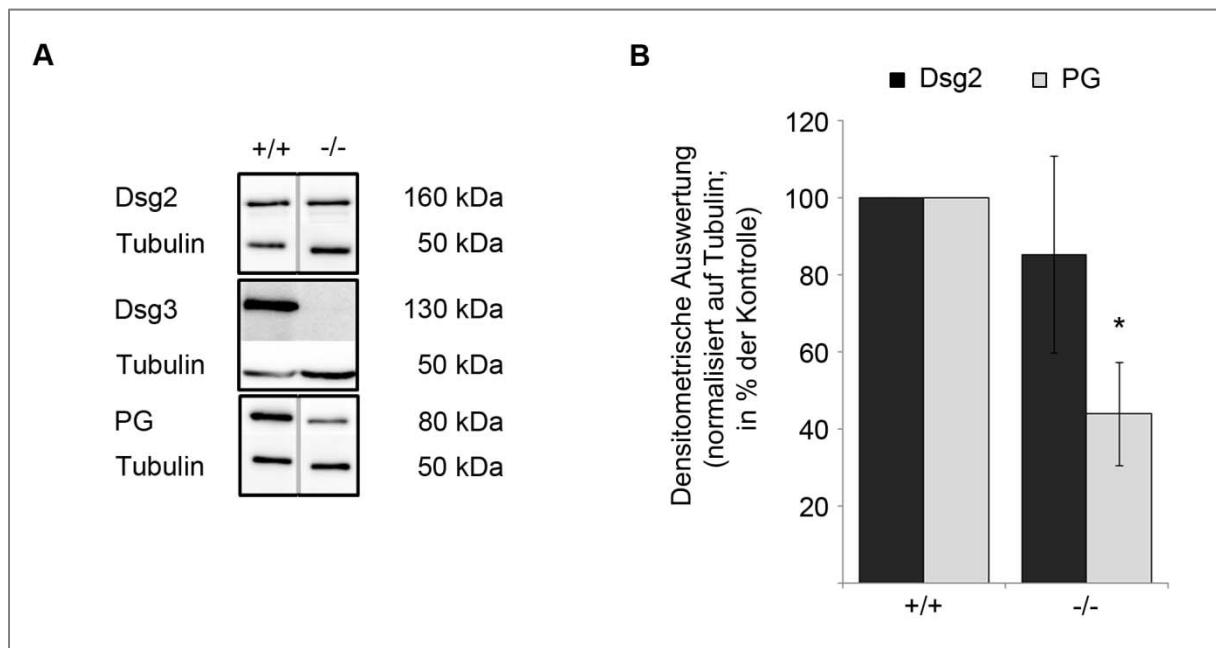


Abbildung 22: Proteinmengen von Dsg2 und PG in primären Keratinocyten aus dem transgenen Dsg3-Mausmodell

(A) Repräsentative Western Blots zur Detektion von Dsg2, Dsg3 und PG in primären murinen Dsg3^{+/+}- und Dsg3^{-/-}-Keratinocyten 24 Stunden nach Kultivierung in Medium mit 1,8 mmol/l Ca²⁺. α -Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. (n \geq 6) (B) Densitometrische Auswertung der Dsg2- und PG-Proteinexpression. Alle Werte wurden auf die Werte für α -Tubulin normalisiert und als Prozent der Proteinmengen in Dsg3^{+/+}-Keratinocyten berechnet. (n \geq 6; * p<0,05 im Vergleich zu Dsg3^{+/+}) [modifiziert nach (Hartlieb et al., 2014)]

3.10. Primäre Dsg3^{-/-}-Keratinocyten zeigen eine verstärkte Dsg2-Membranlokalisation und DSG2-mRNA-Expression

Wie in Abb. 20 gezeigt, war in Dsg3-depletierten HaCaT-Zellen eine deutliche Linearisierung der Dsg2-Membranfärbung nachweisbar. Daher wurden auch die primären murinen Dsg3^{-/-}-Keratinocyten mittels Immunfluoreszenz hinsichtlich der Dsg2-Lokalisation untersucht (Abb. 23 A). Erstaunlicherweise konnte nur in den Dsg3^{-/-}-Zellen eine positive Dsg2-Membranlokalisation festgestellt werden. In den Dsg3^{+/+}-Zellen war hingegen kaum eine Dsg2-Färbung zu erkennen. Außerdem führte, trotz der unveränderten Dsg2-Proteinmenge (Abb. 22), der komplette Dsg3-Verlust zu einer gesteigerten DSG2-mRNA-Expression in den primären murinen Dsg3^{-/-}-Keratinocyten, was mittels qRT-PCR detektiert wurde (155,7% ± 10,7%) (Abb. 23 B).

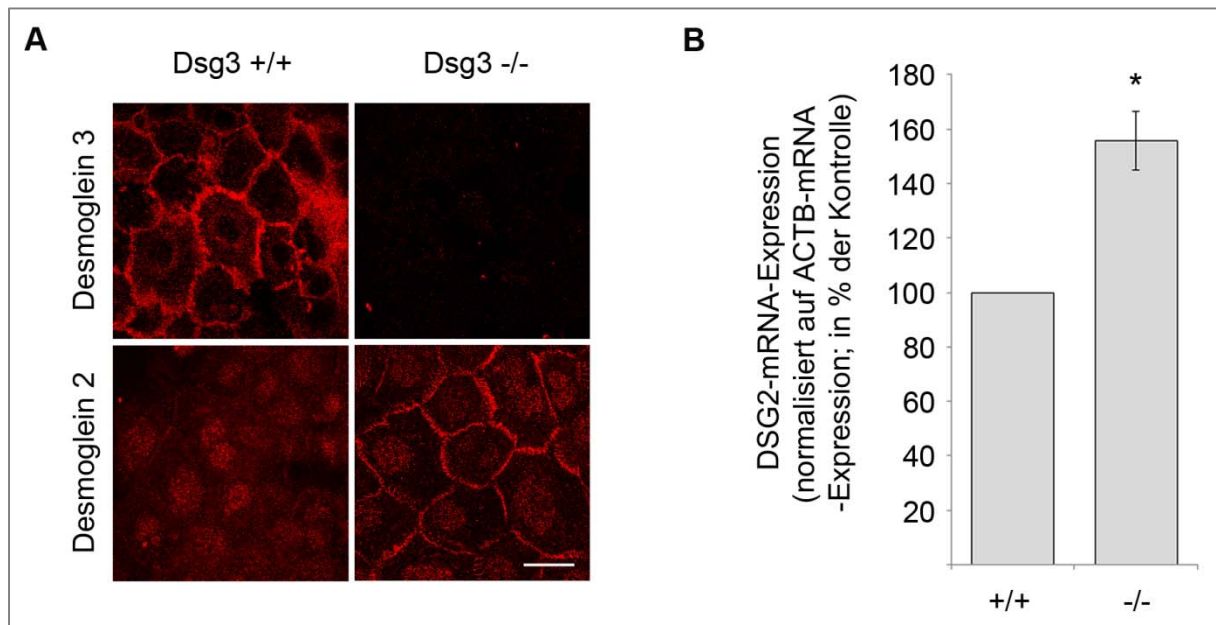


Abbildung 23: Dsg2-Lokalisation und DSG2-mRNA-Expression in primären Keratinocyten aus dem transgenen Dsg3-Mausmodell

(A) Immunfluoreszenzdarstellung von Dsg3 und Dsg2 in primären murinen Dsg3^{+/+}- und Dsg3^{-/-}-Keratinocyten 24 Stunden nach Kultivierung der Zellen in einem Medium mit einem Ca²⁺-Gehalt von 1,8 mmol/l. (Maßstabsskala=25µm; n_≥3) (B) DSG2-mRNA-Expression ermittelt durch qRT-PCR. Die DSG2-mRNA-Expression wurde auf die mRNA-Expression von ACTB normalisiert. Die Genexpressionswerte für Dsg3^{-/-}-Zellen wurden als Prozent der für Dsg3^{+/+}-Zellen erhaltenen Werte berechnet. (n=4; * p<0,05 im Vergleich zu Dsg3^{+/+}) [modifiziert nach (Hartlieb et al., 2014)]

3.11. Dsg2 reguliert im Gegensatz zu Dsg3 nicht die Aktivität der p38MAPK

Wie bereits in Abb. 19 gezeigt ist der durch Modulation der beiden Proteine Dsg2 und Dsg3 induzierte Haftungsverlust in HaCaT-Zellen ein teilweise p38MAPK-abhängiges Ereignis. In der Literatur sind Nachweise für einen Zusammenhang zwischen einem Haftungsverlust nach Dsg3-Modulation und einer p38MAPK-Aktivierung in Keratinozyten bekannt (Berkowitz et al., 2006; Jolly et al., 2010). Vor kurzem konnte sogar ein Signalkomplex zwischen Dsg3 und der p38MAPK identifiziert werden (Spindler et al., 2013). Im in der vorliegenden Arbeit verwendeten HaCaT-Zellkulturmodell waren nach erfolgter Transfektion mit Dsg3-spezifischer siRNA signifikant erhöhte phospho-p38MAPK (p-p38MAPK)-Mengen im Western Blot nachweisbar ($146,9\% \pm 11,0\%$) (Abb. 24 A und B). Dieser Effekt war nach Transfektion mit Dsg2-siRNA nicht zu erkennen ($116,2\% \pm 5,1\%$). Außerdem konnte der für Dsg3 beschriebene Komplex mit p-p38MAPK (Spindler et al., 2013) für Dsg2 sowohl in HaCaT- als auch in NHEK-Zellen mittels Immunpräzipitation und anschließender Western Blot-Analyse nicht detektiert werden (Abb. 24 C und D).

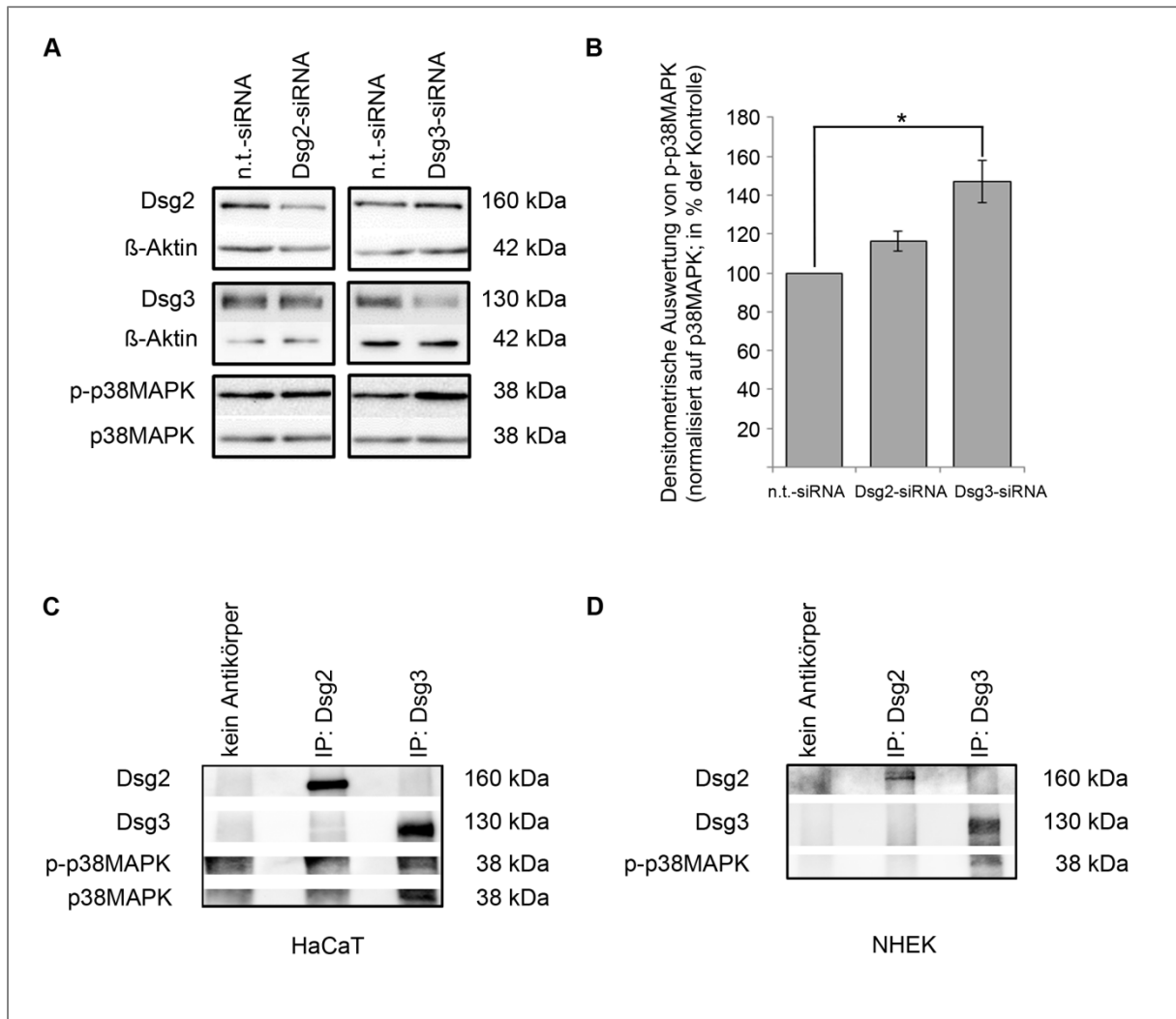


Abbildung 24: Einfluss von Dsg2 und Dsg3 auf den p38MAPK-Signalweg

(A) HaCaT-Zellen wurden entweder mit n.t.-, Dsg2- oder Dsg3-siRNA transfiziert und anschließend die erfolgreiche Depletion des jeweiligen Proteins mittels Western Blot-Analyse untersucht. β-Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. Im Gegensatz zu Dsg2 verursachte die Depletion von Dsg3 eine Erhöhung der p-p38MAPK-Proteinmengen. Hierbei wurde als Ladekontrolle p38MAPK detektiert. ($n \geq 3$) (B) Auswertung der Bandenintensität für p-p38MAPK unter den angegebenen Transfektionsbedingungen. P38MAPK wurde als Ladekontrolle verwendet. Alle Werte wurden als prozentualer Anteil der Werte berechnet, die nach Transfektion mit n.t.-siRNA erhalten wurden. ($n \geq 3$; * $p < 0,05$ im Vergleich zu n.t.-siRNA) (C) Nach einer Immunpräzipitation mit entweder einem monoklonalen Dsg2-Antikörper oder einem polyklonalen Dsg3-Antikörper in HaCaT-Zellysaten waren p-p38MAPK und p38MAPK nur nach erfolgreicher Dsg3-Präzipitation nachweisbar. ($n=3$) (D) Auch in NHEK-Zellysaten war eine p-p38MAPK-Detektion nur nach Dsg3-Präzipitation möglich. ($n=3$) [modifiziert nach (Hartlieb et al., 2014)]

P38MAPK ist aus der Literatur als wichtiger Regulator der Organisation von Keratinfilamenten bekannt (Wöll et al., 2007). Keratinfilamente sind notwendig für die mechanische Stabilität epithelialer Gewebe (Magin et al., 2007). Die sogenannte Retraktion der Keratinfilamente zählt im etablierten Zellkulturmodell zu den klassischen Anzeichen der Pemphigus-Erkrankung (Lever, 1953).

Ein durch AK23 induzierter Zusammenbruch des Keratinfilament-Netzwerkes in HaCaT-Zellen steht in direktem Zusammenhang mit dem p38MAPK-Signalweg (Spindler et al., 2013). Dieser Befund konnte in den hier durchgeführten Studien mittels Dsg3-spezifischer siRNA nachvollzogen werden. In erfolgreich transfizierten HaCaT-Zellen, mit deutlicher Reduktion der Dsg3-Membranlokalisation, war eine Retraktion der Keratinfilament zu erkennen (Abb. 25 A). Die p38MAPK-Abhängigkeit dieser Keratinretraktion ließ sich dadurch bestätigen, dass eine Inkubation der Dsg3-depletierten Zellen mit SB202190 die Umorganisation des Zytoskeletts weitgehend blockierte. Eine Reduzierung der Dsg2-Proteinexpression hatte hingegen keinen Einfluss auf die Anordnung der Keratinfilamente. Die Inkubation mit SB202190 beeinflusste nicht die Reduzierung der Dsg3-Proteinmenge nach Transfektion mit siRNA. Dies wurde mittels Western Blot-Analyse bestätigt (Abb. 25 B und C).

