

Aus dem Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Hauke Busch

Signaltransduktion in der Desmoglein-3 Internalisierung
bei Pemphigus vulgaris

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Sarah Dehoust geb. Flaswinkel
aus Münster
Lübeck 2020

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. vet. Jennifer Hundt

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Klinger

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2021

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 17.11.2021

Promotionskommission der Sektion Medizin

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	10
1 Einleitung und Fragestellung	11
1.1. Aufbau der Haut.....	11
1.1.1 Allgemeines	11
1.1.2. Epidermis.....	11
1.1.3. Desmosomen	12
1.1.3.1. Desmosomale Cadherine	14
1.1.4. Bullöse Autoimmundermatosen	16
1.1.5. Pemphiguserkrankungen	17
1.2. Autoimmunität.....	18
1.2.1. Definition	18
1.2.2. Immuntoleranz	18
1.2.3. Autoimmunerkrankungen.....	19
1.2.4. (Auto)antikörper und deren Epitop-Ausweitung	20
1.3. Pemphigus vulgaris	22
1.3.1. Epidemiologie	22
1.3.2. Klinik.....	22
1.3.3. Diagnostik.....	23
1.3.3.1. Histopathologie	23
1.3.3.2. Immunpathologie	23
1.3.4. Pathophysiologie	24
1.3.4.2. Hypothese der sterischen Hinderung.....	25
1.3.4.3. Mechanismen der Akantholyse.....	26
1.3.4.3. Hypothese der intrazellulären Signalwege.....	29
1.3.5. Therapie.....	31
1.4. Ziel der Arbeit	32
1.4.1. Spezifische Fragestellung.....	32
2 Material und Methoden	33
2.1. Zellkultur	33
2.2. Seren von Pemphigus vulgaris Patienten.....	34
2.2.1. Titration der Pemphigus vulgaris Serumkonzentration für das Nachweisverfahren der Desmoglein-3 Internalisierung	35
2.3. Selleckchem Target Selective Inhibitory Library.....	35

2.4. Nachweisverfahren der Internalisierung von Desmoglein-3	36
2.5. Evaluation der Desmoglein-3 Internalisierung mittels ImageJ	37
2.5.1. Evaluation der Werte von ImageJ und des Grades der Internalisierung	39
2.6. Nachweisverfahren zur Keratinozyten Dissoziation	39
2.7. Statistische Auswertung	41
3 Ergebnisse	42
3.1. Etablierung des Nachweisverfahrens zur Quantifizierung der Desmoglein-3 Internalisierung	42
3.1.1. Die Reduktion der Fluoreszenzintensität durch Pemphigus vulgaris Seren liegt zwischen 60-70%	42
3.2. Anwendung des Nachweisverfahrens der Desmoglein-3 Internalisierung zur Testung der Selleckchem Target Selective Inhibitory Library	46
3.3. A66 reduziert signifikant die Keratinozyten Dissoziation	49
3.4. BGJ398 reduziert signifikant die Keratinozyten Dissoziation	51
3.5. GW441756 reduziert signifikant die Keratinozyten Dissoziation	53
3.6. Selumetinib reduziert signifikant die Keratinozyten Dissoziation	55
3.7. TGX-221 reduziert signifikant die Keratinozyten Dissoziation	57
3.8. Vandetanib reduziert signifikant die Keratinozyten Dissoziation	59
3.9. Enzastaurin verstärkt signifikant die Keratinozyten Dissoziation	61
4 Diskussion	63
4.1. Bekannte Signalkaskaden sind verantwortlich für die Desmoglein-3 Internalisierung	63
4.1.1. Die Blockade des MAPK Signalweges verstärkt den Zusammenhalt der Keratinozyten	63
4.1.2. Die Phosphatidylinositol 3-Kinase ist Teil der komplexen Desmoglein-3 Internalisierungskaskade	66
4.2. Wachstumsfaktor-Rezeptoren können der initiale Schritt der Desmoglein-3 Internalisierung sein	67
4.3. Tropomyosinkinase A spielt möglicherweise eine Rolle in der Signalkaskade des Pemphigus vulgaris	69
4.4. Methodische Limitierung des Nachweisverfahrens der Desmoglein-3 Internalisierung	71

4.5. Ausblick für die weitere Forschung zur Desmoglein-3 Internalisierung
73

5 Zusammenfassung	75
6 Summary	76
7 Literaturverzeichnis	77
8 Danksagung	88
9 Curriculum vitae	90
10 Anhang	93

Abkürzungsverzeichnis

ADAM	<i>A disintegrin and metalloproteinase</i>
Akt	Proteinkinase B
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	Beziehungsweise
Ca ²⁺	Kalzium
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
DAG	Diacylglycerol
DIF	Direkte Immunfluoreszenz
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
DP	Desmoplakin
Dsc	Desmocollin
Dsg	Desmoglein
EC	Extrazelluläre Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EGFRK	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor Kinase
ERK	Extrazelluläre signal-regulierte Kinase
FCS	Fetales Kälber Serum
FGFR	Fibroblasten Wachstumsfaktor-Rezeptor
GSK3β	Glykogensynthetase-Kinase 3β
GTPase	Guanosintrisphosphatase
HaCat	Immortalisierte humane Keratinozyten
HBSS	Hanks' <i>Balanced Salt Solution</i>
HDAC1	Histondeacetylase 1
HSP	Hitzeschockprotein
IDP	Innere dichte Plaque
IgG	Immunglobulin G
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
KGM2	<i>Keratinocyte growth medium 2</i>
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
MEK	Mitogen aktivierte Protein Kinase/ERK Kinase

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MK2	Mitogen aktivierte Protein Kinase-aktivierte Protein Kinase 2
mTOR	Ziel von Rapamycin im Säugetier
NGF	Nervenwachstumsfaktor
NHEK	Normale humane epidermale Keratinozyten
NHS	Normales Humanes Serum
nNOS	Neurale Nitrit Oxid Synthetase
ODP	Äußere dichte Plaque
PDK1	Pyruvatdehydrogenase Kinase 1
PF	Pemphigus foliaceus
PG	Plakoglobin
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5- Bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PKP	Plakophilin
PLC	Phospholipase C
PV	Pemphigus vulgaris
Ras	Ratten Sarkom G-Protein
RE	Relative Einheit
rpm	Umdrehungen pro Minute
SD	Standard Deviation
Src	<i>Rous sarcoma kinase</i>
s.	Siehe
TrkA	Tropomyosinkinase A
v.a.	Vor allem
VEGFR2	Vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor-Rezeptor 2
z.B.	Zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Aufbau der Epidermis	12
Abbildung 2 Aufbau einer desmosomalen Einheit	13
Abbildung 3 Aufbau der Epidermis und Verteilungsmuster der verschiedenen desmosomalen Bestandteile	15
Abbildung 4 Schematischer Aufbau eines Immunglobulin (Ig) G Antikörpers.	21
Abbildung 5 Klinisches Erscheinungsbild des Pemphigus vulgaris	22
Abbildung 6 Diagnostik des Pemphigus vulgaris.....	23
Abbildung 7 Modell zur Pathophysiologie bei Pemphigus vulgaris	24
Abbildung 8 Desmoglein-Kompensations-Hypothese	26
Abbildung 9 Mögliche Mechanismen der Akantholyse	28
Abbildung 10 Ein hypothetisches Modell der p38 MAPKinase Aktivierung durch Desmoglein-3 (Dsg3) Antikörper Bindung.....	30
Abbildung 11 Kammerobjektträger mit 8 Kammern.....	33
Abbildung 12 Fluoreszenzintensität der Negativ- und Positivkontrolle im Desmoglein-3 Internalisierungsassay	38
Abbildung 13 Negativ- und Positivkontrolle im Keratinozyten Dissoziationsnachweis	40
Abbildung 14 Negativkontrollen mit normalem humanem Serum (NHS) und Positivkontrollen mit den ersten beiden Pemphigus vulgaris (PV) Seren	43
Abbildung 15 Negativkontrollen mit normalem humanem Serum (NHS) und der Positivkontrolle mit den Pemphigus vulgaris (PV) Seren der zweiten Phase	44
Abbildung 16 Die durchschnittliche Reduktion der Fluoreszenzintensität der Positivkontrollen	45
Abbildung 17 Mit dem Pemphigus vulgaris (PV) Serum 1 konnten 9 der 141 Substanzen und mit dem PV Serum 2 konnten 13 der 141 Substanzen in der ersten Phase die Auswahlgrenze übertreffen	46
Abbildung 18 In der zweiten Phase konnten 9 der 19 Substanzen mit dem Pemphigus vulgaris (PV) Serum 3 die Auswahlgrenze übertreffen und 5 der 19 Substanzen mit PV Serum 4	47
Abbildung 19 A66 verstärkt scheinbar die Fluoreszenzintensität im Nachweisverfahren der Desmoglein-3 Internalisierung	49
Abbildung 20 A66 verringert signifikant die Keratinozyten Dissoziation	50