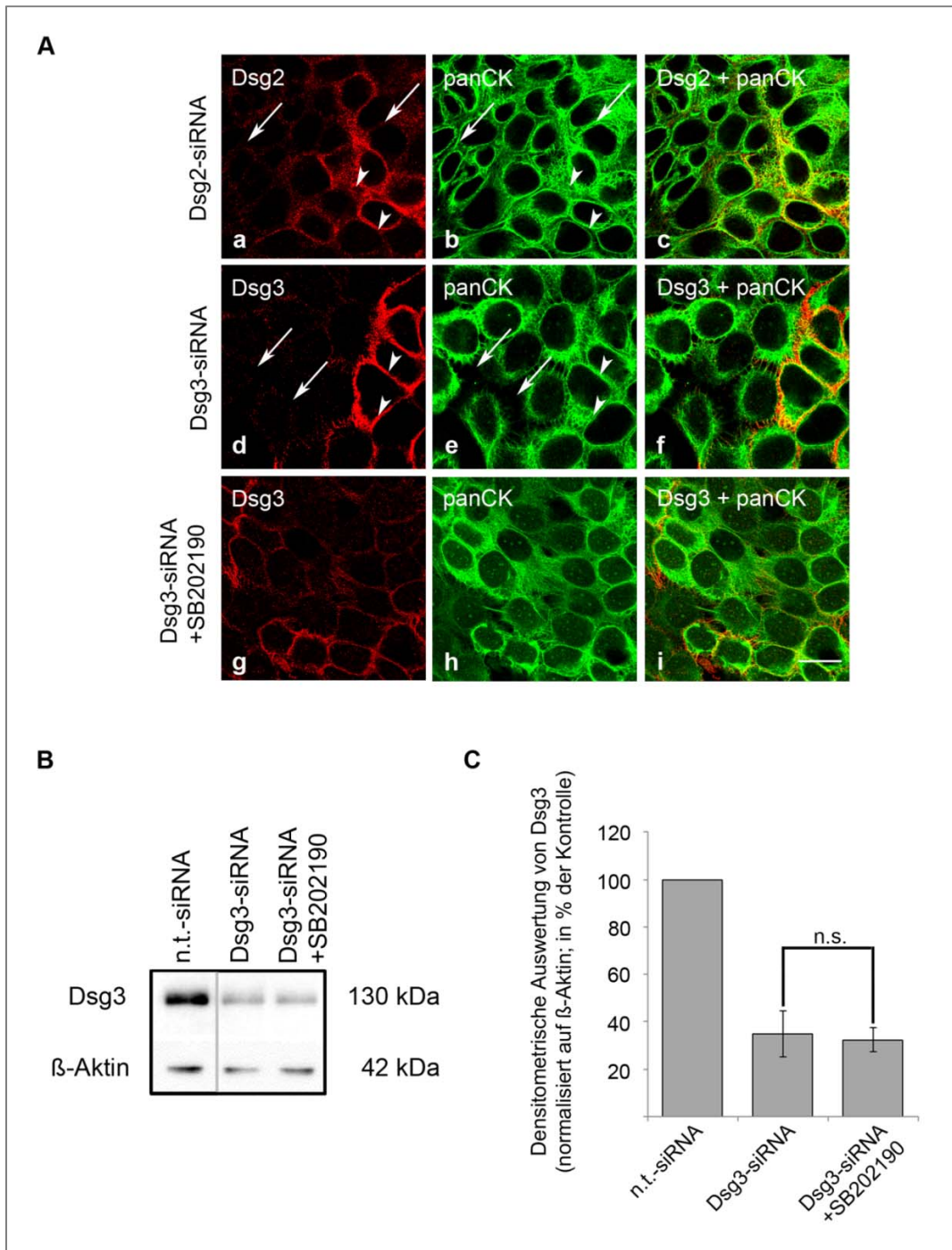


Abbildung 25: Einfluss einer Dsg2- bzw. Dsg3-Depletion auf die Keratinfilamente

(A) (a-c) Die siRNA-induzierte Reduzierung der Dsg2-Proteinmenge (rot) hatte keinen Einfluss auf die Organisation des Keratinfilamentnetzwerkes (grün) in HaCaT-Zellen. (Pfeilspitzen: Zellen mit endogener Dsg2-Expression; Pfeile: Zellen mit reduzierter Dsg2-Expression; n=3; panCK = engl. pan-cytokeratin) (d-f) In HaCaT-Zellen mit infolge der siRNA-Transfektion reduzierter Dsg3-Proteinmenge (rot) war eine Keratinretraktion (grün) zu erkennen. (Pfeilspitzen: Zellen mit endogener Dsg3-Expression; Pfeile: Zellen mit reduzierter Dsg3-Expression; n=3) (g-i) Dieser Effekt war durch eine 24-stündige Inkubation mit SB202190 blockiert. (n=3) (a-i) Maßstabsskala=20 μ m (B) Repräsentative Western Blot-Analyse nach Transfektion von HaCaT-Zellen mit n.t.- bzw. Dsg3-siRNA mit und ohne Inkubation von SB202190 für 24 Stunden. β -Aktin diente als Ladekontrolle. (n=3) (C) Densitometrische Auswertung der Bandenintensität von Dsg3 normalisiert auf β -Aktin. (n=3; n.s. = engl. not significant) [modifiziert nach (Hartlieb et al., 2014)]

Zur genaueren Untersuchung der Korrelation zwischen einer Einschränkung der Funktion von Dsg3 und einer p38MAPK-Aktivierung wurde der spezifische p38MAPK-Inhibitor SB202190 in Dissoziationsversuchen mit HaCaT-Zellen eingesetzt (Abb. 26 A). Sowohl der durch Inkubation mit AK23 ($24,0 \pm 2,5$) als auch der durch Dsg3-siRNA induzierte Haftungsverlust ($12,5 \pm 2,7$) konnte durch eine Inkubation mit dem Inhibitor für 24 Stunden signifikant reduziert werden ($3,4 \pm 1,2$ bzw. $5,6 \pm 1,5$). Da AK23 und die Depletion von Dsg3 mittels siRNA nur zu einer teilweisen Beeinträchtigung der Funktion von Dsg3 führen wurde ein ähnlicher Versuchsansatz in primären murinen Keratinozyten aus dem transgenen Mausmodell durchgeführt (Abb. 26 B). Dazu wurden nach erfolgter Genotypisierung Keratinozyten aus der Epidermis von Dsg3^{+/+}- und Dsg3^{-/-}-Mäusen isoliert und bis zur 100%igen Konfluenz in Medium mit einer Ca²⁺-Konzentration von 0,8 mmol/l kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in Medium mit einer Ca²⁺-Konzentration von 1,8 mmol/l überführt und nach 23 Stunden mit SB202190 inkubiert. Nach einer weiteren Stunde wurde dann der Dispase-basierte Dissoziationsversuch durchgeführt. Dsg3^{-/-}-Keratinozyten zeigten eine deutlich schwächere Zell-Zell-Adhäsion ($47,1 \pm 4,8$) im Vergleich zu Keratinozyten mit endogener Dsg3-Expression (Dsg3^{+/+}) ($2,2 \pm 0,5$). Interessanterweise führte auch hier die Inhibierung der p38MAPK durch SB202190 zu einer Stabilisierung der Zellhaftung und somit einer verringerten Anzahl der Fragmente in Dsg3^{-/-}-Keratinozyten ($26,6 \pm 4,6$).

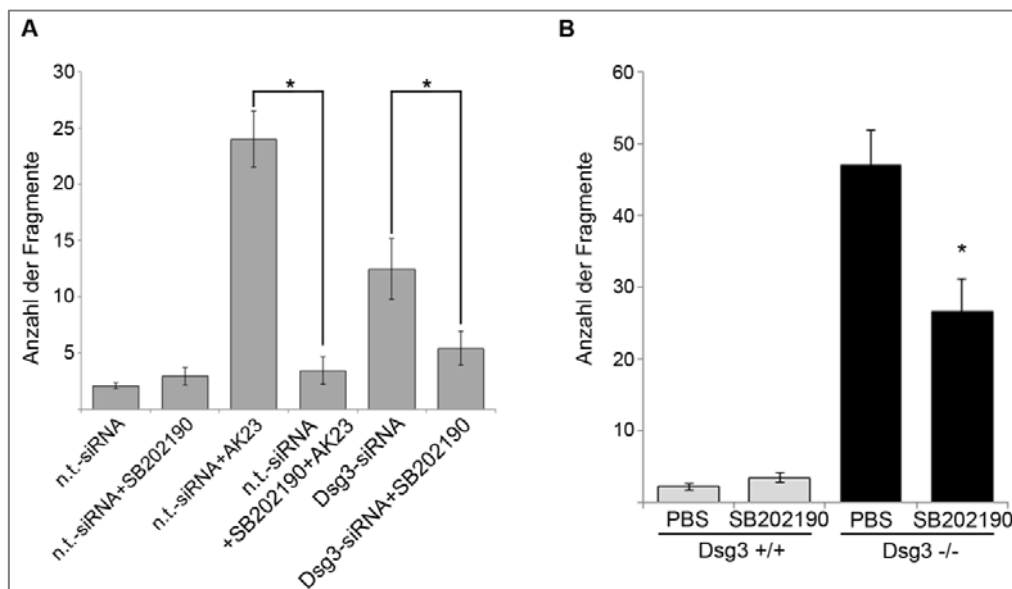


Abbildung 26: Rolle der p38MAPK für den Haftungsverlust nach Dsg3-Modulation

(A) Der durch Modulation der Dsg3-Funktion durch AK23 bzw. siRNA induzierte Haftungsverlust in HaCaT-Zellen konnte durch 24-stündige Inkubation mit SB202190 signifikant blockiert werden. Eine Inkubation mit SB202190 alleine zeigte keine Beeinflussung der Zelladhäsion. ($n \geq 6$; * $p < 0,05$) (B) Grafische Darstellung der Dissoziationsversuche in primären murinen Keratinozyten 24 Stunden nach Kultivierung in Medium mit einem Ca²⁺-Gehalt von 1,8 mmol/l. Der in Dsg3^{-/-}-Zellen im Vergleich zu Dsg3^{+/+}-Zellen detektierbare Haftungsverlust konnte durch eine einstündige Inkubation mit SB202190 inhibiert werden. [$n \geq 8$; * $p < 0,05$ im Vergleich zur Dsg3^{-/-} Kontrolle (PBS)] [modifiziert nach (Hartlieb et al., 2014)]

Der blockierende Effekt des p38MAPK-Inhibitors SB202190 auf den Zelladhäsionsverlust in Dsg3-depletierten HaCaT-Zellen sollte nun auch durch den Einsatz einer p38MAPK-spezifischen siRNA nachvollzogen werden. HaCaT-Zellen wurden simultan mit Dsg2- bzw. Dsg3-spezifischer siRNA und einer für die α -Isoform der p38MAPK-spezifischen siRNA transfiziert (Abb. 27). Die erfolgreiche Reduktion jeweils beider Proteine wurde anschließend mittels Western Blot-Analyse überprüft. Unter diesen Bedingungen resultierte in den Dispase-basierten Dissoziationsversuchen eine teilweise, jedoch nicht signifikante Reduzierung des durch Dsg3-spezifische siRNA-induzierten Haftungsverlusts (vgl. Abb. 26) durch gleichzeitige Depletion der p38MAPK ($7,0 \pm 1,5$). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Transfektion mit p38MAPK-spezifischer siRNA selbst zu einer ähnlich hohen Destabilisierung der Zelladhäsion führte ($6,3 \pm 1,4$), was anzeigt, dass eine siRNA-vermittelte Depletion von p38MAPK nicht zur Stabilisierung der Zelladhäsion geeignet ist. Interessanterweise wurde dieser Haftungsverlust durch eine simultane Transfektion mit Dsg2- und p38MAPK-spezifischer siRNA signifikant inhibiert ($1,6 \pm 0,3$).

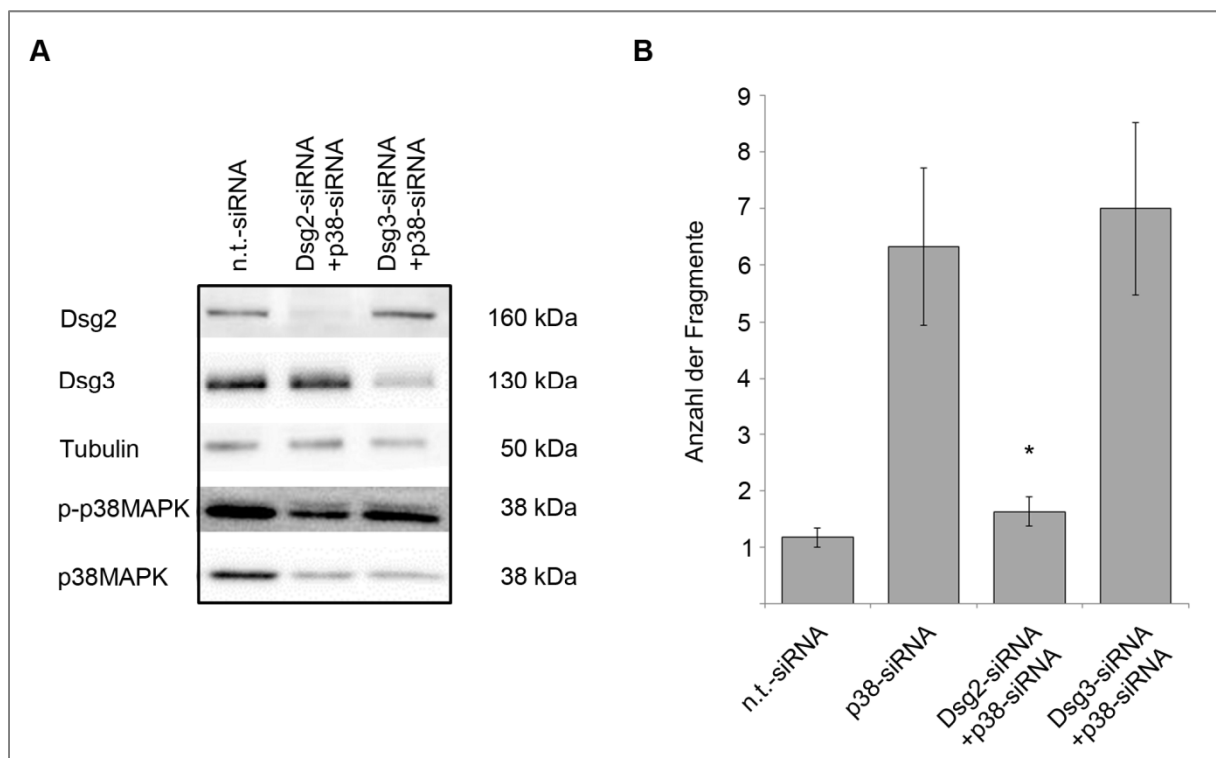


Abbildung 27: Effekte einer simultanen siRNA-induzierten Reduktion von p38MAPK und Dsg2 bzw. Dsg3 auf die Zellhaftung

(A) Repräsentative Western Blot-Analyse nach Transfektion von HaCaT-Zellen mit n.t.-siRNA bzw. simultaner Transfektion mit p38MAPK- und Dsg2- bzw. Dsg3-spezifischer siRNA. α -Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. (n=3) (B) Auswertung der Dissoziationsversuche nach Transfektion von HaCaT-Zellen mit n.t.-, p38-, simultaner Dsg2- und p38- bzw. Dsg3- und p38-siRNA. Der durch Reduzierung der p38MAPK-Proteinmenge induzierte Haftungsverlust wurde durch gleichzeitige Reduzierung der Dsg2-Proteinmenge blockiert. (n \geq 6; * p<0,05 im Vergleich zu p38-siRNA)

3.12. Dsg3-Defizienz führt zu einer Lokalisationsänderung der phospho-p38MAPK in murinen Keratinozyten

Die Dissoziationsversuche in primären Keratinozyten (MEK) haben gezeigt, dass auch unter komplettem Fehlen von Dsg3 die Regulierung des p38MAPK-Signalweges von entscheidender Bedeutung für die interzelluläre Adhäsion ist. Unter diesen pathologischen Bedingungen scheint es Änderungen in der Zusammensetzung oder Lokalisation des p38MAPK-Signalkomplexes zu geben, wodurch das Fehlen von Dsg3 kompensiert und gleichzeitig die Funktion des Signalkomplexes aufrechterhalten werden kann. Dementsprechend war in Dsg3^{-/-}-Keratinozyten eine deutlich prominentere Lokalisation der p-p38MAPK an der Zellmembran im Vergleich zu Dsg3^{+/+}-Keratinozyten zu erkennen (Abb. 28).