Abbildung 21 BGJ389 scheint die Fluoreszenzintensität im Nachweisverfahren der Desmoglein-3 Internalisierung zu verstärken.....	51
Abbildung 22 BGJ398 verringert signifikant die Keratinozyten Dissoziation	52
Abbildung 23 GW441756 scheint die Fluoreszenzintensität im Nachweisverfahren der Desmoglein-3 Internalisierung zu verstärken	53
Abbildung 24 GW441756 verringert signifikant die Keratinozyten Dissoziation ..	54
Abbildung 25 Selumetinib scheint die Fluoreszenzintensität im Nachweisverfahren der Desmoglein-3 Internalisierung zu verstärken	55
Abbildung 26 Selumetinib verringert signifikant die Keratinozyten Dissoziation ..	56
Abbildung 27 TGX-221 scheint die Fluoreszenzintensität im Nachweisverfahren der Desmoglein-3 Internalisierung mit einem Pemphigus vulgaris Serum zu verstärken	57
Abbildung 28 TGX-221 verringert signifikant die Keratinozyten Dissoziation.....	58
Abbildung 29 Vandetanib scheint die Fluoreszenzintensität im Nachweisverfahren der Desmoglein-3 Internalisierung zu verstärken	59
Abbildung 30 Vandetanib verringert signifikant die Keratinozyten Dissoziation ..	60
Abbildung 31 Enzastaurin verstärkt die Fluoreszenzintensität in der Testung mit allen 4 PV Seren in der Konzentration von 10 µM im Nachweisverfahren zur Desmoglein-3 Internalisierung	61
Abbildung 32 Enzastaurin verstärkt die Keratinozyten Dissoziation in einer Konzentration von 10 µM	62
Abbildung 33 Der Ras/MEK/ERK-Signalweg ist Teil eines komplexen Netzwerkes aus verschiedenen Signalkaskaden.....	64
Abbildung 34 Ras/Raf/MEK/ERK und Ras/PI3K/PTEN/Akt/mTOR Signalwege ..	66
Abbildung 35 Aktivierung der Signalkaskade durch den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) als vereinfachte Darstellung führt zur verstärkten Zellproliferation.....	68
Abbildung 36 Interaktion der verschiedenen signifikanten Inhibitoren in der Signalkaskade der Desmoglein- 3 Internalisation	70

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Einteilung der bullösen Autoimmundermatosen und deren Autoantigene	16
Tabelle 2 Flussdiagramm des Arbeitsprozesses	48
Tabelle 3 Flussdiagramm des möglichen, weiteren Vorgehens in der Forschung zur Desmoglein-3 Internalisierung	74
Tabelle 4 Details zur <i>Target Selective Inhibitory Library</i> von Selleckchem	93
Tabelle 5 Details zu dem verwendeten Pemphigus vulgaris Immunapharesematerial	104
Tabelle 6 Subjektiver Grad der Internalisierung, verglichen mit der Intensität der Fluoreszenz.....	105
Tabelle 7 Ergänzende Materialliste	107

1 Einleitung und Fragestellung

1.1. Aufbau der Haut

1.1.1 Allgemeines

Die Haut (*Kutis*) ist das größte Organ des Menschen mit einer Gesamtoberfläche von etwa 2 m². Anatomisch wird die Haut in die Dermis (*Korium*= Lederhaut) und die Epidermis (Oberhaut) unterteilt. Darunter liegt zudem noch die *Subkutis* (*Hypodermis*= Unterhaut)¹.

1.1.2. Epidermis

Die Epidermis besteht aus einem mehrschichtig verhornten Plattenepithel und beinhaltet eine ganze Reihe verschiedener Zellen. Sie wird allerdings hauptsächlich aus Keratinozyten gebildet. Zusätzlich finden sich in den tieferen Schichten Melanozyten, Zellen der Immunabwehr (Langerhans-Zellen) und Merkelzellen (Sinneszellen). Die Epidermis liegt der Dermis mit einer Basalmembran auf. Diese Verbindung wird auch dermoepidermale Junctionszone genannt¹. Von dort ausgehend beginnt die etwa vierwöchige Differenzierungsphase der Keratinozyten, welche sich in den Schichten der Epidermis widerspiegelt.

Beginnend in der Basalschicht (*Stratum basale*) sind die Keratinozyten über Hemidesmosomen an der Basalmembran verankert. Zusammen mit dem *Stratum spinosum*, der Stachelzellschicht, bildet die Basalschicht das *Stratum germinativum*, in welchem die Zellteilung der Keratinozyten stattfindet. Hinzu kommt das *Stratum granulosum*, die Körnerschicht, in der sich wie auch im *Stratum germinativum* noch lebende Keratinozyten befinden. Die Zelleinheit aller Epidermiszellen ist durch Desmosomen (s. **Abschnitt 1.1.4.**) miteinander verbunden. Zwischen den lebenden Keratinozyten können zusätzlich noch *gap junctions*, welche einen Beitrag zur Differenzierung leisten, gefunden werden. In der besonders beanspruchten Haut, der Leistenhaut, welche an den Handinnenflächen und Fußsohlen aufzufinden ist, ist noch eine zusätzliche Schicht abgrenzbar, das *Stratum lucidum*. Diese bildet den Übergang der lebenden Zellen zu den toten, verhornten Zellen bildet. In der äußersten Schicht der Epidermis, dem *Stratum corneum*, gehen Zellkern und Organellen zugrunde, die Keratinozyten, nun mehr Korneozyten genannt, beinhalten nur noch ca. 30-40% Wasser und bestehen überwiegend aus Zytokeratin. Verbunden sind die

Korneozyten weiterhin mit Desmosomen und bilden als verhornte tote Zellschicht eine Barriere gegen äußere Einflüsse¹.