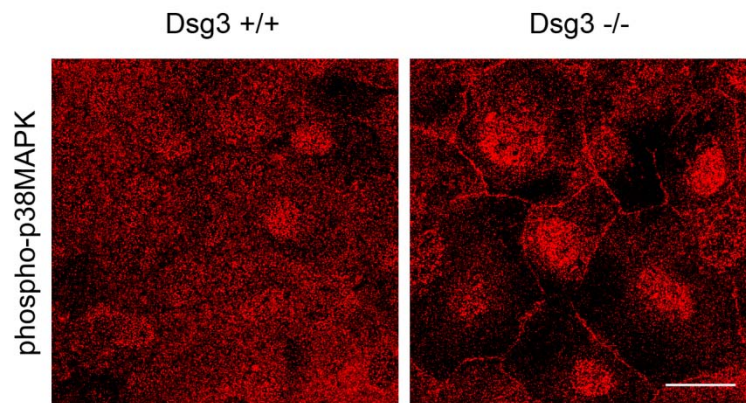


Abbildung 28: Immunfluoreszenzdarstellung von p-p38MAPK in primären Dsg3^{+/+}- und Dsg3^{-/-}-Keratinozyten

24 Stunden nach Kultivierung der MEK-Zellen in einem Medium mit einer Ca²⁺-Konzentration von 1,8 mmol/l war p-p38MAPK in Dsg3^{-/-}-Keratinozyten vermehrt an der Zellmembran nachweisbar. (Maßstabsskala=25µm; n_≥3) [modifiziert nach (Hartlieb et al., 2014)]

4. Diskussion

Dsg2 und Dsg3 gehören zur Proteingruppe der desmosomalen Cadherine, die an der Vermittlung und Regulierung der Zelladhäsion zwischen benachbarten Keratinozyten beteiligt sind. Die spezifische Funktion von Dsg2 in humaner Epidermis ist bisher unklar. Für Dsg3 ist eine primäre Bedeutung als Adhäsionsmolekül und darüber hinaus als Regulator verschiedener intrazellulärer Signalwege beschrieben. In dieser Arbeit wurden die funktionellen Unterschiede von Dsg2 und Dsg3 als Haftproteine und Rezeptoren untersucht. Aus den Unterschieden in der Lokalisation, der Inhibierbarkeit der Haftung durch spezifische Antikörper oder siRNA sowie durch simultane Modulation beider Proteine ergaben sich Hinweise auf eine bisher nicht beschriebene kompensatorische Funktion von Dsg2 unter Bedingungen einer eingeschränkten Dsg3-Funktion. In primären Keratinozyten, die aus einem Dsg3^{-/-}-Mausmodell isoliert wurden, fanden sich weitere Ergebnisse, die diese Hypothese bestätigten. Darüber hinaus wurde die Rolle beider desmosomaler Cadherine als Rezeptoren und Modulatoren der p38MAPK charakterisiert. Dsg3 spielt im Gegensatz zu Dsg2 eine bedeutende Rolle in diesem Signalweg, die im Zuge dieser Arbeit näher untersucht wurde. Die Funktion als Rezeptor scheint eine entscheidende Funktion von Dsg3 darzustellen, da durch Inhibierung des p38MAPK-Signalweges durch einen spezifischen Inhibitor sowohl der durch Dsg3-Depletion induzierte Haftungsverlust als auch die Keratinretraktion inhibiert wurde. Außerdem wurde der Haftungsverlust von primären Dsg3-defizienten Keratinozyten durch Inhibition der p38MAPK-Phosphorylierung partiell geblockt. Zusammenfassend lassen sich als zentrale Ergebnisse dieser Arbeit nennen, dass Dsg2 als Kompensationspartner für Dsg3 in Keratinozyten fungieren kann und dass Dsg3 über die Modulation des p38MAPK-Signalweges entscheidend an der Zelladhäsion beteiligt ist. Am Beispiel von Dsg2 lässt sich aus dem Vergleich mit den in der Literatur beschriebenen Funktionen von Dsg2 im Myokard bzw. dem Darmepithel ableiten, dass sich desmosomale Cadherine je nach Gewebe, in dem sie exprimiert werden, enorm in ihrer Funktion unterscheiden. Außerdem ist für Dsg2 die Rolle als Modulator weiterer, von p38MAPK-unabhängigen, Signalwegen in Keratinozyten denkbar.

4.1. Dsg2 und Dsg3 unterscheiden sich in ihrer Funktion als Haftproteine und Rezeptoren in Keratinozyten

Das unterschiedliche Expressionsmuster der desmosomalen Cadherine in den einzelnen Zellschichten humaner Epidermis legt nahe, dass die einzelnen Isoformen dieser Proteinfamilie zum Teil verschiedene Funktionen besitzen. In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Isoformen Dsg2 und Dsg3 hinsichtlich ihrer Funktion als Haftprotein und Rezeptor in Keratinozyten untersucht. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen beiden Proteinen. Während Dsg2 für die Zelladhäsion nur unter erhöhter mechanischer Belastung eine Rolle zu spielen scheint, nimmt Dsg3 eine zentrale Rolle für die Gewährleistung eines stabilen Zellverbandes differenzierter Keratinozyten ein. Im Gegensatz dazu zeigt Dsg2 eine relevante Bedeutung als Kompensationspartner für die Dsg3-vermittelte Zellhaftung unter Bedingungen eines Dsg3-Funktionsverlustes. Neben der Funktion als Haftprotein wurde weiterhin die Rolle von Dsg2 und Dsg3 im p38MAPK-Signalweg untersucht. Der für Dsg3 bereits beschriebene Signalkomplex mit p-p38MAPK und PG (Spindler et al., 2014; Spindler et al., 2013) konnte für Dsg2 nicht nachgewiesen werden. Ebenso zeigte eine Reduzierung der Dsg2-Proteinmenge, im Gegensatz zu Dsg3, keinen Einfluss auf die Aktivierung der p38MAPK sowie der Retraktion der Keratinfilamente. Zur genaueren Beurteilung dieser Befunde ist es notwendig, den zu Beginn beschriebenen Differenzierungsvorgang der Keratinozyten in humaner Epidermis und das daraus resultierende unterschiedliche, schichtspezifische Expressionsmuster der desmosomalen Cadherine zu berücksichtigen.

Das in der Literatur beschriebene Vorkommen von Dsg2 in den basalen Epidermisschichten konnte mit dem in dieser Arbeit verwendeten Antikörper in humanen Hautproben nicht detektiert werden. Es war jedoch eine deutliche Dsg2-Expression in den Keratinozyten um den Haarschaft nachzuweisen. Auch in den Studien einer anderen Arbeitsgruppe wurde in einer detaillierten Analyse mittels Immunfluoreszenzdarstellung von Dsg2 in Hautproben gesunder humaner Epidermis gezeigt, dass selbst in den basalen Epidermisschichten kaum Dsg2 nachzuweisen war (Brennan und Mahoney, 2009). Interessanterweise wurden auch in dieser Studie signifikant erhöhte Dsg2-Mengen in den Keratinozyten der Haarfollikel und zusätzlich in der basalen Epidermisschicht von Hautproben der Handinnenflächen detektiert. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnte spekuliert werden, dass diese Keratinozyten sowohl in den Haarfollikeln als auch an den Handinnenflächen einer erhöhten mechanischen Belastung standhalten müssen und deswegen hier Dsg2 als Haftprotein eine Rolle spielt. Der p38MAPK-Signalweg scheint hingegen in den basalen und suprabasalen Zellschichten als Signaltransduktionsweg eine Rolle zu spielen und zwar unter dem

Einfluss von Dsg3, das hier zu finden ist. Ein Unterschied in der Lokalisation dieser beiden Membranproteine war auch im Zellkulturmodell nachzuweisen. Die punktförmige Verteilung von Dsg2 an der Zellmembran differenzierter HaCaT-Zellen deutet an, dass sich dieses desmosomale Cadherin überwiegend in den einzelnen Desmosomen befindet und nicht wie Dsg3 auch extradesmosomal an der Zellemembran lokalisiert ist. Nach Triton-vermittelter Zellfraktionierung war Dsg2 fast ausschließlich in der Zytoskelett-verankerten, Desmosomen-enthaltenden Fraktion vorhanden. Wie in der Literatur beschrieben (Tsang et al., 2012b) fand sich Dsg3 in beiden Fraktionen, also auch in der Zytoskelett-ungebundenen Proteinfraction. Womöglich kommt Dsg3 gerade außerhalb der Desmosomen eine Bedeutung als Rezeptor zu (Tsang et al., 2012b). Auch wenn Dsg2 unter physiologischen Bedingungen keine zentrale Rolle für die rein mechanische Haftung zwischen Keratinozyten zuzukommen scheint, kann es unter pathologischen Bedingungen eine wichtige Rolle spielen. In Zelldissoziationsversuchen führte die Inhibierung der Funktion von Dsg3 von Keratinozyten, die bereits nach Transfektion mit Dsg2-spezifischer siRNA eine deutliche Reduzierung der Dsg2-Proteinmenge aufwiesen, zu einem enormen Haftungsverlust. Die Inhibierung der Dsg3-Funktion erfolgte hierbei entweder durch die Inkubation mit AK23 oder der Reduzierung der Dsg3-Proteinmenge mittels siRNA. Durch Modulation der Dsg3-Funktion alleine war der Haftungsverlust deutlich geringer. Der Nachweis von Dsg2 an der Zellmembran Dsg3-defizienter primärer muriner Keratinozyten sowie die erhöhte DSG2-mRNA-Expression deuten darauf hin, dass Dsg2 eine kompensatorische Funktion für den Verlust von Dsg3 einnimmt. Da keine erhöhten Proteinmengen für Dsg2 nachgewiesen werden konnten, scheint lediglich der Prozess der Desmosomen-Neubildung verstärkt stattzufinden und somit auch der kontinuierliche Einbau von Dsg2 in die Desmosomen an der Zellmembran. Eine andere Arbeitsgruppe wies in Dsg3-defizienten primären murinen Keratinozyten eine gesteigerte Dsg2-Proteinmenge nach (Baron et al., 2012). Allerdings verwendeten Baron und Kollegen einen Antikörper, der sowohl Dsg1 als auch Dsg2 detektiert und somit kann nicht eindeutig differenziert werden, ob die erhöhte Proteinmenge wirklich auf Dsg2 zurückzuführen ist.

Interessanterweise zeigten Arbeiten von Brennan und Kollegen am Tiermodell, dass Dsg2, das unter Kontrolle des Involucrin-Promotors in den suprabasalen Epidermisschichten exprimiert wird, einen durch PF-IgGs oder exfoliativem Toxin induzierten Dsg1-Funktionsverlust kompensieren kann und die Blasenbildung in diesen Mäusen verhindert (Brennan et al., 2010). Somit lässt sich schlussfolgern, dass eine gesteigerte Lokalisation von Dsg2 an der Zellmembran von Keratinozyten für den Funktionsverlust anderer desmosomaler Cadherine, wie Dsg1 oder Dsg3 kompensieren kann und den Zellen als Schutzmechanismus bei pathologischen Veränderungen dient. In einer Studie von Syed und

Kollegen wurde eine Ca^{2+} -abhängige heterophile Interaktion zwischen den EC1 und EC2 der beiden desmosomalen Cadherine Dsg2 und Dsc2 beschrieben (Syed et al., 2002). Um zu untersuchen, ob Dsg2 auch in der Lage ist, heterophile Bindungen mit Dsg1 und Dsg3 einzugehen, sind weitere Studien, z.B. mittels AFM, nötig.

4.2. Die Funktion von Dsg2 als Haftprotein ist gewebespezifisch

In intakten, differenzierten Keratinozyten konnte in der vorliegenden Arbeit eine Bedeutung von Dsg2 als Haftprotein nur unter erhöhter mechanischer Belastung nachgewiesen werden. Ein Antikörper, der in AFM-Studien die Bindung rekombinanter Dsg2-Konstrukte inhibieren konnte, hatte keinen Effekt auf die Keratinozyten-Adhäsion im Zellkulturmodell. Auch die mittels siRNA induzierte Verringerung der Dsg2-Proteinmenge resultierte nicht in einer gesteigerten Fragmentanzahl im Dissoziationsversuch. Lediglich unter erhöhter mechanischer Belastung waren die Zellen nicht mehr in der Lage, dem Scherstress standzuhalten. Es ist anzunehmen, dass die Keratinozyten im Haarfollikel zum einen an der Verankerung der Haare beteiligt sind und zum anderen in dieser Lokalisation auch einer erhöhten mechanischen Belastung ausgesetzt sind. Dies könnte eine Erklärung für den deutlichen Nachweis von Dsg2 in diesen Keratinozyten sein. Für die Vermittlung der Zelladhäsion zwischen den Keratinozyten der suprabasalen Epidermisschichten scheinen andere desmosomale Cadherine die entscheidende Rolle zu spielen.

Im Gegensatz dazu ist Dsg2 ein entscheidendes Protein zur Aufrechterhaltung der Darmbarriere und damit der Integrität der Darmepithelzellen (Schlegel et al., 2010). Im Unterscheid zu den Keratinozyten der Epidermis, kommen in den Darmepithelzellen nur die beiden desmosomalen Cadherine Dsg2 und Dsc2 vor (Schäfer et al., 1994; Schäfer et al., 1996). Im Darmepithel wird die Dsg2-vermittelte Zelladhäsion durch das β -Galaktosid-bindendene Protein Galaktin-3 reguliert (Jiang et al., 2014). Auch im Myokard sind nur die beiden desmosomalen Cadherine Dsg2 und Dsc2 vorhanden. Herzmuskelzellen werden durch die sog. Area composita miteinander verbunden. Diese setzt sich sowohl aus Nexus, als auch aus Desmosomen-ähnlichen und den Adhärenskontakten-ähnlichen Haftstrukturen zusammen. In den beiden letztgenannten ist Dsg2 lokalisiert (Franke et al., 2006). Auch in diesem Gewebe hat Dsg2 eine wichtige Rolle, denn es steht in direktem Zusammenhang mit der Pathogenese der arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie (ARVC) (Romero et al., 2013). Dsg2 wurde als eines der Gene identifiziert, in denen bei ARVC-

Patienten eine Mutation festgestellt werden kann. Pathologisch ist die ARVC durch einen Ersatz der Herzmuskelzellen durch Fett- und Bindegewebezellen, eine myokardiale Atrophie und eine Dilation der Ventrikel gekennzeichnet. Diese strukturellen Veränderungen am Herzen können dann zu einem plötzlichen Herztod führen. Es ist denkbar, dass Dsg2 nicht nur alleine als Haftprotein im Myokard fungiert, sondern auch intrazelluläre Prozesse reguliert, die dem Verlust der Herzmuskelzellen entgegenwirken, z.B. die Apoptose. Außerdem wurde, wie im Darmepithel, auch in den Kardiomyozyten eine entscheidende Funktion von Dsg2 für die Zell-Zell-Haftung nachgewiesen (Schlipp et al., 2014). Nach siRNA-induzierter Reduzierung der Dsg2-Proteinmenge zeigte sich eine Verminderung der Zellhaftung im Kardiomyozyten-Zellkulturmodell. Am Beispiel von Dsg2 wird deutlich, dass es von großer Bedeutung ist, die Rolle eines desmosomalen Cadherins immer im Hinblick auf das jeweilige Gewebe bzw. das Expressionsmuster der übrigen desmosomalen Cadherine zu untersuchen. Dieser Befund sollte auch in weiteren Studien zur Bedeutung desmosomaler Cadherine berücksichtigt werden.

4.3. Dsg3 stabilisiert die Zellhaftung in Keratinozyten über p38MAPK-abhängige Signalwege

In vorhergehenden Arbeiten wurde im Zellkulturmodell gezeigt, dass eine Inhibierung der Dsg3-Funktion durch AK23 zu einem Haftungsverlust, einer Aktivierung der p38MAPK und einer Retraktion der Intermediärfilamente führt (Spindler et al., 2013). Diese Befunde konnten in der vorliegenden Arbeit durch die Etablierung einer Transfektion mit Dsg3-spezifischer siRNA reproduziert werden. Dieser Versuchsansatz ermöglichte einen gezielten Vergleich der Funktionen einzelner desmosomaler Cadherine im Hinblick auf Adhäsion und Modulation des p38MAPK-Signalweges. Weiterhin wurden primäre Keratinozyten aus der Epidermis neonataler Dsg3-defizienter Mäuse isoliert und auch hier der Haftungsverlust mittels Dissoziationsversuchen nachgewiesen. Interessanterweise konnte dieser Haftungsverlust in beiden Modellen durch eine Inhibierung der p38MAPK durch den spezifischen Inhibitor SB202190 partiell blockiert werden. Auch die Keratinretraktion Dsg3-depletierter HaCaT-Zellen war nach SB202190-Inkubation reduziert. Diese Reorganisation des Zytoskeletts trägt wahrscheinlich zur gesteigerten Haftung in Dsg3-depletierten Zellen bei. Ein wichtiger Vorgang für die Gewährleistung stabiler Zell-Zell-Kontakte ist ein kontinuierlich stattfindender Auf- und Abbau der Desmosomen (Spindler und Waschke, 2014). Dabei

spielt ein intaktes Zytoskelett eine wichtige Rolle. Für Dsg2 und Dsc2 wurde gezeigt, dass sie mittels spezifischer Kinesine als Motorproteine über Mikrotubuli zur Zellmembran transportiert werden (Nekrasova et al., 2011). Für Dsg3 ist bekannt, dass es auch außerhalb der Desmosomen in einem Komplex mit E-Cadherin an der Zellmembran vorhanden ist (Tsang et al., 2012b). Wie der genaue Einbau der extradesmosomalen Membranproteine in die Desmosomen stattfindet, ist bisher unklar. Denkbar ist aber, dass Dsg3 nach dem Membrantransport via Mikrotubuli an Aktin gebunden in das Desmosom transportiert wird. Das an Aktin gebundene Protein Adducin scheint dabei am Einbau von Dsg3 in die Desmosomen beteiligt zu sein (Rötzer et al., 2014). Eine siRNA-induzierte Depletion der Proteinmenge der α - und γ -Isoform von Adducin führte in HaCaT-Zellen zu einer Reduzierung der Proteinmenge des am Zytoskelett verankerten Dsg3 und einem Haftungsverlust. In den Desmosomen wird Dsg3 dann über die Armadillo-Proteine und Desmoplakin stabil an den Intermediärfilamenten verankert (Getsios et al., 2004b). Eine Störung dieser Verbindungen resultiert im Zellhaftungsverlust (Spindler et al., 2014).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen, dass die Retraktion der Keratinfilamente ein p38MAPK-abhängiger Prozess ist, der durch Dsg3 moduliert wird. Es zeigt sich also deutlich die duale Funktion von Dsg3. Zum einen, wie in der Literatur beschrieben, vermittelt Dsg3 als Adhäsionsmolekül die trans-Interaktion von Desmogleinen benachbarter Keratinozyten (Heupel et al., 2009; Heupel et al., 2008). Zum anderen fungiert Dsg3 als Rezeptor und Modulator für den p38MAPK-Signalweg. Im Zellkulturmodell wurde nachgewiesen, dass die Inhibierung der Dsg3 Funktion durch AK23 (Spindler et al., 2013) oder Dsg3-spezifische siRNA, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, zu einer Aktivierung der p38MAPK führt. p38MAPK wird dabei in einem Komplex mit Dsg3 und PG aktiviert (Spindler et al., 2013). Auch eine Reduzierung der PG-Proteinmenge ist mit einer p38MAPK-Aktivierung und einer Keratinretraktion assoziiert (Spindler et al., 2014). Dementsprechend wurden in Studien der vorliegenden Arbeit in primären Keratinozyten Dsg3-defizienter Mäuse verringerte PG-Proteinmengen nachgewiesen. Die Aktivierung der p38MAPK scheint daher eine unspezifische Folge des Haftungsverlusts zu sein. Einen Hinweis darauf lieferten Studien, in denen die Reduzierung der DP-Proteinmenge einen Haftungsverlust in Keratinozyten induzierte, aber keine Aktivierung der p38MAPK zur Folge hatte (Spindler et al., 2014). Außerdem verbesserte auch in komplett Dsg3-defizienten primären Keratinozyten eine Inhibierung der p38MAPK durch SB202190 die Stabilität des Zellverbandes. Die Zellhaftung kann also auch ohne Dsg3 lediglich über eine Reduzierung der p38MAPK-Aktivität verbessert werden. Dieser Befund verdeutlicht, dass die p38MAPK und die von dieser Kinase modulierten Signalkaskaden wichtig für die Aufrechterhaltung der Zelladhäsion zwischen Keratinozyten sind. Der für Dsg3, p38MAPK und PG

identifizierte Komplex ist möglicherweise dazu da, um p38MAPK aus dem Zytoplasma direkt an der Zellmembran zu lokalisieren und direkten Einfluss auf die Desmosomen auszuüben. Dieser Einfluss könnte den Haftungsverlust induzieren oder auch protektiv sein. Um dies zu beantworten sind weitere Studien notwendig, mit deren Hilfe zunächst die genaue Lokalisation dieses Signalkomplexes ermittelt wird und anschließend Änderungen in der Zusammensetzung und Lokalisation im PV-Modell untersucht werden. Ein denkbarer Versuchsansatz wäre die Immun-Elektronenmikroskopie. Bei einem vollständigen Fehlen von Dsg3, wie im transgenen Dsg3-Mausmodell, wird diese Funktion des Signalkomplexes möglicherweise von anderen desmosomalen Cadherinen übernommen. Es bedarf weiterer Untersuchungen, um Membranproteine als Modulatoren des p38MAPK-Signalweges zu identifizieren und die Komplexität der hier ablaufenden Prozesse zu entschlüsseln.

4.4. Mögliche Dsg2-vermittelte intrazelluläre Signalwege in Keratinozyten

In der Literatur ist eine Expression von Dsg2 in der basalen Zellschicht der Epidermis beschrieben (Getsios et al., 2004b; Waschke, 2008). Dsg2 spielt hierbei möglicherweise eine Rolle für die weitere Differenzierung der Keratinozyten. Erste Hinweise hierfür konnten im Zuge dieser Arbeit ermittelt werden. Eine Reduzierung der Dsg2-Proteinmenge durch eine Transfektion mit Dsg2-spezifischer siRNA resultierte in einer verminderten Dsg3-Expression. Im Gegensatz dazu blieben die Dsg2-Proteinmengen nach einer Transfektion mit Dsg3-spezifischer siRNA im Zellkulturmodell konstant. Die Expression von Dsg2 ist also entscheidend für die Dsg3-Expression und kann diese beeinflussen.

In Keratinozyten konnte in dieser Arbeit keine Beteiligung von Dsg2 am p38MAPK-vermittelten intrazellulären Signalweg nachgewiesen werden. Dennoch spielt Dsg2 möglicherweise eine wichtige Rolle in anderen intrazellulären Signalkaskaden. In Hautproben transgener Mäuse, die Dsg2 unter Kontrolle des Involucrin-Promotors exprimieren, wurde eine Aktivierung verschiedener Signalwege, unter anderem des PI3-Kinase/AKT-Signalweges, des MEK-MAPK-Signalweges, STAT3 und NF- κ B, nachgewiesen (Brennan et al., 2007). Weiterhin zeigten diese Mäuse eine erhöhte Anfälligkeit für eine chemisch induzierte Tumorentwicklung. Bei der Interpretation dieser Daten ist allerdings zu berücksichtigen, dass Dsg2 unter physiologischen Bedingungen nicht in diesen Epidermisschichten vorhanden ist.

In verschiedenen epithelialen Tumoren der Haut wird Dsg2 als Tumormarker diskutiert, da hier eine erhöhte Dsg2-Expression nachgewiesen wurde (Brennan und Mahoney, 2009; Kurzen et al., 2003). In

der Tumorforschung wird postuliert, dass eine reduzierte Zell-Zell-Haftung die Voraussetzungen schafft für die Migration, Invasion und Metastasierung maligner Zellen. Im Hinblick auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit entsteht hier kein Widerspruch, da Dsg2 keine entscheidende Funktion als Haftprotein zwischen Keratinozyten ausübt. Vielmehr deutet die veränderte Expression von Dsg2 im Tumorgewebe an, dass es eine entscheidende Rolle an den in der Tumorentwicklung involvierten Signalwegen spielt. Es bedarf weiterer Studien, um zu klären, ob Dsg2 hierbei in den initialen Prozess der Tumorentstehung eingebunden ist oder sogar eine protektive Funktion einnimmt und die Veränderung der Dsg2-Proteinmenge erst im späteren Tumorstadium auftritt. In einer aktuellen Studie wurde gezeigt, dass eine siRNA-induzierte Reduktion der Dsg2-Proteinmenge zu einer gesteigerten Migration in Melanomzellen führt (Peitsch et al., 2014). Außer Dsg2 konnte kein desmosomales Cadherin in diesen Zellen nachgewiesen werden. Somit ist auch hier ein Rückschluss auf die Funktion von Dsg2 in der Epidermis schwierig. Eine andere Arbeitsgruppe stellte fest, dass Dsg2 in der Lage ist, die Apoptose im Darmepithel zu regulieren. Eine siRNA induzierte Verminderung der Dsg2-Proteinmenge zeigte eine protektive Wirkung auf die Induktion von Apoptose (Nava et al., 2007). Weiterhin resultierte eine Reduzierung der Dsg2-Proteinmenge in einer Darmepithel-Zelllinie in einer Zunahme der Dsc2-Proteinmenge und einer verminderten Zellproliferation durch Inhibierung der EGFR-Rezeptor-Internalisierung (Kamekura et al., 2013). Derartige direkte Beteiligungen von Dsg2 an intrazellulären Signalwegen konnten in der Epidermis bisher nicht nachgewiesen werden. Auch bei der Betrachtung der regulatorischen Funktion verschiedener Signalwege scheint somit das jeweilige Gewebe und damit das Expressionsprofil anderer desmosomaler Strukturen eine entscheidende Rolle zu spielen. Für die genauere Untersuchung der Funktion von Dsg2 in der Epidermis sind weitere Studien notwendig. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass die Arbeit mit Tiermodellen bisher schwierig sind, da transgene Dsg2-Mäuse aufgrund einer gestörten Embryonalentwicklung nicht lebensfähig sind (Eshkind et al., 2002), weshalb auf gewebespezifische Deletions-Modelle zurückgegriffen werden muss. Weiterhin wäre eine gezielte Aufarbeitung von Hautproben von PV- und PF-Patienten im Hinblick auf Dsg2 ein wichtiger Ansatz, um die Rolle von Dsg2 während pathologischer Veränderungen, die vornehmlich andere desmosomale Cadherine betreffen, zu untersuchen. Dsg2 könnte dabei eine initiale, protektive Funktion einnehmen. Zum einen könnte durch eine vermehrte Expression von Dsg2 die Zellhaftung verstärkt werden und zum anderen ist es denkbar, dass Dsg2 als Modulator protektiver Signalkaskaden fungiert.

Eine weitere mögliche Funktion von Dsg2 in den Keratinozyten ergibt sich aus den Daten, die in den Dissoziationsversuchen nach simultaner Depletion von Dsg2 und der α -Isoform der p38MAPK erhalten wurden. Zunächst wurde hier deutlich, dass die p38MAPK alleine eine wichtige Rolle für die

Zellhaftung spielt, da die siRNA-induzierte Reduzierung der p38MAPK-Proteinmengen zu einem Haftungsverlust führte. Interessanterweise war dieser Haftungsverlust durch eine gleichzeitige Reduzierung der Dsg2-Proteinmenge signifikant blockiert. Dsg2 und p38MAPK scheinen also antagonistisch auf bestimmte zelluläre Vorgänge zu wirken. Ein solcher interzellulärer Vorgang könnte der Ab- und Aufbau von Desmosomen sein, der ständig an der Zellmembran stattfindet. Dabei scheint sich eine Reduzierung der p38MAPK direkt negativ auf die Zellhaftung auszuwirken, wohingegen die verminderte Dsg2-Proteinmenge nur unter erhöhter mechanischer Belastung eine Rolle spielt. Unter Bedingungen einer Reduzierung beider Proteine könnte sowohl der Desmosomenaufbau als auch der -abbau verzögert stattfinden und dadurch wieder eine Homöostase des Prozesses und damit eine Integrität des Zellverbandes erreicht werden. Dass Dsg2 an der Regulierung des Auf- und Abbaus von Desmosomen beteiligt ist, zeigen Arbeiten von Brennan und Kollegen (Brennan et al., 2012). Über eine direkte Interaktion von Dsg2 mit Caveolin-1, einem Protein spezialisierter cholesterinreicher Membrandomänen, wird die Neubildung der Desmosomen reguliert. Durch diese Interaktion soll Dsg2 auch an der Aktivierung mitogener Signalwege beteiligt sein. Des Weiteren wurde Dsg2 als Zielmolekül der Metalloprotease ADAM 17 identifiziert. Diese sog. Sheddase ist für die Abspaltung der extrazellulären Domäne von Dsg2 verantwortlich. Die dabei entstehenden Spaltprodukte, mit einem Molekulargewicht von 95 und 65 kDa sind in die Caveolin-1-vermittelte Regulierung der Desmosomenbildung und der Aktivierung intrazellulärer Signalwege beteiligt (Brennan et al., 2012; Klessner et al., 2009). Weiterhin wurde Dsg2 als Substrat der Matriptase identifiziert (Wadhawan et al., 2012). Auch die durch diese Serinprotease induzierte Dsg2-Spaltung scheint, möglicherweise über ähnliche Prozesse, für die Zelladhäsion von Bedeutung zu sein.

Die Herausforderungen künftiger Forschungsarbeiten zu Dsg2 liegen darin, die hier beschriebenen Vorgänge, das heißt die notwendigen Enzyme zur Spaltung von Dsg2, die entstehenden Spaltprodukte und deren Beteiligung an der Regulierung der Desmosomenbildung und intrazellulärer Signalwege von intestinalen Epithelzellen und den Ergebnissen aus der Tumorforschung auf die Vorgänge in Keratinozyten zu übertragen. In diesen Zellen könnten Dsg2-vermittelte Signalwege besonders unter pathologischen Veränderungen der Epidermis, wie z.B. bei PV-Patienten, eine große Rolle spielen und Angriffspunkte für neue therapeutische Ansätze darstellen.