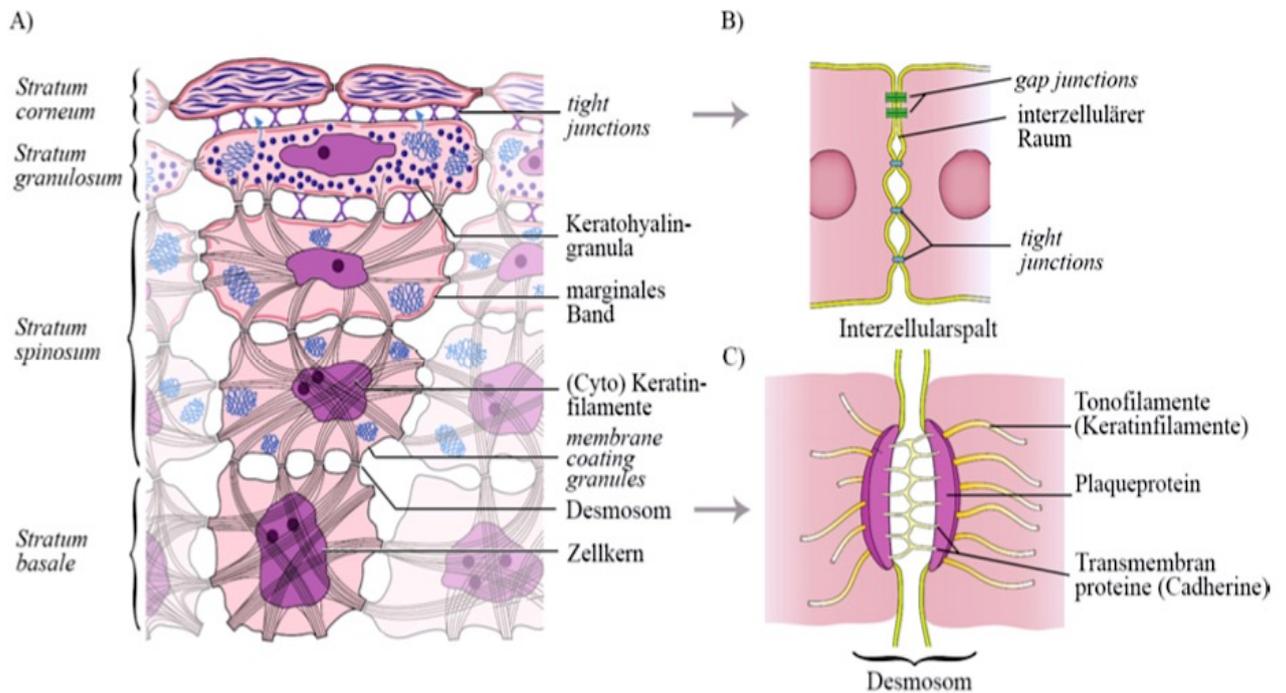


Abbildung 1 Aufbau der Epidermis² **A)** Die Epidermis besteht im Bereich der Leistenhaut (von basal nach apikal) aus dem *Stratum basale*, *Stratum spinosum*, *Stratum granulosum* und *Stratum corneum*. Im *Stratum basale* findet die Zellteilung statt, weswegen hier die Zellkerne eine wichtige Rolle spielen. Die Verbindung der Keratinozyten ist durch das Desmosom gewährleistet, welches durch die (Cyto-)Keratinfilamente mit dem Zellskelett verknüpft ist. Weiter apikal in der Epidermis finden sich, anstatt der Desmosomen, vor allem *tight junctions*, um die Keratinozyten zusammen zu halten. **B)** In den höheren Schichten finden sich vor allem dichte Zellverbindungen (*tight junctions*), die eine Schutzbarriere gegenüber Umwelteinflüssen gewährleisten sollen und Kanäle (*gap junctions*), welche die Zell-Zell-Kommunikation vermitteln. **C)** In den tieferliegenden Schichten finden sich hauptsächlich Desmosomen. Diese bestehen aus zwei gegenüberliegenden Plaqueproteinen, die mittels Catherinen eine Verbindung über den Interzellularspalt herstellen. Die Tonofilamente bilden ausgehend vom Plaqueprotein die Verbindung ins Zellinnere der Keratinozyten.

1.1.3. Desmosomen

Wie im vorherigen Abschnitt über die Epidermis bereits beschrieben, bilden die Desmosomen wichtige Adhäsionskontakte zwischen den Keratinozyten. Aber auch in anderen Epithelien, welche in besonderer Weise mechanischem Stress ausgesetzt sind, wie z.B. dem Myokard, dem Blasenepithel oder der gastrointestinalen Mukosa, sind Desmosomen zu finden³.

Morphologisch können Desmosomen in drei Zonen unterteilt werden, bestehend aus einer äußeren dichten Plaque (ODP), welche der Zellmembran anliegt. Diese wird wiederum aus den Plaqueproteinen Desmoplakin (DP), Plakophilin (PKP) und Plakoglobin (PG) gebildet. Von den Plaqueproteinen ausgehend in Richtung des Zytoplasmas sind Keratinfilamente gebunden an DP, welche primär als

Stützkomponente des Zytoskeletts fungieren und die innere dichte Plaque (IDP) aufbauen. Die Verbindung zu benachbarten Zellen entsteht letztlich durch die EC der transmembranären Glykoproteine Desmoglein (Dsg) und Desmocollin (Dsc), welche zu der Kalzium (Ca^{2+})-abhängigen Cadherinfamilie der Adhäsionsmoleküle gehört^{1,3-5} (s. **Abbildung 2**).

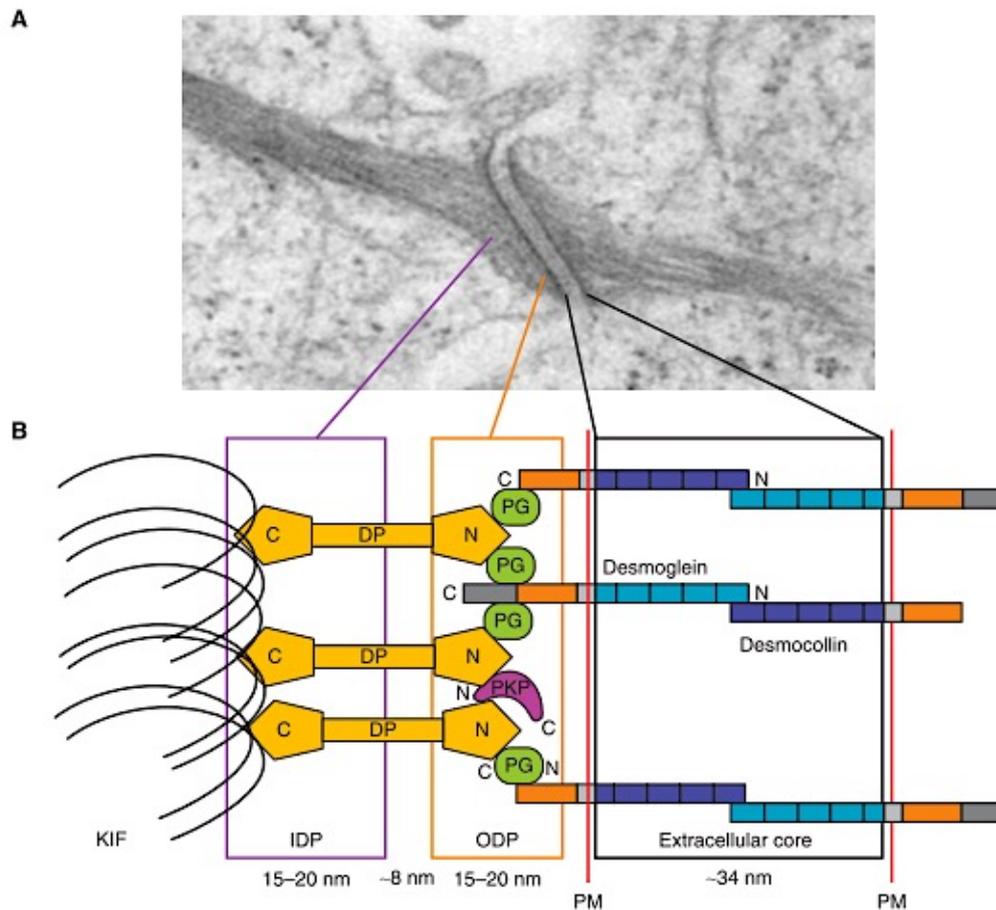


Abbildung 2 Aufbau einer desmosomalen Einheit aus Delva et al.³. (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme einer desmosomalen Einheit. (B) Schematische Darstellung einer desmosomalen Einheit mit deren Bestandteilen. Über die Plasmamembran (PM) ragend, verbinden die N-terminalen Enden von Desmoglein und Desmocollin im Extrazellulärraum zwei Keratinozyten. Das C-terminale Ende im Intrazellulärraum bildet zusammen mit Plakoglobin (PG), Plakophilin (PKP) und dem N-terminalen Ende von Desmoplakin (DP) die äußere dichte Plaque (ODP). Das C-terminale Ende von DP ist an die intermediären Keratin Filamente (KIF) der inneren dichten Plaque (IDP) verbunden und stellt so die Verbindung der Plasmamembran mit dem Zytoskelett her.

1.1.3.1. Desmosomale Cadherine

Dsg und Dsc sind zwei typische desmosomale Cadherine, von denen im Menschen vier verschiedene Dsg 1-4 und drei verschiedene Dsc 1-3 vorkommen. In diesem Abschnitt soll sich jedoch nur auf die Desmogleine fokussiert werden. Das transmembranäre Glykoprotein Dsg besteht aus vier EC (1-4), einem extrazellulären Anker, einer einzelnen transmembranen Domäne und einem intrazellulären Anker, an dem der zytoplasmatische Schweif angehängt ist. Die interzelluläre Adhäsion wird durch extrazelluläres Ca^{2+} vermittelt, welches der extrazellulären Domäne der Cadherine eine gefestigte Konformation verleiht^{3,4}. Zusätzlich enthält die intrazelluläre Domäne noch eine intrazelluläre Cadherin-ähnliche Sequenz, welche die Verbindung zu PG herstellt³.

Die desmosomalen Cadherine zeigen ein komplexes und unterschiedliches Expressionsmuster. Dsg-2 und Dsc-2 sind in allen Desmosomen-tragenden Epithelien vertreten. Die 6 anderen desmosomalen Cadherine jedoch meist nur in geschichtetem Epithel. Die einzelnen Epithelien im Körper weisen ihr eigenes Verteilungsmuster auf, sodass z.B. im mehrschichtig unverhornten Epithel der oralen Mukosa, vornehmlich Dsg-3 exprimiert ist, während dort eine Expression von Dsg-1 kaum zu finden ist.

Ebenso gibt es auch im Epithel selbst keine einheitliche Verteilung, sondern die Verteilung folgt einem bestimmten Muster, welches in der **Abbildung 3** für die Epidermis dargestellt ist. In der Epidermis sind alle 7 desmosomalen Cadherine vertreten. Dsg-2 und -3 sind dabei vor allem in den tieferen Schichten detektierbar, während Dsg-1 oberflächlich anzufinden ist. Dsg-4 wird vor allem in den Haarfollikeln und im *Stratum granulosum* exprimiert. Die genaue Funktion dieser gewebespezifischen Expression ist weitestgehend ungeklärt.

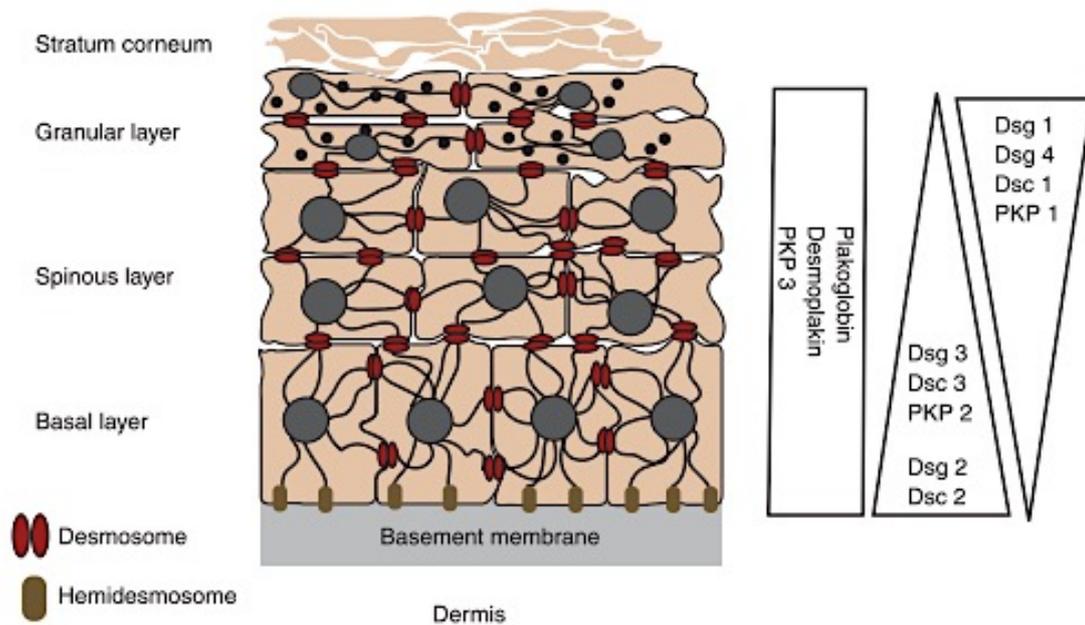


Abbildung 3 Aufbau der Epidermis und Verteilungsmuster der verschiedenen desmosomalen Bestandteile aus Delva et al³: Auf der Basalmembran sind über Hemidesmosomen die Keratinozyten der Basalmembran fixiert. Zwischen den Keratinozyten wird der Kontakt hier mittels Desmosomen gehalten. Darüber liegt die Stachelzellschicht, ebenfalls mit Desmosomen an die darüberliegende Granulosazellschicht gebunden. Apikal davon findet sich das *Stratum corneum* als abschließende Schicht zur Umwelt. Das Verteilungsmuster der verschiedenen desmosomalen Bestandteile findet sich rechts im Bild. Die Plaqueproteine Plakoglobin, Desmoplakin und Plakophilin (PKP) 3 sind über die gesamte Epidermis gleich verteilt. Desmocollin 2 (Dsc 2), und Desmoglobin 2 (Dsg 2) sind in den basalen Zellschichten stark exprimiert und nehmen nach apikal hin ab. Ebenso verhalten sich PKP 2, sowie Dsc 3 und Dsg 3, welche in den apikalen Zellschichten kaum noch zu finden sind. Entgegengesetzt verhält sich Dsg 1 und 4, Dsc 1 und PKP 1.

1.1.4. Bullöse Autoimmundermatosen

Bei diesen Autoimmunerkrankungen sind Autoantikörper gegen Strukturproteine der Haut gerichtet. Diese Strukturproteine sind Proteine der Zell-Zell-Adhäsion der Keratinozyten oder der Adhäsion der Epidermis auf der Dermis. Dementsprechend liegt die Blasenbildung bei den bullösen Autoimmundermatosen an unterschiedlichen Stellen der Haut. Zusätzlich ermöglichen die Zielstrukturen der Autoantikörper eine Einteilung in drei verschiedene Gruppen:

Tabelle 1 Einteilung der bullösen Autoimmundermatosen und deren Autoantigene. Abkürzungen: Desmoglein (Dsg), Desmocollin (Dsc), Immunglobulin (Ig), Bullöses Pemphigoid (BP), *Linear IgA Disease* (LAD)⁶

Erkrankung		Autoantigen
Pemphiguserkrankungen		
	Pemphigus vulgaris	Dsg-3, Dsg-1
	Pemphigus foliaceus	Dsg-1
	Paraneoplastischer Pemphigus	Dsg-3, Dsg-1, Plakine
	IgA Pemphigus	Dsc-1, Dsg-3
Pemphigoiderkrankungen		
	Bullöses Pemphigoid	BP180, BP230
	Gestationspemphigoid	BP180, BP230
	Muköser Membranen Pemphigoid	BP180, Laminin-5, Integrin
	Lineare IgA Erkrankung	LAD-1, Typ VII Kollagen
	Epidermolysis bullosa acquisita	Typ VII Kollagen
Dermatitis herpetiformis		Transglutaminasen

Bei den Pemphiguserkrankungen liegt die Blasenbildung intraepidermal und bei den übrigen subepidermal an der dermoepidermalen Junctionszone⁷. Die Ätiologie der Autoantikörperentstehung ist weitestgehend ungeklärt, die Pathogenese hingegen ist Gegenstand der aktuellen Forschung und offenbart einige immunologische und molekularbiologische Signalkaskaden.

1.1.5. Pemphiguserkrankungen

Die Pemphiguserkrankungen sind durch suprabasale Akantholyse (Verlust der Zell-Zell-Adhäsion) gekennzeichnete Autoimmundermatosen, die mit Autoantikörpern gegen hauptsächlich Dsg-3 und teilweise Dsg-1 einhergehen⁸. Neben Dsg-1 und -3 sind allerdings auch andere Autoantigene bekannt. Pemphigus ist die latinisierte Form des griechischen Wortes *pemphix*, bedeutend für Blase. Die Pemphiguserkrankungen umfassen mehrere Formen, welche sich histologisch, klinisch, immunpathologisch und molekularbiologisch unterscheiden lassen. Hauptsächlich wird in dieser Arbeit zwischen Pemphigus vulgaris (PV) und Pemphigus foliaceus (PF) unterschieden. Während beim PV klinisch eine mukokutane Erosionsbildung obligat ist, jedoch nicht zwangsläufig eine kutane Manifestation auftreten muss, fehlt diese bei PF.