5. Ausblick

5.1. Untersuchungen zur Lokalisation von Dsg2 und p-p38MAPK in Hautproben von PV-Patienten

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass dem desmosomalen Cadherin Dsg2 eine besondere Bedeutung in den Keratinozyten der Epidermis zukommt, wenn die Funktion von Dsg3 beeinflusst bzw. nur noch eingeschränkt vorhanden ist. Dies ist zum Beispiel bei PV-Patienten der Fall. Da hier Dsg3-spezifische Autoantikörper durch direkte Inhibierung der Dsg3-Bindung bzw. die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden zu einer Beeinträchtigung der Dsg3-Funktion führen, ist es denkbar, dass die Bedeutung von Dsg2 unter diesen Bedingungen verändert ist. Wie im transgenen Dsg3-Mausmodell gezeigt, könnte der Dsg3-Funktionsverlust zu einer gesteigerten Membranlokalisation bzw. mRNA-Expression von Dsg2 führen. Es bleibt die Frage offen, ob diese beiden Effekte als primärer „Rettungsmechanismus“ dienen, um z.B. den Verlust der Dsg3-vermittelten Haftung mechanisch zu kompensieren. Dies könnte lediglich durch eine vermehrte Rekrutierung von Dsg2 an die Zellmembran gewährleistet werden oder durch eine Steigerung der Desmosomen-Neubildung. Letzteres ist deswegen denkbar, da in Dsg3-defizienten primären murinen Keratinozyten zwar gesteigerte DSG2-mRNA-Mengen, jedoch unveränderte Dsg2-Proteinmengen nachzuweisen waren. Weiterhin könnte Dsg2 unter diesen Bedingungen nicht nur als zusätzliches Haftprotein eine Rolle spielen, sondern auch als Modulator intrazellulärer Signalwege, die sich stabilisierend auf die Zelladhäsion auswirken. Die Hautläsionen der für die Dsg3-Mutation homozygoten Mäuse treten erst im Erwachsenenalter und hierbei auch von Tier zu Tier in einem unterschiedlich starken Ausmaß auf. Es ist also durchaus denkbar, dass durch verschiedene Umstrukturierungen in der Epidermis zunächst eine Integrität der Epidermis gewährleistet wird. Immunfluoreszenzuntersuchungen von Hautbiopsien von PV-Patienten könnten einen ersten Hinweis liefern, ob auch hier Änderungen in der Lokalisation von Dsg2 stattgefunden haben. Womöglich findet sich, entsprechend den Ergebnissen aus dem transgenen Dsg3-Mausmodell, an läSIONalen Hautarealen von PV-Patienten vermehrt Dsg2 an der Zellmembran der Keratinozyten. Darüber hinaus sollten diese Proben auch im Hinblick auf eine Lokalisationsänderung der p-p38MAPK untersucht werden. Dies könnte Aufschluss darüber geben, ob die in Hautproben von PV-Patienten detektierte Phosphorylierung der p38MAPK (Berkowitz et al., 2008) mit einer Lokalisationsänderung dieses Signalwegmoleküls einhergeht.

5.2. Aufarbeitung von Hautbiopsien der Dsg3-defizienten Mäuse im Hinblick auf eine p38MAPK-Aktivierung

Wie bereits erwähnt wurde in Hautbiopsien von PV-Patienten eine Aktivierung der p38MAPK anhand erhöhter p-p38MAPK-Proteinmengen nachgewiesen (Berkowitz et al., 2008). Erste Vorversuche mit Hautproben aus dem transgenen Dsg3-Mausmodell haben gezeigt, dass auch an läsionalen Hautarealen, vornehmlich an der Ohrmuschel der Dsg3^{-/-}-Mäuse, erhöhte p-p38MAPK-Mengen detektiert werden können. Interessant wäre nun, den zeitlichen Zusammenhang zwischen dem Auftreten der makroskopisch sichtbaren Hautläsion der Dsg3^{-/-}-Mäuse und einer p38MAPK Aktivierung zu ermitteln. Dazu könnten Hautbiopsien der Mäuse über einen längeren Zeitraum bis zum Auftreten der Läsion entnommen werden und mittels Western Blot und Immunfluoreszenzdarstellung im Hinblick auf eine p38MAPK-Phosphorylierung untersucht werden. Bei der Übertragung dieser Untersuchungen auf den PV-Patienten ist allerdings zu berücksichtigen, dass in der Epidermis der Dsg3^{-/-}-Mäuse aufgrund des kompletten Fehlens von Dsg3 Abweichungen in der Zusammensetzung der Desmosomen und eine veränderte Abfolge intrazellulärer Signalkaskaden zu erwarten sind. Dennoch geben diese Untersuchungen wichtige Einblicke in den Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer Hautläsion und der p38MAPK-Aktivierung und somit der Relevanz der p38MAPK für die Zelladhäsion.

Zusammenfassung

Desmogleine (Dsg1-4) sind transmembranäre Adhäsionsproteine aus der Gruppe der desmosomalen Cadherine, die Zell-Zell-Kontakte zwischen benachbarten Keratinozyten der Epidermis in und außerhalb von Desmosomen vermitteln. Eine durch Autoantikörper induzierte Störung dieser Haftstrukturen (hauptsächlich Dsg1 und Dsg3) resultiert im klinischen Bild der Pemphigus-Erkrankung. Dieses ist makroskopisch durch eine Blasenbildung der Haut gekennzeichnet. Auf zellulärer und molekularbiologischer Ebene lassen sich im Falle von Pemphigus vulgaris (PV) eine Retraktion des Zytoskeletts, eine Reduzierung der Dsg3-Proteinmenge und eine Aktivierung verschiedener Signalwege u.a. der p38MAPK nachweisen. PV eignet sich daher als Modellerkrankung zur Untersuchung der Bedeutung desmosomaler Cadherine für die interzelluläre Adhäsion in Keratinozyten. Durch zahlreiche Studien wurde die wichtige Funktion von Dsg3 als Adhäsionsprotein bestätigt und eine Beteiligung an der Modulation zahlreicher Signalwege, die in Zusammenhang mit der Pemphigus-Pathogenese stehen, untersucht. Im Gegensatz dazu konnte bisher keine spezifische Funktion des desmosomalen Cadherins Dsg2 in der Epidermis identifiziert werden. Dsg2 kommt als einziges Desmoglein in allen Geweben vor, die Desmosomen enthalten, und ist auch an den Zell-Zell-Kontakten im Myokard und Darmepithel vorhanden, wo kein Dsg1 und Dsg3 exprimiert werden. Hier nimmt Dsg2 eine wichtige Rolle als Adhäsionsmolekül und als Regulator interzellulärer Prozesse ein.

In dieser Arbeit wurde daher vergleichend die Bedeutung von Dsg2 und Dsg3 für die interzelluläre Adhäsion in Keratinozyten im Hinblick auf ihre Funktion als Adhäsionsmolekül und als Rezeptormolekül, speziell im p38MAPK-Signalweg, untersucht. Wesentliche Unterschiede zeigten sich zunächst in der Lokalisation beider Proteine. Während sich die in der Literatur beschriebene Lokalisation von Dsg3 im Stratum basale und spinosum der Epidermis bestätigte, konnte Dsg2 nur am Haarfollikel nachgewiesen werden. In differenzierten HaCaT-Zellen, einer Keratinozyten-Zelllinie war Dsg2 eher punktförmig und Dsg3 nahezu linear an der Zellmembran lokalisiert. Dementsprechend ließ sich Dsg2 nach Triton-vermittelter Zellfraktionierung in ähnlicher Verteilung zwischen der Zytoskelett-gebunden und -ungebundenen Fraktion nachweisen wie Desmoplakin, das an der Zellemembran ausschließlich in Desmosomen vorkommt. Durch Dsg-spezifische Antikörper, deren inhibitorische Eigenschaft in zellfreien AFM-Studien nachgewiesen wurde, konnte nur eine Inhibierung der Dsg3- und nicht der Dsg2-vermittelten Adhäsion in HaCaT-Zellen erzielt werden. Im Gegensatz dazu induzierte derselbe Dsg2-spezifische Antikörper einen signifikanten Haftungsverlust in einer Darmepithelzelllinie. Die mittels siRNA induzierte Reduzierung der Dsg2-Proteinmenge führte

jedoch nur unter erhöhter mechanischer Belastung der Zellen zu einem Adhäsionsverlust. Die simultane Modulation der Funktion von Dsg2 und Dsg3 mittels siRNA bzw. der Inkubation Dsg2-depletierter Zellen mit AK23, einem inhibitorischen Dsg3-spezifischen Antikörper, resultierte in einem drastischen, teilweise p38MAPK-abhängigen, Adhäsionsverlust. Dieser Befund lieferte erste Hinweise auf eine kompensatorische Funktion von Dsg2 bei eingeschränkter Dsg3-vermittelter Haftung in Keratinozyten. Um dies näher zu untersuchen, wurde die Verteilung von Dsg2 an der Zellemembran Dsg3-depletierter HaCaT-Zellen untersucht. Der Verlust von Dsg3 resultierte hierbei in einer Zunahme und Linearisierung der Dsg2-Membranfärbung, was die Hypothese einer kompensatorischen Funktion im Falle einer Beeinträchtigung der Dsg3-Funktion bekräftigt. Um die Funktion von Dsg2 unter dieser Bedingung gezielter zu untersuchen, wurde das transgene Dsg3-Mausmodell eingesetzt und primäre Keratinozyten aus neonatalen Dsg3-defizienten und nicht-Dsg3-defizienten Geschwistertieren isoliert. Entsprechend der vorhergehenden Befunde zeigten die Dsg3-defizienten Zellen eine deutliche Zunahme der Dsg2-Membranlokalisation sowie zusätzlich eine erhöhte DSG2-mRNA-Expression, allerdings bei unveränderten Dsg2-Proteinmengen.

Weiterhin wurde die Funktion von Dsg2 und Dsg3 als Modulator des p38MAPK-Signalweges näher untersucht. Der für Dsg3 identifizierte Komplex mit der phosphorylierten Form der p38MAPK (p-p38MAPK) konnte für Dsg2 nicht nachgewiesen werden. Ebenso führte eine Reduzierung der Dsg2-Proteinmenge, im Gegensatz zur Reduzierung der Dsg3-Proteinmenge, nicht zur Aktivierung der p38MAPK und einer Retraktion des Zytoskeletts. Der direkte Zusammenhang zwischen einem Dsg3-Funktionsverlust und der p38MAPK-Aktivität ließ sich dadurch bestätigen, dass sowohl die Keratinretraktion als auch der Haftungsverlust nach Dsg3-Depletion durch den Einsatz eines p38MAPK-spezifischen Inhibitors partiell inhibierbar waren. Auch in primären Keratinozyten mit vollständiger Dsg3-Defizienz verbesserte eine p38MAPK-Inhibierung die Zelladhäsion. Ebenso wurde in Dsg3-defizienten Zellen im Vergleich zu Zellen mit endogener Dsg3-Expression eine deutliche Lokalisation der p-p38MAPK an der Zellemembran nachgewiesen, was darauf schließen lässt, dass möglicherweise in Abwesenheit von Dsg3 andere Membranproteine an der Regulation dieses Signalweges beteiligt sind. Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit eine bisher nicht beschriebene Funktion von Dsg2 als Kompensationspartner für Dsg3 in Keratinozyten identifiziert und die Rolle von Dsg3 als Modulator des p38MAPK-Signalweges näher charakterisiert.

Summary

Desmogleins (Dsg1-4) are transmembrane adhesion proteins and members of the protein family of desmosomal cadherins which mediate cell-cell adhesion of adjacent keratinocytes inside and outside of desmosomes. Autoantibody-induced loss of binding of these proteins (mainly Dsg1 and Dsg3) results in the phenotype of Pemphigus vulgaris (PV). The patients suffer from erosions and lesions in skin and mucous membranes. Hallmarks of the disease on cellular level are the retraction of the keratin intermediate filaments, a depletion of Dsg3 and a modulation of several signaling pathways, e.g. p38MAPK. PV is therefore an important disease model to study the role of desmosomal cadherins for intercellular adhesion in keratinocytes. Numerous research groups confirmed the importance of Dsg3 as an adhesion protein and furthermore investigated a contribution of Dsg3 to signaling pathways in PV pathogenesis. In contrast, up to now no specific function for the desmosomal cadherin Dsg2 has been identified in the epidermis. Dsg2 is the only desmoglein isoform that is ubiquitously expressed in all desmosome-containing tissues and can also be identified in the cell-cell contacts of the myocardium and the intestinal epithelium in which Dsg1 and Dsg3 are absent. In both tissues, Dsg2 plays an important role as adhesion protein or regulator of intracellular processes.

Therefore, in the present study the relevance of the two desmosomal cadherins Dsg2 and Dsg3 for intercellular adhesion was compared and their roles as modulators of the p38MAPK pathway were studied. Basic differences were identified in the localization of both proteins: Dsg2 was restricted to keratinocytes in the hair follicle in adult human skin, whereas Dsg3 was located in the basal and the suprabasal layers of the epidermis. In differentiated HaCaT cells, an immortalized keratinocyte cell line Dsg2 localization appeared to be punctuated along the cell membrane whereas Dsg3 showed a linear distribution. Accordingly, Dsg2 was predominantly detectable in the cytoskeleton-anchored, desmosome-containing protein pool after Triton-X-100-mediated cell fractionation predominantly. Using Dsg-specific antibodies which were proven to be inhibitory in cell-free studies by atomic-force microscopy, loss of cell cohesion was detectable after targeting of Dsg3 only. In contrast, the same Dsg2-specific antibody induced a significant loss of cell-cell cohesion in an intestinal epithelial cell line. Interestingly, the siRNA-mediated reduction of Dsg2-protein levels induced a loss of cell cohesion under conditions of increased shear only. The simultaneous modulation of Dsg2 and Dsg3 by siRNA or by incubation of Dsg2-depleted cells with AK23, a pathogenic Dsg3-specific antibody, led to a drastic and partially p38MAPK-dependent loss of cell-cell adhesion. This indicated a compensatory role of Dsg2 under impaired Dsg3-function in keratinocytes. Therefore, in further

studies the distribution of Dsg2 after transfection with Dsg3-specific siRNA was investigated. Indeed, Dsg3-depleted keratinocytes demonstrated a pronounced and linearized distribution of Dsg2 along the cell membrane which corroborated the hypothesis of Dsg2 compensating for Dsg3 under conditions of reduced Dsg3-binding properties. To further investigate the function of Dsg2 under conditions of complete loss of Dsg3, primary murine keratinocyte were isolated from Dsg3-knockout mice and their wild-type littermates. According to the results of the cell-culture model, Dsg3-deficient primary keratinocytes showed a prominent membrane localization of Dsg2 and increased levels of DSG2-mRNA but not of Dsg2-protein.

Next, the function of Dsg2 and Dsg3 as modulators in the p38MAPK signaling pathway was investigated. The recently identified complex of Dsg3 with phosphorylated-p38MAPK (p-p38MAPK) was not detectable after Dsg2 immunoprecipitation. According to this, depletion of Dsg2 in contrast to Dsg3 did not result in activation of p38MAPK and p38MAPK-dependent keratin retraction. The protective effect of p38MAPK inhibition on both loss of cell-cell adhesion as well as keratin retraction after Dsg3-depletion confirmed the direct relation between loss of Dsg3-function and p38MAPK activation. Similarly, in primary murine keratinocytes lacking Dsg3, inhibition of p38MAPK was effective to improve cell adhesion. In these cells a more pronounced membrane localization of p-p38MAPK was detectable. This indicates that other membrane proteins play a role as regulators of this signaling molecule under conditions of Dsg3-deficiency. In summary, the results of this work identify a novel function for Dsg2 as compensation partner for Dsg3 and further characterize the role of Dsg2 and Dsg3 as modulators of the p38MAPK signaling pathway in keratinocytes.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Bedeutung von Desmoglein 2 und Desmoglein 3 für die interzelluläre Adhäsion in Keratinozyten“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Der Großteil der hier beschriebenen Ergebnisse und dargestellten Abbildungen wurde bereits in den beiden folgenden Arbeiten publiziert:

- Hartlieb E, Partilla M, Vigh B, Spindler V, Waschke J (2013). Desmoglein 2 is less important than desmoglein 3 for keratinocyte cohesion; *PLOS One*, 8(1):e53739 [vgl. Literaturverzeichnis (Hartlieb et al., 2013)]
- Hartlieb E, Rötzer V, Radeva M, Spindler V, Waschke J (2014). Desmoglein 2 compensates for desmoglein 3 but does not control cell adhesion via regulation of p38 mitogen-activated protein kinase in keratinocytes; *Journal of Biological Chemistry*, 289(24):17043-53 [vgl. Literaturverzeichnis (Hartlieb et al., 2014)].

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

München, den.....

.....

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “Importance of desmoglein 2 and desmoglein 3 for intercellular adhesion in keratinocytes” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/or materials applied are listed and specified in the thesis.

Parts of the results described here and several pictures have already been published:

- Hartlieb E, Partilla M, Vigh B, Spindler V, Waschke J (2013). Desmoglein 2 is less important than desmoglein 3 for keratinocyte cohesion; *PLOS One*, 8(1):e53739 [see reference list (Hartlieb et al., 2013)]
- Hartlieb E, Rötzer V, Radeva M, Spindler V, Waschke J (2014). Desmoglein 2 compensates for desmoglein 3 but does not control cell adhesion via regulation of p38 mitogen-activated protein kinase in keratinocytes; *Journal of Biological Chemistry*, 289(24):17043-53 [see reference list (Hartlieb et al., 2014)].

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Munich,

.....

Literaturverzeichnis

- Amagai, M., A.R. Ahmed, Y. Kitajima, J.C. Bystry, Y. Milner, R. Gniadecki, M. Hertl, C. Pincelli, H. Kurzen, M. Fridkis-Hareli, Y. Aoyama, M. Frusic-Zlotkin, E. Muller, M. David, D. Mimouni, D. Vind-Kezunovic, B. Michel, M. Mahoney, and S. Grando. 2006. Are desmoglein autoantibodies essential for the immunopathogenesis of pemphigus vulgaris, or just "witnesses of disease"? *Exp Dermatol.* 15:815-831.
- Amagai, M., V. Klaus-Kovtun, and J.R. Stanley. 1991. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell.* 67:869-877.
- Amagai, M., P.J. Koch, T. Nishikawa, and J.R. Stanley. 1996. Pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) is localized in the lower epidermis, the site of blister formation in patients. *J Invest Dermatol.* 106:351-355.
- Amagai, M., and J.R. Stanley. 2012. Desmoglein as a target in skin disease and beyond. *J Invest Dermatol.* 132:776-784.
- Baron, S., A. Hoang, H. Vogel, and L.D. Attardi. 2012. Unimpaired skin carcinogenesis in Desmoglein 3 knockout mice. *PLoS One.* 7:e50024.
- Bazzi, H., A. Getz, M.G. Mahoney, A. Ishida-Yamamoto, L. Langbein, J.K. Wahl, 3rd, and A.M. Christiano. 2006. Desmoglein 4 is expressed in highly differentiated keratinocytes and trichocytes in human epidermis and hair follicle. *Differentiation.* 74:129-140.
- Bektas, M., P.S. Jolly, P. Berkowitz, M. Amagai, and D.S. Rubenstein. 2013. A pathophysiologic role for epidermal growth factor receptor in pemphigus acantholysis. *J Biol Chem.* 288:9447-9456.
- Benninghoff, A., and D. Drenckhahn. 2008. Anatomie; Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Urban & Fischer, München/Jena, 17. Auflage.
- Berkowitz, P., L.A. Diaz, R.P. Hall, and D.S. Rubenstein. 2008. Induction of p38MAPK and HSP27 phosphorylation in pemphigus patient skin. *J Invest Dermatol.* 128:738-740.
- Berkowitz, P., P. Hu, Z. Liu, L.A. Diaz, J.J. Enghild, M.P. Chua, and D.S. Rubenstein. 2005. Desmosome signaling. Inhibition of p38MAPK prevents pemphigus vulgaris IgG-induced cytoskeleton reorganization. *J Biol Chem.* 280:23778-23784.
-

- Berkowitz, P., P. Hu, S. Warren, Z. Liu, L.A. Diaz, and D.S. Rubenstein. 2006. p38MAPK inhibition prevents disease in pemphigus vulgaris mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:12855-12860.
- Boukamp, P., R.T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham, and N.E. Fusenig. 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol.* 106:761-771.
- Brandner, J.M., S. Kief, E. Wladykowski, P. Houdek, and I. Moll. 2006. Tight junction proteins in the skin. *Skin Pharmacol and Physiol.* 19:71-77.
- Brennan, D., Y. Hu, S. Joubeh, Y.W. Choi, D. Whitaker-Menezes, T. O'Brien, J. Uitto, U. Rodeck, and M.G. Mahoney. 2007. Suprabasal Dsg2 expression in transgenic mouse skin confers a hyperproliferative and apoptosis-resistant phenotype to keratinocytes. *J Cell Sci.* 120:758-771.
- Brennan, D., Y. Hu, W. Medhat, A. Dowling, and M.G. Mahoney. 2010. Superficial dsg2 expression limits epidermal blister formation mediated by pemphigus foliaceus antibodies and exfoliative toxins. *Dermatol Res Pract.* 2010:410278.
- Brennan, D., and M.G. Mahoney. 2009. Increased expression of Dsg2 in malignant skin carcinomas: A tissue-microarray based study. *Cell Adh Migr.* 3:148-154.
- Brennan, D., S. Peltonen, A. Dowling, W. Medhat, K.J. Green, J.K. Wahl, 3rd, F. Del Galdo, and M.G. Mahoney. 2012. A role for caveolin-1 in desmoglein binding and desmosome dynamics. *Oncogene.* 31:1636-1648.
- Calkins, C.C., S.V. Setzer, J.M. Jennings, S. Summers, K. Tsunoda, M. Amagai, and A.P. Kowalczyk. 2006. Desmoglein endocytosis and desmosome disassembly are coordinated responses to pemphigus autoantibodies. *J Biol Chem.* 281:7623-7634.
- Chen, J., Z. Den, and P.J. Koch. 2008. Loss of desmocollin 3 in mice leads to epidermal blistering. *J Cell Sci.* 121:2844-2849.
- Chidgey, M., and C. Dawson. 2007. Desmosomes: a role in cancer? *Br J Cancer.* 96:1783-1787.
- Di Zeno, G., G. Di 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, and A. Lanzavecchia. 2012. Pemphigus autoantibodies generated through somatic mutations target the desmoglein-3 cis-interface. *J Clin Invest.* 122:3781-3790.
- Diaz, L.A. 2007. Rituximab and pemphigus--a therapeutic advance. *N Engl J Med.* 357:605-607.
-

- Esaki, C., M. Seishima, T. Yamada, K. Osada, and 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. *J Invest Dermatol.* 105:329-333.
- Eshkind, L., Q. Tian, A. Schmidt, W.W. Franke, R. Windoffer, and R.E. Leube. 2002. Loss of desmoglein 2 suggests essential functions for early embryonic development and proliferation of embryonal stem cells. *Eur J Cell Biol.* 81:592-598.
- Franke, W.W., C.M. Borrmann, C. Grund, and S. Pieperhoff. 2006. The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. I. Molecular definition in intercalated disks of cardiomyocytes by immunoelectron microscopy of desmosomal proteins. *Eur J Cell Biol.* 85:69-82.
- Frantz, B., T. Klatt, M. Pang, J. Parsons, A. Rolando, H. Williams, M.J. Tocci, S.J. O'Keefe, and E.A. O'Neill. 1998. The activation state of p38 mitogen-activated protein kinase determines the efficiency of ATP competition for pyridinylimidazole inhibitor binding. *Biochemistry.* 37:13846-13853.
- Garrod, D., and M. Chidgey. 2008. Desmosome structure, composition and function. *Biochim Biophys Acta.* 1778:572-587.
- Geiger, P.C., D.C. Wright, D.H. Han, and J.O. Holloszy. 2005. Activation of p38 MAP kinase enhances sensitivity of muscle glucose transport to insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 288:E782-788.
- Getsios, S., E.V. Amargo, R.L. Dusek, K. Ishii, L. Sheu, L.M. Godsel, and K.J. Green. 2004a. Coordinated expression of desmoglein 1 and desmocollin 1 regulates intercellular adhesion. *Differentiation.* 72:419-433.
- Getsios, S., A.C. Huen, and K.J. Green. 2004b. Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:271-281.
- Getsios, S., C.L. Simpson, S. Kojima, R. Harmon, L.J. Sheu, R.L. Dusek, M. Cornwell, and K.J. Green. 2009. Desmoglein 1-dependent suppression of EGFR signaling promotes epidermal differentiation and morphogenesis. *J Cell Biol.* 185:1243-1258.
- Gliem, M., W.M. Heupel, V. Spindler, G.S. Harms, and J. Waschke. 2010. Actin reorganization contributes to loss of cell adhesion in pemphigus vulgaris. *Am J Physiol Cell Physiol.* 299:C606-613.

- Godsel, L.M., A.D. Dubash, A.E. Bass-Zubek, E.V. Amargo, J.L. Klessner, R.P. Hobbs, X. Chen, and K.J. Green. 2010. Plakophilin 2 couples actomyosin remodeling to desmosomal plaque assembly via RhoA. *Mol Biol Cell*. 21:2844-2859.
- Grando, S.A. 2012. Pemphigus autoimmunity: Hypotheses and realities. *Autoimmunity*. 45:7-35.
- Green, K.J., and C.A. Gaudry. 2000. Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 1:208-216.
- Hanakawa, Y., H. Li, C. Lin, J.R. Stanley, and G. Cotsarelis. 2004. Desmogleins 1 and 3 in the companion layer anchor mouse anagen hair to the follicle. *J Invest Dermatol*. 123:817-822.
- Hanakawa, Y., N. Matsuyoshi, and J.R. Stanley. 2002. Expression of desmoglein 1 compensates for genetic loss of desmoglein 3 in keratinocyte adhesion. *J Invest Dermatol*. 119:27-31.
- Harmon, R.M., C.L. Simpson, J.L. Johnson, J.L. Koetsier, A.D. Dubash, N.A. Najor, O. Sarig, E. Sprecher, and K.J. Green. 2013. Desmoglein-1/Erbin interaction suppresses ERK activation to support epidermal differentiation. *J Clin Invest*. 123:1556-1570.
- Hartlieb, E., B. Kempf, M. Partilla, B. Vigh, V. Spindler, and J. Waschke. 2013. Desmoglein 2 is less important than desmoglein 3 for keratinocyte cohesion. *PLoS ONE*. 8:e53739.
- Hartlieb, E., V. Rötzer, M. Radeva, V. Spindler, and 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. *J Biol Chem*. 289:17043-17053.
- Hata, T., K. Nishifuji, K. Shimoda, T. Sasaki, T. Yamada, T. Nishikawa, S. Koyasu, and M. Amagai. 2011. Transgenic rescue of desmoglein 3 null mice with desmoglein 1 to develop a syngeneic mouse model for pemphigus vulgaris. *J Dermatol Sci*. 63:33-39.
- Heupel, W.M., T. Müller, A. Efthymiadis, E. Schmidt, D. Drenckhahn, and J. Waschke. 2009. Peptides Targeting the Desmoglein 3 Adhesive Interface Prevent Autoantibody-induced Acantholysis in Pemphigus. *J Biol Chem*. 284:8589-8595.
- Heupel, W.M., D. Zillikens, D. Drenckhahn, and J. Waschke. 2008. Pemphigus vulgaris IgG directly inhibit desmoglein 3-mediated transinteraction. *J Immunol*. 181:1825-1834.
- Ishii, K., R. Harada, I. Matsuo, Y. Shirakata, K. Hashimoto, and M. Amagai. 2005. In vitro keratinocyte dissociation assay for evaluation of the pathogenicity of anti-desmoglein 3 IgG autoantibodies in pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol*. 124:939-946.

- Jamora, M.J., D. Jiao, and J.C. Bystryn. 2003. Antibodies to desmoglein 1 and 3, and the clinical phenotype of pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol.* 48:976-977.
- Jiang, K., C.R. Rankin, P. Nava, R. Sumagin, R. Kamekura, S.R. Stowell, M. Feng, C.A. Parkos, and A. Nusrat. 2014. Galectin-3 regulates desmoglein-2 and intestinal epithelial intercellular adhesion. *J Biol Chem.* 289:10510-10517.
- Johnson, J.L., J.L. Koetsier, A. Sirico, A.T. Agidi, D. Antonini, C. Missero, and K.J. Green. 2014. The Desmosomal Protein Desmoglein 1 Aids Recovery of Epidermal Differentiation after Acute UV Light Exposure. *J Invest Dermatol.* 134:2154-2162.
- Jolly, P.S., P. Berkowitz, M. Bektas, H.E. Lee, M. Chua, L.A. Diaz, and D.S. Rubenstein. 2010. p38MAPK Signaling and Desmoglein-3 Internalization Are Linked Events in Pemphigus Acantholysis. *J Biol Chem.* 285:8936-8941.
- Kamekura, R., K.N. Kolegraff, P. Nava, R.S. Hilgarth, M. Feng, C.A. Parkos, and A. Nusrat. 2013. Loss of the desmosomal cadherin desmoglein-2 suppresses colon cancer cell proliferation through EGFR signaling. *Oncogene.* im Druck
- Karpati, S., M. Amagai, R. Prussick, K. Cehrs, and J.R. Stanley. 1993. Pemphigus vulgaris antigen, a desmoglein type of cadherin, is localized within keratinocyte desmosomes. *J Cell Biol.* 122:409-415.
- Kirschner, N., C. Bohner, S. Rachow, and J.M. Brandner. 2010. Tight junctions: is there a role in dermatology? *Arch Dermatol Res.* 302:483-493.
- Kirschner, N., and J.M. Brandner. 2012. Barriers and more: functions of tight junction proteins in the skin. *Ann N Y Acad Sci.* 1257:158-166.
- Klessner, J.L., B.V. Desai, E.V. Amargo, S. Getsios, and K.J. Green. 2009. EGFR and ADAMs cooperate to regulate shedding and endocytic trafficking of the desmosomal cadherin desmoglein 2. *Mol Biol Cell.* 20:328-337.
- Kljuic, A., H. Bazzi, J.P. Sundberg, A. Martinez-Mir, R. O'Shaughnessy, M.G. Mahoney, M. Levy, X. Montagutelli, W. Ahmad, V.M. Aita, D. Gordon, J. Uitto, D. Whiting, J. Ott, S. Fischer, T.C. Gilliam, C.A. Jahoda, R.J. Morris, A.A. Panteleyev, V.T. Nguyen, and A.M. Christiano. 2003. Desmoglein 4 in hair follicle differentiation and epidermal adhesion: evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris. *Cell.* 113:249-260.
- Koch, P.J., M.G. Mahoney, G. Cotsarelis, K. Rothenberger, R.M. Lavker, and J.R. Stanley. 1998. Desmoglein 3 anchors telogen hair in the follicle. *J Cell Sci.* 111 (Pt 17):2529-2537.
-