Dies resultiert daraus, dass Patienten mit PV hauptsächlich Autoantikörper gegen Dsg-3 und nur teilweise gegen Dsg-1 bilden. Derweil produzieren PF Patienten ausschließlich Antikörper gegen Dsg-1, sodass hier eine rein kutane Manifestation zu finden ist. Ebenso unterschiedlich ist die Blasenbildung. Beim PV ist diese in den tieferen Schichten und bei PF in den höheren Schichten der Epidermis nachweisbar. Diese unterschiedlichen Phänotypen sind durch die im **Abschnitt 1.1.4.1.** beschriebenen unterschiedlichen Expressionsmuster der desmosomalen Cadherine zu erklären (s. **Abbildung 3**).

Im weiteren Verlauf soll sich hier jedoch auf die Form des PV konzentriert werden⁷.

1.2. Autoimmunität

1.2.1. Definition

Die Autoimmunität oder auch Autosensibilität umfasst eine pathologische, gegen körpereigenes Gewebe gerichtete Immunreaktion. Dieses körpereigene Gewebe wird als Antigen erkannt und es folgt eine Sensibilisierung von spezifischen B- und T-Lymphozyten und eine Produktion von Antikörpern gegen diese Autoantigene. Eine Aktivierung von autoreaktiven Lymphozyten ist jedoch nicht immer gleichbedeutend mit einer Autoimmunerkrankung. Ein geringer Grad an Autoreaktivität bewegt sich im Rahmen des Physiologischen und ist notwendig zur Ausbildung einer normalen Immunfunktion⁹. Wenn es dadurch zu Schädigungen von einzelnen Organsystemen oder auch des gesamten Organismus als pathologische Variante der Autoimmunität kommt, wird von einer Autoimmunerkrankung gesprochen^{9,10}.

1.2.2. Immuntoleranz

Während der Entwicklung von Lymphozyten in den primären lymphatischen Organen, wie z.B. dem Thymus, kommt es zu einer zufälligen Genreorganisation. Resultat dieses Zufallsprinzips sind einige Lymphozyten, die eine sehr niedrige, oder gar sehr hohe Affinität zu körpereigenen Antigenen aufweisen⁹. Die Fähigkeit zwischen „fremd“ und „eigen“ zu diskriminieren, wird durch verschiedene Mechanismen kontrolliert.

Die Entwicklung der T-Lymphozyten im Thymus stellt die zentrale Toleranz dar^{9,11}. Zunächst gehen hierbei unreife T-Lymphozyten, welche mit ihrem T-Zellrezeptor keine oder eine sehr starke Bindung zu einem Antigen eingehen, durch Apoptose zugrunde. Es überleben also nur die Lymphozyten, welche eine schwache Bindung mit ihrem Antigen eingehen.

Der Organismus verfügt allerdings nicht nur im Thymus über Antigene, sondern über weitaus mehr. Diese werden dann in der Peripherie den Lymphozyten präsentiert, wo die weitere Selektion, die periphere Toleranz erfolgt.

Die Hauptmechanismen der peripheren Toleranz beinhalten zum einen die Nicht-Aktivierung der Lymphozyten, die Anergie. Nach der Bildung eines Komplex aus Antigen, T-Zellrezeptor und Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Molekül, bleibt die Produktion von Co-Stimulantien und proinflammatorischen Zytokinen

aus Antigen-präsentierenden Zellen, welche sonst nur in Infektionssituationen produziert werden, aus.

Zum anderen beinhaltet die periphere Toleranz die Unterdrückung der Immunantwort durch regulatorische T-Zellen, die Induktion der Entwicklung von regulatorischen T-Zellen, anstatt von Effektor-T-Zellen und die Beseitigung von Lymphozyten durch Aktivitäts-induzierte Apoptose. Gleiches passiert, wenn das Antigen in einer zu hohen Konzentration im Organismus vorkommt^{9,11}.

1.2.3. Autoimmunerkrankungen

Die Schwelle an autoreaktiven Prozessen, die zu einer Autoimmunerkrankung führt, ist nicht gänzlich bekannt. Es lässt sich allerdings eine Kombination aus genetischer Veranlagung, einem Verlust der natürlichen Toleranzmechanismen und Umweltfaktoren, wie z. B. Infektionen, vermuten⁹.

Zuerst beschrieben Burnet und Mackay 1962 in ihrem Buch „*Autoimmune Diseases*“ umfassend dieses Thema, auf das sich nun die weitere Erforschung der vielfältigen Erkrankungen begründet¹². In ihrer Monographie definierten Mackay und Burnet Autoimmunerkrankungen als einen Zustand, in dem durch immunologisch-kompetente Zellen oder Antikörper, gerichtet gegen Komponenten des eigenen Körpers, struktureller oder funktioneller Schaden angerichtet wird¹³.

Mackay beschreibt hier mehrere Erkrankungen, die alle die folgenden klinischen Eigenschaften und pathologischen Marker von Autoimmunität aufweisen: das Vorkommen von Autoantikörpern, Hypergammaglobulinämie, Ablagerung von Immunkomplexen im Gewebe, Lymphozyten- und Plasmazellanreicherung im beteiligten Gewebe, ein therapeutischer Vorteil durch Kortikosteroide und zudem eine Überlappung von verschiedenen Autoimmunmanifestationen im selben Patienten¹³.

Mackay und Rose stellten 1992 eine Klassifikation mit 4 Hauptklassen für die Autoimmunerkrankungen auf, um die Vielfältigkeit zu kategorisieren¹⁴:

1. Autoimmunerkrankungen mit Antikörpern gegen organ-spezifische Antigene wie z.B. Autoimmunthyreoiditis mit Antikörpern gegen Thyreoperoxidase oder PV mit Antikörpern gegen Dsg-3 und -1.
2. Zelltyp-spezifische Autoimmunerkrankungen, mit einer Reaktivität gegen im gesamten Körper verbreitete Autoantigene, die eine klinische Symptomatik hervorrufen, wie z.B. Autoantikörper gegen den Acetylcholinrezeptor bei Myasthenia gravis.

3. Paradoxe Organ-spezifische Autoimmunerkrankungen, bei denen das Autoantigen in allen Zelltypen ubiquitär präsent ist, es allerdings nur diagnostisch, aber nicht für den klinischen Phänotyp relevant zu sein scheint und nur bestimmte Organe schädigt, wie z.B. das La-Nucleoprotein beim Sjörgen Syndrom oder mitochondrale Zielantigene bei der primären biliären Zirrhose.
4. Systemische Autoimmunerkrankungen wie der Lupus erythematodes, bei denen die Zielantigene in verschiedenen Zellorganellen ubiquitär im Körper verteilt sind, wodurch es vor allem durch Immunkomplexe zu unterschiedlichsten Schäden im Körper kommt.

Zur Manifestation einer Autoimmunerkrankung kommt es durch verschiedene Effektorzellen des Immunsystems. Hier spielt vor allem das Zusammenspiel von T-Zellen, B-Zellen und dem angeborenen Immunsystem die Hauptrolle. Die Reaktion dieser Zellen auf ein pathogenes Antigen fällt in der Regel nach dessen Elimination wieder ab. Da es bei einer Autoimmunerkrankung diesen Zellen jedoch nicht gelingt, das Autoantigen zu eliminieren, kommt es zu einer chronischen Entzündungsreaktion im Gewebe, welche immer mehr Autoantigene produziert. Im weiteren Verlauf einer Autoimmunerkrankung weitet sich die Immunantwort auf andere Epitope aus. Dieses Phänomen der Epitop-Ausweitung (*epitope spreading*) verstärkt die Erkrankungen in den meisten Fällen⁹.

1.2.4. (Auto)antikörper und deren Epitop-Ausweitung

(Auto)antikörper sind Immunglobuline, die von Zellen des adaptivem Immunsystems v.a. von Plasmazellen produziert werden. Sie kommen sowohl im Gesunden, wie auch bei Menschen mit Autoimmunerkrankungen vor¹⁵⁻¹⁷. Antikörper sind letztlich die sezernierte Form des B-Zell-Rezeptors und lassen sich in 2 verschiedene Regionen unterscheiden. Zum einen in die konstante Region (Fc-Region) mit einer Bindungsstelle und zum anderen in die variable Region. Dort entsteht durch die unterschiedliche Aneinanderreihung von Aminosäuren, eine hohe Variabilität der Antikörper spezifisch für multiple Antigene. Häufig werden Antikörper in Form eines Y dargestellt mit zwei Armen (s. **Abbildung 4**), an denen 2 identische variable Regionen lokalisiert sind und der konstanten Region als Fuß, welche die Effektorfunktion determiniert und mit anderen Immunzellen interagiert. Die schweren Ketten an der konstanten Region kann sich verändern, sodass sie die Antikörperklasse und damit deren primäre Funktion bestimmen.

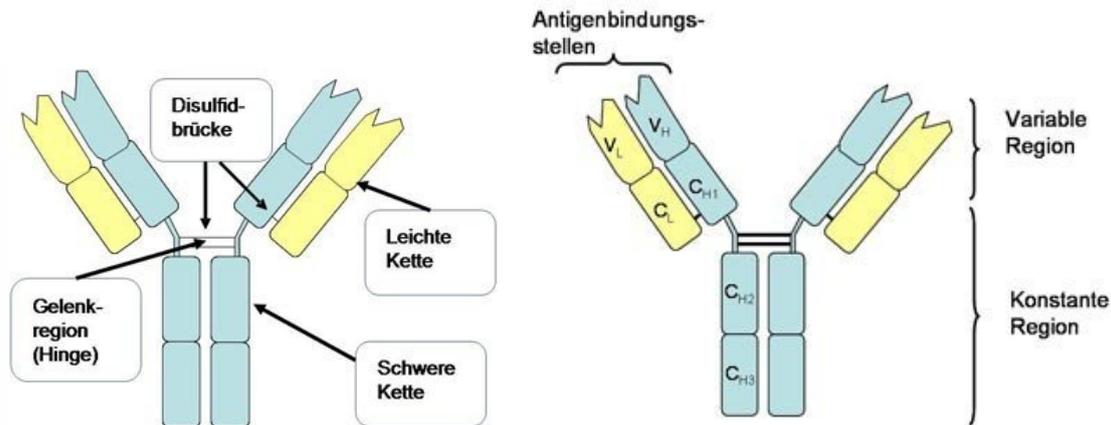


Abbildung 4 Schematischer Aufbau eines Immunglobulin (Ig) G Antikörpers. Das linke Bild zeigt die Unterteilung eines Immunglobulins in leichte und schwere Ketten. Die schweren Ketten bestimmen die Antikörperklasse IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Das rechte Bild stellt die Unterteilung in die variable Region, welche für das bindende Antigen spezifisch ist, und die konstante Region, mit welcher die Effektorzellen gebunden werden kann, dar¹⁸.

Es wird in 5 verschiedene Antikörperklassen unterschieden: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Jede Klasse kann von einem einzigen B-Zellklon produziert werden und unterscheidet sich demnach nicht in ihrer variablen Region. Diese besitzt keine spezielle Effektorfunktion, sondern ist für die Bindung eines spezifischen Antigens verantwortlich.

In Autoimmunerkrankungen sind bisher Autoantikörper der Klassen IgA, IgE, IgM und IgG beschrieben worden. In bullösen Autoimmundermatosen dominieren allerdings IgG Autoantikörper mit 4 verschiedenen Subklassen^{9,16}.

Wie bereits in **Abschnitt 1.2.1.** beschrieben kommt es im Verlauf der Erkrankung zur Produktion von Autoantikörpern nicht nur gegen das ursprüngliche Autoantigen, wie bei PV Antikörper gegen Dsg-1 und -3, sondern auch gegen weitere Autoantigene. Dieses Phänomen der Epitop-Ausweitung bedingt, dass sich die Immunantwort der B- und T-Zellen von dem primären Antigen-Epitop auf sekundäre Epitope ausweiten kann. Hier kann entweder von intramolekularer Epitop-Ausweitung gesprochen werden, wobei im Falle von PV nicht nur eine spezifische Region von Dsg-3 erkannt wird, sondern im Verlauf der Erkrankung mehrere Regionen von Dsg-3. Auf der anderen Seite steht die intermolekulare Epitop-Ausweitung, bei der es zu einer Antikörperproduktion gegen benachbarte Strukturen kommt^{19,20}.

Für PV sind nicht nur Autoantikörper gegen Dsg-1 und -3, sondern auch gegen weitere Strukturen von desmosomalen Catherinen, wie PG, Dsc, E-Cadherin beschrieben, welche zur Akantholyse beitragen und vermutlich ein Resultat von intermolekularer Epitop-Ausweitung sein könnten^{19,21}.

1.3. Pemphigus vulgaris

1.3.1. Epidemiologie

PV tritt mit einer Inzidenz von 1-5 Neuerkrankungen pro 1 Millionen Einwohner und Jahr auf. Es ist die häufigste Manifestation der Pemphiguserkrankungen in Mitteleuropa und Nordamerika und ist zwischen beiden Geschlechtern gleichmäßig verteilt. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen der 4. und 6. Lebensdekade, PV tritt jedoch auch bei älteren Menschen und Kindern auf⁷.

1.3.2. Klinik

Kennzeichnend für den PV sind schlabbe Blasen, welche sich zumeist primär in der oralen Mukosa und der scheinbar intakten Haut manifestieren. Es zeigen sich bei der Untersuchung der Wangenschleimhaut zumeist schmerzhaft Erosionen, welche durch die Scherkräfte beim Kauen vor allem im hinteren Anteil, an der *Gingiva*, Zunge und am Mundboden entstehen. Diese Erosionen können allerdings auch in weiteren Teilen der Schleimhäute entstehen, wie im *Pharynx*, *Larynx* und *Ösophagus*, wodurch Heiserkeit und Dysphagie auftreten können. Seltenerer Beteiligung der Schleimhäute sind neben Penis, Vulva und Anus auch an den Konjunktiven zu finden.

Die schlabben Blasen lassen sich durch Reiben auslösen und sind leicht verschieblich, bekannt als Nikolsky-Phänomen 1 und 2, und reißen durch ihre dünne Decke schnell ein. Aufgrund dessen sind die Prädilektionsstellen vor allem an stark beanspruchten Arealen zu finden, wie Schultern, Rücken, Gesäß, und Ellenbogen, wie zudem hauptsächlich das *Capellitium* und das Gesicht.



Abbildung 5 Klinisches Erscheinungsbild des Pemphigus vulgaris: (a) links sind Erosionen der oralen Mukosa zu erkennen, (a) rechts sind Erosionen nach Ablösung des Blasendaches am Rücken eines Pemphigus Patienten zu erkennen (modifizierte Abbildung aus Iwata *et al.* und Hammers *et al.*)^{22,23}

1.3.3. Diagnostik

1.3.3.1. Histopathologie

Typisch für den PV ist die suprabasale Akantholyse mit einer intraepidermalen Spaltbildung. Da die Hemidesmosomen nicht beeinträchtigt werden, bleibt eine basale Schicht an Keratinozyten auf der Basalmembran erhalten, das sogenannte Grabstein-Phänomen. Im Blasenlumen finden sich akantholytische Keratinozyten, Fibrin und eosinophile Granulozyten, welche auch im *Korium* zu erkennen sind^{7,8,24}.

1.3.3.2. Immunpathologie

Neben der Klinik und der Histopathologie ist die Immunpathologie eine wichtige diagnostische Methode, um den PV spezifisch nachzuweisen und von anderen Pemphiguserkrankungen abgrenzen zu können. In erster Linie spielen dabei die direkte und die indirekte Immunfluoreszenz eine besondere Rolle. In der direkten Immunfluoreszenz (DIF) zeigt sich in perilesional entnommenen Biopsien eine interzelluläre Ablagerung von Immunglobulin G (IgG). Diese ist teilweise auf die basalen Anteile der Epidermis limitiert, kann sich jedoch auch über die ganze Breite des Epithels erstrecken. Zusätzlich findet sich mitunter angrenzend dazu eine geringe Komplementfaktor-3-Ablagerung. Zirkulierende Serumantikörper können durch indirekte Immunfluoreszenz am besten auf Affenösophagus nachgewiesen werden. Da an Ösophagusepithel Dsg-3 besonders stark exprimiert wird, können hierdurch bei fast allen Patienten mit aktiver Erkrankung Autoantikörper im Serum nachgewiesen werden. Der Titer der PV Antikörper kann als Verlaufsparemeter und Therapiekontrolle hinzugezogen werden, da die Werte mit der Krankheitsaktivität korrelieren^{7,24}.