- Koch, P.J., M.G. Mahoney, H. Ishikawa, L. Pulkkinen, J. Uitto, L. Shultz, G.F. Murphy, D. Whitaker-Menezes, and J.R. Stanley. 1997. Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris. *J Cell Biol.* 137:1091-1102.
- Kolegraff, K., P. Nava, M.N. Helms, C.A. Parkos, and A. Nusrat. 2011. Loss of desmocollin-2 confers a tumorigenic phenotype to colonic epithelial cells through activation of Akt/beta-catenin signaling. *Mol Biol Cell.* 22:1121-1134.
- Krusche, C.A., B. Holthofer, V. Hofe, A.M. van de Sandt, L. Eshkind, E. Bockamp, M.W. Merx, S. Kant, R. Windoffer, and R.E. Leube. 2011. Desmoglein 2 mutant mice develop cardiac fibrosis and dilation. *Basic Res Cardiol.* 106:617-633.
- Kumar, S., J. Boehm, and J.C. Lee. 2003. p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2:717-726.
- Kumar, S., M.S. Jiang, J.L. Adams, and J.C. Lee. 1999. Pyridinylimidazole compound SB 203580 inhibits the activity but not the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 263:825-831.
- Kurzen, H., I. Munzing, and W. Hartschuh. 2003. Expression of desmosomal proteins in squamous cell carcinomas of the skin. *J Cutan Pathol.* 30:621-630.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Lee, J.C., J.T. Laydon, P.C. McDonnell, T.F. Gallagher, S. Kumar, D. Green, D. McNulty, M.J. Blumenthal, J.R. Heys, S.W. Landvatter, and et al. 1994. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature.* 372:739-746.
- Lever, W.F. 1953. Pemphigus. *Medicine (Baltimore).* 32:1-123.
- Lowndes, M., S. Rakshit, O. Shafraz, N. Borghi, R.M. Harmon, K.J. Green, S. Sivasankar, and W.J. Nelson. 2014. Different roles of cadherins in the assembly and structural integrity of the desmosome complex. *J Cell Sci.* 127:2339-2350.
- Lüllmann-Rauch, R. 2012. Taschenlehrbuch Histologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 4. Auflage.
- Magin, T.M., P. Vijayaraj, and R.E. Leube. 2007. Structural and regulatory functions of keratins. *Exp Cell Res.* 313:2021-2032.
-

- Mahoney, M.G., Y. Hu, D. Brennan, H. Bazzi, A.M. Christiano, and J.K. Wahl, 3rd. 2006. Delineation of diversified desmoglein distribution in stratified squamous epithelia: implications in diseases. *Exp Dermatol.* 15:101-109.
- Mahoney, M.G., Z. Wang, K. Rothenberger, P.J. Koch, M. Amagai, and J.R. Stanley. 1999. Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. *J Clin Invest.* 103:461-468.
- Mao, X., H. Li, Y. Sano, M. Gaestel, J. Mo Park, and A.S. Payne. 2014. MAPKAP kinase 2 (MK2)-dependent and -independent models of blister formation in pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol.* 134:68-76.
- Mao, X., Y. Sano, J.M. Park, and A.S. Payne. 2011. p38 MAPK activation is downstream of the loss of intercellular adhesion in pemphigus vulgaris. *J Biol Chem.* 286:1283-1291.
- Marcozzi, C., I.D. Burdett, R.S. Buxton, and A.I. Magee. 1998. Coexpression of both types of desmosomal cadherin and plakoglobin confers strong intercellular adhesion. *J Cell Sci.* 111 (Pt 4):495-509.
- Martin, P.E., J.A. Easton, M.B. Hodgins, and C.S. Wright. 2014. Connexins: sensors of epidermal integrity that are therapeutic targets. *FEBS Lett.* 588:1304-1314.
- Mavropoulos, A., T. Orfanidou, C. Liaskos, D.S. Smyk, C. Billinis, M. Blank, E.I. Rigopoulou, and D.P. Bogdanos. 2013. p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK)-mediated autoimmunity: lessons to learn from ANCA vasculitis and pemphigus vulgaris. *Autoimmun Rev.* 12:580-590.
- Nava, P., M.G. Laukoetter, A.M. Hopkins, O. Laur, K. Gerner-Smidt, K.J. Green, C.A. Parkos, and A. Nusrat. 2007. Desmoglein-2: A Novel Regulator of Apoptosis in the Intestinal Epithelium. *Mol Biol Cell.* 18:4565-4578.
- Nekrasova, O.E., E.V. Amargo, W.O. Smith, J. Chen, G.E. Kreitzer, and K.J. Green. 2011. Desmosomal cadherins utilize distinct kinesins for assembly into desmosomes. *J Cell Biol.* 195:1185-1203.
- Nie, Z., A. Merritt, M. Rouhi-Parkouhi, L. Taberner, and D. Garrod. 2011. Membrane-impermeable cross-linking provides evidence for homophilic, isoform-specific binding of desmosomal cadherins in epithelial cells. *J Biol Chem.* 286:2143-2154.
- Oktarina, D.A., G. van der Wier, G.F. Diercks, M.F. Jonkman, and 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. *Br J Dermatol.* 165:552-562.
-

- Peitsch, W.K., Y. Doerflinger, R. Fischer-Colbrie, V. Huck, A.T. Bauer, J. Utikal, S. Goerdt, and S.W. Schneider. 2014. Desmoglein 2 depletion leads to increased migration and upregulation of the chemoattractant secretoneurin in melanoma cells. *PLoS One*. 9:e89491.
- Proksch, E., J.M. Brandner, and J.M. Jensen. 2008. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol*. 17:1063-1072.
- Rheinwald, J.G., and M.A. Beckett. 1981. Tumorigenic keratinocyte lines requiring anchorage and fibroblast support cultured from human squamous cell carcinomas. *Cancer Res*. 41:1657-1663.
- Romero, J., E. Mejia-Lopez, C. Manrique, and R. Lucariello. 2013. Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy (ARVC/D): A Systematic Literature Review. *Clin Med Insights Cardiol*. 7:97-114.
- Rötzer, V., A. Breit, J. Waschke, and V. Spindler. 2014. Adducin Is Required for Desmosomal Cohesion in Keratinocytes. *J Biol Chem*. 289:14925-14940.
- Rouse, J., P. Cohen, S. Trigon, M. Morange, A. Alonso-Llamazares, D. Zamanillo, T. Hunt, and A.R. Nebreda. 1994. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*. 78:1027-1037.
- Saito, M., S.N. Stahley, C.Y. Caughman, X. Mao, D.K. Tucker, A.S. Payne, M. Amagai, and A.P. Kowalczyk. 2012. Signaling dependent and independent mechanisms in pemphigus vulgaris blister formation. *PLoS One*. 7:e50696.
- Sanchez-Carpintero, I., A. Espana, B. Pelacho, N. Lopez Moratalla, D.S. Rubenstein, L.A. Diaz, and M.J. Lopez-Zabalza. 2004. In vivo blockade of pemphigus vulgaris acantholysis by inhibition of intracellular signal transduction cascades. *Br J Dermatol*. 151:565-570.
- Schäfer, S., P.J. Koch, and W.W. Franke. 1994. Identification of the ubiquitous human desmoglein, Dsg2, and the expression catalogue of the desmoglein subfamily of desmosomal cadherins. *Exp Cell Res*. 211:391-399.
- Schäfer, S., S. Stumpp, and W.W. Franke. 1996. Immunological identification and characterization of the desmosomal cadherin Dsg2 in coupled and uncoupled epithelial cells and in human tissues. *Differentiation*. 60:99-108.
- Schlegel, N., M. Meir, W.M. Heupel, B. Holthofer, R.E. Leube, and J. Waschke. 2010. Desmoglein 2-mediated adhesion is required for intestinal epithelial barrier integrity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 298:G774-783.
-

- Schlipp, A., C. Schinner, V. Spindler, F. Vielmuth, K. Gehmlich, P. Syrris, W.J. McKenna, A. Dendorfer, E. Hartlieb, and J. Waschke. 2014. Desmoglein-2 interaction is crucial for cardiomyocyte cohesion and function. *Cardiovasc Res*.
- Schmidt, E., and D. Zillikens. 2011. The diagnosis and treatment of autoimmune blistering skin diseases. *Dtsch Arztebl Int*. 108:399-405, I-III.
- Seishima, M., C. Esaki, K. Osada, S. Mori, T. Hashimoto, and Y. Kitajima. 1995. Pemphigus IgG, but not bullous pemphigoid IgG, causes a transient increase in intracellular calcium and inositol 1,4,5-triphosphate in DJM-1 cells, a squamous cell carcinoma line. *J Invest Dermatol*. 104:33-37.
- Spindler, V., C. Dehner, S. Hübner, and J. Waschke. 2014. Plakoglobin but Not Desmoplakin Regulates Keratinocyte Cohesion via Modulation of p38MAPK Signaling. *J Invest Dermatol*. 134:1655-1664.
- Spindler, V., D. Drenckhahn, D. Zillikens, and J. Waschke. 2007. Pemphigus IgG causes skin splitting in the presence of both desmoglein 1 and desmoglein 3. *Am J Pathol*. 171:906-916.
- Spindler, V., A. Endlich, E. Hartlieb, F. Vielmuth, E. Schmidt, and J. Waschke. 2011. The extent of desmoglein 3 depletion in pemphigus vulgaris is dependent on Ca²⁺-induced differentiation: a role in suprabasal epidermal skin splitting? *Am J Pathol*. 179:1905-1916.
- Spindler, V., W.M. Heupel, A. Efthymiadis, E. Schmidt, R. Eming, C. Rankl, P. Hinterdorfer, T. Müller, D. Drenckhahn, and J. Waschke. 2009. Desmocollin 3-mediated binding is crucial for keratinocyte cohesion and is impaired in pemphigus. *J Biol Chem*. 284:30556-30564.
- Spindler, V., V. Rötzer, C. Dehner, B. Kempf, M. Gliem, M. Radeva, E. Hartlieb, G.S. Harms, E. Schmidt, and J. Waschke. 2013. Peptide-mediated desmoglein 3 crosslinking prevents pemphigus vulgaris autoantibody-induced skin blistering. *J Clin Invest*. 123:800-811.
- Spindler, V., F. Vielmuth, E. Schmidt, D.S. Rubenstein, and J. Waschke. 2010. Protective endogenous cyclic adenosine 5'-monophosphate signaling triggered by pemphigus autoantibodies. *J Immunol*. 185:6831-6838.
- Spindler, V., and J. Waschke. 2011. Role of Rho GTPases in desmosomal adhesion and pemphigus pathogenesis. *Ann Anat*. 193:177-180.
- Spindler, V., and J. Waschke. 2014. Desmosomal cadherins and signaling: lessons from autoimmune disease. *Cell Commun Adhes*. 21:77-84.

- Stokoe, D., K. Engel, D.G. Campbell, P. Cohen, and M. Gaestel. 1992. Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS Lett.* 313:307-313.
- Syed, S.E., B. Trinnaman, S. Martin, S. Major, J. Hutchinson, and A.I. Magee. 2002. Molecular interactions between desmosomal cadherins. *Biochem J.* 362:317-327.
- Tsang, S.M., L. Brown, H. Gadmor, G. Luke, F. Fortune, A. Wheeler, and H. Wan. 2012a. Desmoglein 3 acting as an upstream regulator of Rho GTPases, Rac-1/Cdc42 in the regulation of actin organisation and dynamics. *Exp Cell Res.* 318:2269-2283.
- 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, and 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. *J Pathol.* 227:81-93.
- Tsang, S.M., L. Liu, M.-T. Teh, A. Wheeler, R. Grose, I.R. Hart, D.R. Garrod, F. Fortune, and H. Wan. 2010. Desmoglein 3, via an Interaction with E-cadherin, Is Associated with Activation of Src. *PLoS ONE.* 5:e14211.
- Tsunoda, K., T. Ota, M. Aoki, T. Yamada, T. Nagai, T. Nakagawa, S. Koyasu, T. Nishikawa, and M. Amagai. 2003. Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. *J Immunol.* 170:2170-2178.
- van der Wier, G., M.F. Jonkman, H.H. Pas, and G.F. Diercks. 2012. Ultrastructure of acantholysis in pemphigus foliaceus re-examined from the current perspective. *Br J Dermatol.* 167:1265-1271.
- van der Wier, G., H.H. Pas, D. Kramer, G.F. Diercks, and M.F. Jonkman. 2014. Smaller Desmosomes Are Seen in the Skin of Pemphigus Patients with Anti-Desmoglein 1 Antibodies but Not in Patients with Anti-Desmoglein 3 Antibodies. *J Invest Dermatol.* 134:2287-2290.
- van der Zwaag, P.A., J.D. Jongbloed, M.P. van den Berg, J.J. van der Smagt, R. Jongbloed, H. Bikker, R.M. Hofstra, and J.P. van Tintelen. 2009. A genetic variants database for arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Hum Mutat.* 30:1278-1283.
- Wadhawan, V., Y.A. Kolhe, N. Sangith, A.K. Gautam, and P. Venkatraman. 2012. From Prediction to Experimental Validation-Desmoglein 2 is a Functionally Relevant Substrate of Matriptase in Epithelial Cells and their Reciprocal Relationship is Important for Cell Adhesion. *Biochem J.* 447:61-70.
- Waschke, J. 2008. The desmosome and pemphigus. *Histochem Cell Biol.* 130:21-54.
-

- Waschke, J., P. Bruggeman, W. Baumgartner, D. Zillikens, and D. Drenckhahn. 2005. Pemphigus foliaceus IgG causes dissociation of desmoglein 1-containing junctions without blocking desmoglein 1 transinteraction. *J Clin Invest.* 115:3157-3165.
- Waschke, J., and V. Spindler. 2014. Desmosomes and Extradесmosomal Adhesive Signaling Contacts in Pemphigus. *Med Res Rev.* im Druck
- Waschke, J., V. Spindler, P. Bruggeman, D. Zillikens, G. Schmidt, and D. Drenckhahn. 2006. Inhibition of Rho A activity causes pemphigus skin blistering. *J Cell Biol.* 175:721-727.
- Welsch, U. 2010. Lehrbuch Histologie. Urban & Fischer, München, 3. Auflage.
- Winterhager, E. 2005. Gap Junctions in Development and Disease. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg.
- Wöll, S., R. Windoffer, and R.E. Leube. 2007. p38 MAPK-dependent shaping of the keratin cytoskeleton in cultured cells. *J Cell Biol.* 177:795-807.
- Wu, H., Z.H. Wang, A. Yan, S. Lyle, S. Fakhrazadeh, J.K. Wahl, M.J. Wheelock, H. Ishikawa, J. Uitto, M. Amagai, and J.R. Stanley. 2000. Protection against pemphigus foliaceus by desmoglein 3 in neonates. *N Engl J Med.* 343:31-35.
- Yin, T., and K.J. Green. 2004. Regulation of desmosome assembly and adhesion. *Semin Cell Dev Biol.* 15:665-677.
- Zagorodniuk, I., S. Weltfriend, L. Shtruminger, E. Sprecher, O. Kogan, S. Pollack, and R. Bergman. 2005. A comparison of anti-desmoglein antibodies and indirect immunofluorescence in the serodiagnosis of pemphigus vulgaris. *Int J Dermatol.* 44:541-544.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACTB	β-Aktin (Bezeichnung des Gens)
AFM	engl. atomic force microscopy; Rasterkraftmikroskopie
A/G	Protein A und Protein B
AK23	pathogener monoklonaler Antikörper, gerichtet gegen die extrazelluläre Domäne von Desmoglein 3
APS	Ammoniumpersulfat
ARVC	engl. arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy; Arrhythmogene Rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	engl. bichinchonic acid; Bichinchoninsäure, 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure
bp	engl. base pairs; Basenpaare
BSA	engl. bovine serum albumine; Kälberserum
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
Ca ²⁺	Calcium-Ion
cAMP	engl. cyclic adenosinmonophosphate; zyklisches Adenosinmonophosphat
CCD	engl. charge-coupled device; ladungsgekoppeltes Bauteil
CK	engl. cytokeratin, Zytokeratin(filamente), Keratin(filamente)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DDSA	engl. Dodeceny succinic anhydride; 2-Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DM	engl. dense midline; dichte Mittellinie
DMEM	engl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMP-30	2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. deoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
Dsc	Desmocollin (Bezeichnung des Proteins)
Dsg	Desmoglein (Bezeichnung des Proteins)
DSG	Desmoglein (Bezeichnung des Gens)
DP	Desmoplakin
DTT	Dithiothreitol
EC	engl. extracellular; extracellular domain; extrazelluläre Domäne
Ecad	E-cadherin; engl. epithelial cadherin; epitheliales Cadherin
ECL	engl. enhanced chemiluminescence; verbesserte Chemilumineszenz
e.g.	Latin: exempli gratia; engl. for example; zum Beispiel

EGFR	engl. epidermal growth factor receptor;
EGTA	engl. ethylene glycol tetraacetic acid; Ethylendioxy-bis-(ethylennitrilo)-tetraessigsäure; $C_{14}H_{24}N_2O_{10}$
ELISA	engl. enzyme-linked immunosorbent assay; antikörperbasiertes Nachweisverfahren mit enzymatischer Farbreaktion
engl.	englisch; englische Bezeichnung
ERK	engl. extracellular-signal regulated kinases
Fc	engl. crystallisable fragment; kristallisierbares Fragment eines Antikörpers
FCS	engl. fetal calf serum, fötales Kälberserum
g	Gramm
g	mittlere Erdbeschleunigung, Ortsfaktor
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	engl. Hanks' Balanced/Buffered Salt Solution, gepufferte Salzlösung nach Hanks
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HCl	Salzsäure
HRP	engl. horseradish peroxidase; Meerrettichperoxidase
HSP27	engl. heat-shock protein 27; Hitzeschockprotein 27
I	engl. insoluble; unlöslich
IDP	engl. inner dense plaque; innere dichte Plaque
IF	Immunfluoreszenzdarstellung
<i>in vitro</i>	lat. im Glas; außerhalb von Lebewesen durchgeführte Versuche; hier im Zellkulturmodell
<i>in vivo</i>	lat. im Lebewesen; Versuche am Lebewesen; hier im Mausmodell
JNK	engl. c-Jun N-terminal kinase
kDa	Kilodalton
LB	engl. lysogeny broth; Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien
M	molar, mol/l
mA	Milliampere
mAK	monoklonaler Antikörper
MAPK	engl. mitogen-activated protein kinase; Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPK14	engl. mitogen-activated protein kinase 14; Bezeichnung des Gens, das für die α -Isoform des Proteins p38MAPK kodiert
MEK	engl. murine epidermal keratinocytes; Epidermale Keratinozyten aus der Maus
MeOH	Methanol
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute/Minuten
MK2/3	Kurzform für MAPKAPK2/3; engl. MAPK-activated protein kinase 2/3
mM	millimolar, mmol/l
mm	Millimeter

MNA	Methyl Nadic Anhydrid
n.s.	engl. not significant; nicht signifikant
NaF	Natriumfluorid
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natronlauge
NDS	engl. normal donkey serum; Eselserum
NGS	engl. normal goat serum; Ziegenserum
NHEK	engl. normal human epidermal keratinocytes; normale, humane, epidermale Keratinozyten
NPG	Natrium-Propylgallat
ODP	engl. outer dense plaque; äußere dichte Plaque
pAK	polyklonaler Antikörper
P	engl. plasma membrane; Plasmamembran (vgl. Abb. 1)
P	Phosphatgruppe (vgl. Abb. 5)
p38	Kurzform für p38MAPK
PBS	engl. phosphate buffered saline
PCA	engl. para-Cumaricacid; para-Cumarsäure
PCR	engl. polymerase chain reaction; Polymerase Kettenreaktion
PG	Plakoglobin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PKC	Proteinkinase C
Pkp	Plakophilin
PMSF	Benzylsulfonylfluorid, Phenylmethansulfonylfluorid
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNA	engl. ribonucleic acid; Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
S	engl. soluble; löslich
SDS	engl. sodium dodecyl sulfate; Natriumdodecylsulfat
SEM	engl. standard error of mean; Standardfehler
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
Tyr	Tyrosin
U	Unit
u.a.	unter anderem/unter anderen
UVB	Ultraviolettstrahlung im mittleren Wellenlängenbereich
V	Volt
WB	Western Blot
z.B.	zum Beispiel
µA	Mikroampere

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau eines Desmosoms.....	6
Abbildung 2: Expressionsmuster der einzelnen desmosomalen Komponenten im mehrschichtigen verhornten Plattenepithel humaner Epidermis	7
Abbildung 3: Gegenüberstellung von klinischem Phänotyp, HE-Präparat der Epidermis und Antikörperprofil von PV- und PF-Patienten.....	12
Abbildung 4: MAPK-Signalweg	20
Abbildung 5: Schematische Darstellung der durch Autoantikörper induzierten relevanten Signalwege in der PV-Pathogenese	22
Abbildung 6: Nachweis von Dsg2 und Dsg3 in humanen Hautproben	46
Abbildung 7: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von HaCaT-Zellen	47
Abbildung 8: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von HaCaT-Zellen.....	48
Abbildung 9: Expressionsprofil verschiedener desmosomaler Cadherine in HaCaT-Zellen.....	48
Abbildung 10: Detaillierte Immunfluoreszenzdarstellung von Dsg2 und Dsg3 in HaCaT-Zellen.....	49
Abbildung 11: Charakterisierung der SCC9-Zellen hinsichtlich der Expression desmosomaler Cadherine	50
Abbildung 12: Verteilungsmuster von Dsg2 und Dsg3 zwischen der Zytoskelett-ungebundenen und - gebundenen Proteinfraction	51
Abbildung 13: Effekte der Antikörper-induzierten Modulation der Dsg2- bzw. Dsg3-Haftung.....	53
Abbildung 14: Untersuchungen zur Effektivität von Dsg2-mAK und AK23	55
Abbildung 15: Relevanz von Dsg2 für die Zelladhäsion von Darmepithelzellen	56
Abbildung 16: Immunfluoreszenzdarstellung nach siRNA-induzierter Depletion von Dsg2 und Dsg3 in HaCaT-Zellen	57
Abbildung 17: Dissoziationsversuche in HaCaT-Zellen nach Transfektion mit siRNA	58
Abbildung 18: Western Blot-Analyse nach siRNA-induzierter Depletion von Dsg2 und Dsg3 in HaCaT-Zellen	59
Abbildung 19: Dissoziationsversuche nach simultaner Modulation von Dsg2 und Dsg3 in HaCaT-Zellen	61
Abbildung 20: Immunfluoreszenzdarstellung von HaCaT-Zellen nach Transfektion mit Dsg3-siRNA ..	62
Abbildung 21: Transgenes Dsg3-Mausmodell.....	63
Abbildung 22: Proteinmengen von Dsg2 und PG in primären Keratinozyten aus dem transgenen Dsg3-Mausmodell.....	64
Abbildung 23: Dsg2-Lokalisation und DSG2-mRNA-Expression in primären Keratinozyten aus dem transgenen Dsg3-Mausmodell	65
Abbildung 24: Einfluss von Dsg2 und Dsg3 auf den p38MAPK-Signalweg.....	67
Abbildung 25: Einfluss einer Dsg2- bzw. Dsg3-Depletion auf die Keratinfilamente	69
Abbildung 26: Rolle der p38MAPK für den Haftungsverlust nach Dsg3-Modulation	70
Abbildung 27: Effekte einer simultanen siRNA-induzierten Reduktion von p38MAPK und Dsg2 bzw. Dsg3 auf die Zellhaftung.....	71
Abbildung 28: Immunfluoreszenzdarstellung von p-p38MAPK in primären Dsg3 ^{+/+} - und Dsg3 ^{-/-} - Keratinozyten	72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zelllinien.....	24
Tabelle 2: Primärantikörper	24
Tabelle 3: Sekundärantikörper	25
Tabelle 4: Mediatoren	26
Tabelle 5: kommerzielle Reaktionsansätze	26
Tabelle 6: Chemikalien	26
Tabelle 7: Agarose-Konjugate	28
Tabelle 8: Rezepte	29
Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien	30
Tabelle 10: Geräte	30
Tabelle 11: Reagenzien für die siRNA-Transfektion	38
Tabelle 12: Primer für die Genotypisierung	42
Tabelle 13: PCR-Programm für die Genotypisierung	42
Tabelle 14: Primer für die RT-PCR	44
Tabelle 15: Programm für die qRT-PCR	44

Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Jens Waschke für die Bereitstellung des Themas und Betreuung dieser Arbeit, seine konstruktive Kritik, die Motivation und ganz besonders dafür, dass ich bereits während meiner Doktorandenzeit die Möglichkeit erhalten habe, meine Daten auf vielen, auch internationalen Kongressen zu präsentieren. Die Kongressreisen waren immer ein ganz besonderes Erlebnis!

Auch Herrn Prof. Dr. med. Volker Spindler danke ich für die Betreuung dieser Arbeit und ganz besonders für die Durchführung der AFM-Messungen.

Herrn Prof. Dr. rer. net. Harald Wajant danke ich für die Betreuung dieser Arbeit und die immer sehr inspirierenden Gespräche während unserer jährlich stattfindenden Treffen.

Beim Team der GSLS Würzburg möchte ich mich für die Organisation der interessanten Workshops und den Symposien bedanken. Ich freue mich sehr darüber, die Möglichkeit erhalten zu haben, unter dem „Dach“ der GSLS meine Promotionsarbeit durchführen zu können – mit dem Wissen, dass zu jederzeit hilfreiche Ansprechpartner bereit stehen.

Ganz besonders herzlich bedanke ich mich beim Team des Instituts für Anatomie und Zellbiologie Würzburg, Lehrstuhl III. Allen voran Lisa Berberich, Nadja Niedermeier, Anett Diker, Veronika Heimbach und Tanja Metzger! Ihr habt es geschafft mich gewissenhaft in alle Techniken und Tücken des Laboralltages einzuweisen und habt damit den Grundstein für alle meine weiteren Arbeiten in München gelegt. Das eine Jahr mit euch in Würzburg war wunderschön und ist einfach viel zu schnell vergangen!

Dem ganzen Team der Anatomischen Anstalt in München danke ich für die sehr hilfreiche Unterstützung in der Lehre, den geduldigen Erklärungen und der Hilfe beim Auffinden des ein oder anderen versteckten Nerven.

Natürlich bedanke ich mich auch beim gesamten Laborteam der Anatomischen Anstalt in München für die schöne Arbeitsatmosphäre. Einige Namen sind dabei, im Hinblick auf die vorliegende Arbeit besonders hervorzuheben:

Bei Claudia Meyerhofer möchte ich für die Unterstützung bei der Genotypisierung bedanken. Sabine Mühsimer danke ich für die Anfertigung der Hautschnitte am Kryostat und der HE-Färbungen.

Ein besonderer Dank geht außerdem an Cathleen Plietz vom Team des Tierhauses. Vielen Dank für die gewissenhafte und liebevolle Betreuung der Mäuse im Tierstall. Ich konnte mich immer darauf verlassen, dass die Mäuse in den besten Händen sind.

Miriam Partilla und Balázs Vigh danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei den Arbeiten während der zeitlich sehr knappen Revision der ersten Publikation dieser Arbeiten.

Ein ganz besonderer Dank geht außerdem an Dr. Mariya Radeva und an Vera Rötzer. Mariya danke ich für ihre Freundschaft und im Hinblick auf diese Arbeit ganz besonders für die Unterstützung bei allen Fragen zur Genotypisierung und der hohen Kunst der RT-PCR. Vera danke ich für die Unterstützung bei der Präparation der primären Keratinozyten. Jede Abendschicht an der Zellkulturbank war mir eine Ehre und es war schön, am nächsten Morgen die Ergebnisse unserer erfolgreichen Präparation zu begutachten.

Bei Martina Hitzenbichler möchte ich mich für ihre großartige Geduld, Ruhe und Unterstützung bei der Inbetriebnahme unseres Elektronenmikroskops bedanken, das wir nach anfänglichen Startschwierigkeiten nun richtig lieb gewonnen haben.

Der allergrößte Dank gebührt jedoch meiner Familie – meinen Eltern und meinem Bruder Michael für die immerwährende Unterstützung bei allem! Ihr seid für mich die größte Motivation.

Bei Mama, Michi und Caro möchte ich mich außerdem ganz besonders für ihre große Mühe beim Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken!

Die meiste Unterstützung habe ich jedoch von meinem Mann bekommen. Lieber Sebastian, du hast mich als Freund und später als Freund und Ehemann durch die Zeit meiner Doktorarbeit begleitet und bist ohne zu zögern mit mir nach München gekommen. Dafür bin ich dir unbeschreiblich dankbar und freue mich nun auf unsere eigene kleine Familie!

Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

1. Spindler V, Endlich A, Hartlieb E, Vielmuth F, Schmidt E, Waschke J (2011).
The extent of desmoglein 3 depletion in pemphigus vulgaris is dependent on Ca²⁺-induced differentiation – a role in suprabasal epidermal skin splitting?
American Journal of Pathology, 179(4):1905-16
2. Spindler V, Rötzer V, Dehner C, Kempf B, Gliem M, Radeva M, Hartlieb E, Harms GS, Schmidt E, Waschke J (2013).
Peptide-mediated desmoglein 3 crosslinking prevents pemphigus vulgaris autoantibody-induced skin blistering
Journal of Clinical Investigation, 123(2):800-811
3. Hartlieb E, Partilla M, Vigh B, Spindler V, Waschke J (2013).
Desmoglein 2 is less important than desmoglein 3 for keratinocyte cohesion
PLOS One, 8(1):e53739
4. Leucht K, Fischbeck A, Caj M, Liebisch G, Hartlieb E, Benes P, Fried M, Humpf HU, Rogler G, Hausmann M (2013)
Sphingomyelin and phosphatidylcholine contrarily affect the induction of apoptosis in intestinal epithelial cells
Molecular Nutrition and Food Research, 00, 1-17
5. Hartlieb E, Rötzer V, Radeva M, Spindler V, Waschke J (2014)
Desmoglein 2 compensates for desmoglein 3 but does not control cell adhesion via regulation of p38 mitogen-activated protein kinase in keratinocytes
Journal of Biological Chemistry, 289(24):17043-17053
6. Schlipp A, Schinner C, Spindler V, Vielmuth F, Gehmlich K, Syrris P, McKenna W J, Dendorfer A, Hartlieb E, Waschke J (2014)
Desmoglein-2 interaction is crucial for cardiomyocyte cohesion and function
Cardiovascular Research
im Druck

Kongressbeiträge

1. Hartlieb E, Spindler V, Waschke J (2011).
Role of desmoglein 2 for keratinocyte adhesion
28. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, 28.09.-30.09.2011, Würzburg, Deutschland
Poster

2. Hartlieb E, Spindler V, Waschke J (2012).
Desmoglein 2 and 3 differently regulate p38MAPK and keratinocyte cohesion
107. Jahrestagung, Anatomische Gesellschaft, 23.03.-26.03.2012, Frankfurt, Deutschland
Vortrag
 3. Hartlieb E, Spindler V, Waschke J (2012).
Differential contribution of desmoglein 2 and 3 to cell adhesion and intracellular signaling in keratinocytes
Experimental Biology, 21.04.-25.04.2012, San Diego, USA
Poster
 4. Hartlieb E, Partilla M, Spindler V, Waschke J (2012).
Dsg3-mediated p38MAPK regulation: role of extradesmosomal Dsg3?
29. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, 26.09.-28.09.2012, Würzburg, Deutschland
Poster
 5. Hartlieb E, Spindler V, Waschke J (2012).
Desmoglein 2 and 3 contribute differently to cell cohesion and regulation of signaling in keratinocytes
7. Internationales Symposium organisiert von den Studenten der Graduate School of Life Sciences, 16.10.-17.10.2012, Würzburg, Deutschland
Poster
 6. Hartlieb E, Vigh B, Spindler V, Waschke J (2013).
Desmoglein 2 is less important for cell cohesion in keratinocytes compared to intestinal epithelial cells
108. Jahrestagung, Anatomische Gesellschaft, 22.03.-25.03.2013, Magdeburg, Deutschland
Vortrag
 7. Hartlieb E, Vigh B, Spindler V, Waschke J (2013).
Desmoglein 2 contributes to cell cohesion dependent on the desmosomal cadherin expression pattern
Experimental Biology, 20.04.-24.04.2013, Boston, USA
Poster
 8. Hartlieb E, Rötzer V, Spindler V, Waschke J (2013).
Desmoglein 3 regulates keratin cytoskeleton organization via p38MAPK
30. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, 25.09.-27.09.2013, Würzburg, Deutschland
Poster
-

Lebenslauf