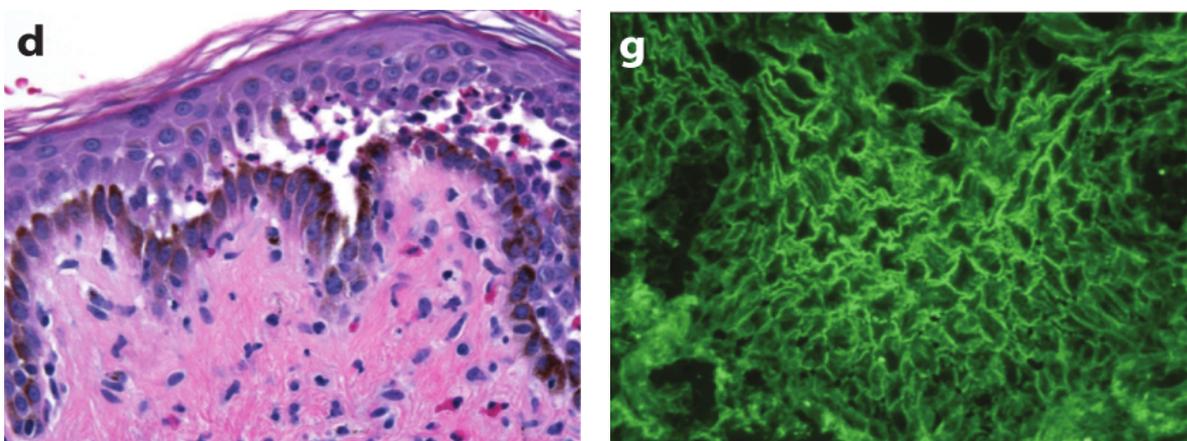


Abbildung 6 Diagnostik des Pemphigus vulgaris (PV): (d) Histologie eines PV Patienten mit suprabasaler Blasenbildung (g) indirekte Immunfluoreszenz von PV Serum auf Affenösophagus²³

1.3.4. Pathophysiologie

Beim PV finden sich immer Autoantikörper gegen Dsg-3, welches primär in der Mukosa exprimiert wird und unter Umständen auch Autoantikörper gegen Dsg-1, welches in den apikalen Schichten und in der Epidermis bis in die mittleren Schichten des Epithels exprimiert wird.

Initial findet sich eine Immunantwort gegen eine spezifische immundominante Domäne, die sich im Erkrankungsverlauf der Entzündung auch auf andere Autoantigene und Proteine, wie z.B. PG, Dsc, ausbreitet (s. **Abschnitt 1.2.4.**)^{19,25}.

Der genaue Pathomechanismus, der zur Blasenbildung in der Epidermis von PV Patienten beiträgt, weist Lücken und ungelöste Fragen auf²⁶. Im Laufe der Forschung haben sich einige Signalwege und Theorien, sowohl durch *in vitro* als auch aus *in vivo* Studien ergeben, deren Ergebnisse jedoch noch nicht zum gesamten Verständnis der Pathogenese beitragen konnten²⁶. Dominierend sind heutzutage zwei Theorien: die Hypothese der sterischen Hinderung und die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden (s. **Abbildung 7**).

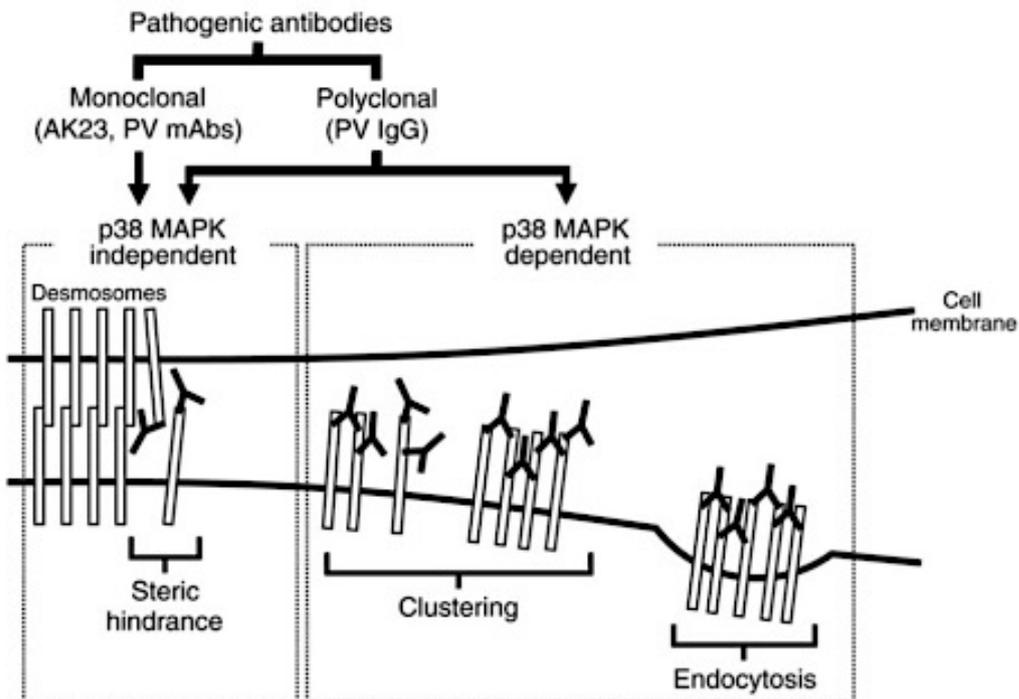


Abbildung 7 Modell zur Pathophysiologie bei Pemphigus vulgaris (PV)²⁷. Die pathogenen Antikörper können verschiedenen Ursprungs sein. Die in *in vitro* oder *in vivo* häufig verwendeten monoklonalen Antikörper (mAbs) wie der AK23, zeigen trotz Inhibition der p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38MAPK) die Fähigkeit zur Akantholyse, weswegen von einem Signalkaskade unabhängigen Weg über sterische Hinderung ausgegangen wird. Hingegen zeigen polyclonale PV Immunglobuline G (IgG) eine Zusammenlagerung der Desmosomen mit darauffolgender Endozytose und eine reduzierte Akantholyse, wenn die p38MAPK blockiert wird.

1.3.3.2. Hypothese der sterischen Hinderung

Nachdem die Familie der Desmosomen, spezifischer Dsg-1 und -3 als Hauptantigene identifiziert wurden^{28,29}, trat die Erkenntnis ein, dass die Autoantikörper vornehmlich an das aminoternale Ende (EC1-Domäne) von Dsg-3 binden³⁰⁻³². Es entwickelte sich die Hypothese der „sterischen Hinderung“^{33,34}, da die EC1 Domäne hauptverantwortlich für die *trans*-Interaktion zwischen den Dsg ist^{4,28,30,32,34}. Es wird dabei davon ausgegangen, dass durch die Bindung von PV IgG an die EC1 Domäne die adhäsive Interaktion der Desmosomen gestört wird und dadurch die Akantholyse eintritt²⁷. Diese These wird unterstützt, da zudem ein monoklonaler Antikörper AK23 entwickelt wurde, der sich spezifisch gegen die EC1 Domäne richtet und eine hohe Pathogenität aufweist^{35,36}.

Im Verlauf konnte allerdings nicht zwischen der direkten Inhibierung durch eine sterische Hinderung und allosterischen Effekten, z.B. durch die konformative Veränderung der Adhäsionsfläche von Dsg-3 durch Autoantikörper, diskriminiert werden⁴.

Eine weitere These stützt die Theorie der „sterischen Hinderung“. Es wird angenommen, dass der Adhäsionsverlust bei Autoantikörpern gegen entweder Dsg-1 oder Dsg-3 durch das jeweils andere Dsg ausgeglichen werden kann und dadurch kein intrazelluläres Signal entsteht, sondern es "nur" zu einem Verlust der Desmogleinfunktion führt^{4,33} (s. **Abbildung 8**).

Die Kompensationshypothese entwickelte sich vor allem durch die verschiedenen Phänotypen bei PF und PV Patienten, da Dsg-3 ist vor allem in den basalen Schichten der Epidermis vertreten, während Dsg-1 primär in den apikal gelegenen Schichten der Epidermis vorkommt.

Bei Patienten, die ausschließlich Autoantikörper gegen Dsg-3 bilden, kommt es primär zu einer Blasenbildung an den mukösen Membranen der Mundschleimhaut, wo Dsg-3 gegenüber den anderen Dsg-Isoformen dominiert, während die kutane Blasenbildung ausbleibt. Die kutane Blasenbildung tritt nur zusätzlich auf, wenn es zu einer Antikörperbildung gegen Dsg-1 und Dsg-3 kommt, da nun Dsg-1 nicht mehr für Dsg-3 kompensieren kann. Bei PF Patienten kommt es zu einer Bildung von ausschließlich Antikörpern gegen Dsg-1, so dass die Blasenbildung wesentlich oberflächlicher auftritt und die mukösen Membranen ausspart⁴.

Jedoch erklärt die Hypothese der sterischen Hinderung nicht, weswegen in der Elektronenmikroskopie von PV-Haut die Desmosomen kleiner und in reduzierter Anzahl erscheinen²⁵.

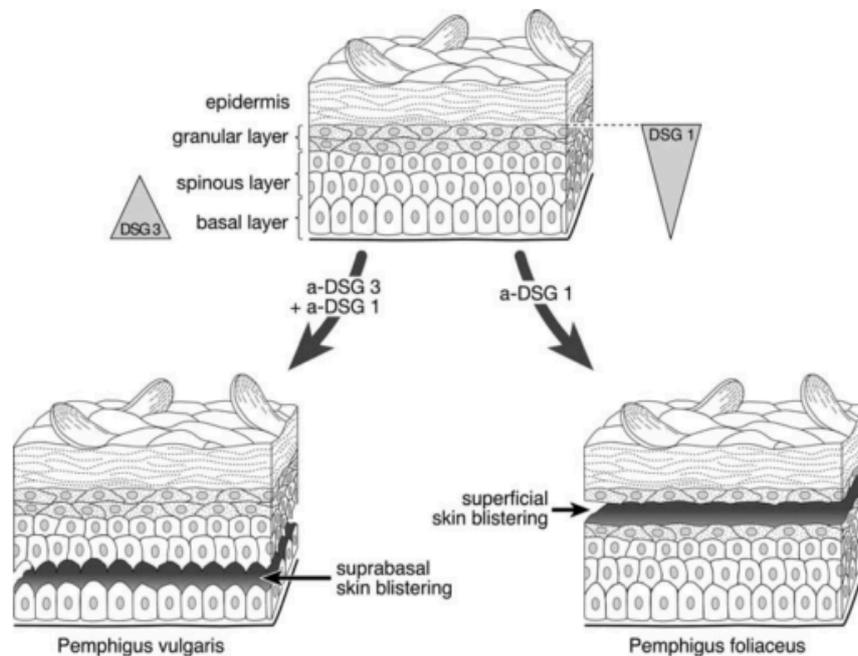


Abbildung 8 Die Desmoglein-Kompensations-Hypothese basiert auf den verschiedenen Autoantikörpern Desmoglein-1 und Desmoglein-3 (Dsg-1 und Dsg-3) im Pemphigus vulgaris (PV) und Pemphigus foeliaceus (PF)⁴. Während in den höheren Schichten der Epidermis im *Stratum granulare* die Dsg-1 Expression dominiert, finden sich in den basalen Schichten eine verstärkte Dsg-3 Expression, welche die verschiedenen Phänotypen von PV und PF erklären. Bei PV findet sich wie links unten im Bild dargestellt eine suprabasale Blasenbildung, während PF eine eher oberflächliche Blasenbildung vorweist.

1.3.4.3. Mechanismen der Akantholyse

Die Mechanismen der signalabhängigen und -unabhängigen Auswirkung von Dsg-1 und -3-Autoantikörper auf die Zell-Zell-Adhäsion, beinhaltet mehrere Veränderungen innerhalb der Keratinozyten. Inwiefern die Akantholyse das Resultat von unterschiedlichen Signaltransduktionen, von Genexpression oder der mechanischen Behinderung von desmosomaler Interaktion ist, bleibt weiterhin unklar.

Einige Prozesse innerhalb der Keratinozyten sind jedoch nachhaltig beschrieben und reproduzierbar. Im Vordergrund stehen der komplette Verlust von Desmosomen, die Veränderung von desmosomalen Strukturen und die Depletion von desmosomalen Strukturen von der Zelloberfläche, vermittelt über Endozytose^{4,27,37-41} (s. **Abbildung 9**). Es ist beschrieben, dass innerhalb von 30-60 Minuten nach Exposition mit PV IgG eine Internalisierung und lysosomale Zersetzung des

Dsg-3 zusammen mit PG, welches Zytoskelett-ungebunden vorliegt, erfolgt^{27,37,38,42,43}.

Es konnte außerdem dargestellt werden, dass sowohl der Aufbau als auch der Abbau vorrangig an Lipidflößen in der Zellmembran stattfindet und somit auch die Internalisierung über einen *lipid raft* vermittelten Signalweg erfolgt, welcher durch Cholesterin-bindende Substanzen verhindert werden kann^{25,38,43,44}. Des Weiteren kommt es zu einem Abbau des extradesmosomalen Dsg und dadurch zu einer insgesamt verringert messbaren Konzentration an Dsg-3^{35,37,38}.

Es konnte gezeigt werden, dass es durch polyklonales PV IgG zu einem *Clustering*, zur Endozytose und einer Veränderung in der Desmosomenmorphologie kommt, welche mit einem p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK) Inhibitor verhindert werden konnte^{27,45}. Die p38MAPK liegt gebunden an einen Komplex aus Dsg-3 und PG vor und ist in diesem Zustand inaktiv. Kommt es nun zu einer Spaltung von Dsg-3 und PG wird die p38MAPK aktiviert und unterstützt die Internalisierung und die Keratinretraktion⁴⁵⁻⁴⁷. Auf der anderen Seite ist auch der monoklonale Antikörper AK23 in der Lage die Zell-Zell-Adhäsion zu vermindern, jedoch ohne gleichzeitig *Clustering* und Endozytose zu provozieren. Dieser durch AK23 ausgelöste Prozess ist nicht durch einen p38MAPK Inhibitor blockierbar. Dies lässt vermuten, dass es neben der Endozytose und Depletion von Desmosomen noch weitere Mechanismen gibt, die zur Akantholyse beitragen⁴⁰.

Jenseits der Veränderung desmosomaler Strukturen, kommt es zu einer Reorganisation des Zytoskeletts und einer Retraktion der Keratinfilamente von den Zellverbindungen^{37,48-51}.

Zuletzt steht auch häufig der Mechanismus der Apoptose zur Diskussion, konnte jedoch auch nicht eindeutig belegt werden⁵². Während des Abbaues der Desmosomen liegt eine Aktivierung von proapoptotischen Enzymen, wie Caspase-3, c-myc, durch deren Blockierung *in vitro* und *in vivo* in Mausmodellen ebenfalls eine verminderte Akantholyse gezeigt werden konnte⁵²⁻⁵⁵.

Zusätzlich ist die p38MAPK Aktivierung auch in den Mechanismus der Apoptose involviert, wobei die Apoptose nicht zwangsläufig ursächlich für die Akantolyse ist^{53,54,56}. Eindeutig konnten jedoch keine apoptotischen Zellen in *in vivo* Patienten-Hautmodell nachgewiesen werden und auch die Datenlage der *in vitro* Modelle ist zwiegespalten^{53,56,57}. Neusten Erkenntnissen von Luyet *et al.*⁵³ zufolge kommt es

in der PV Pathogenese zu einer nicht-apoptotischen Erhöhung der Caspase-3, welche eine Umstrukturierung von Dsg-3 zur Folge haben könnte. Auch Bektas *et al.*⁵² beschreiben pro-apoptotische Enzyme eher im Rahmen des Abbaus von Desmosomen. Dabei könne die Inhibition von pro-apoptotischen Enzymen das Gleichgewicht eher in Richtung Stabilisierung und die Balance auf Seiten des Desmosomen-Aufbaus verschieben, wodurch eine verminderte Akantholyse zu erklären wäre.

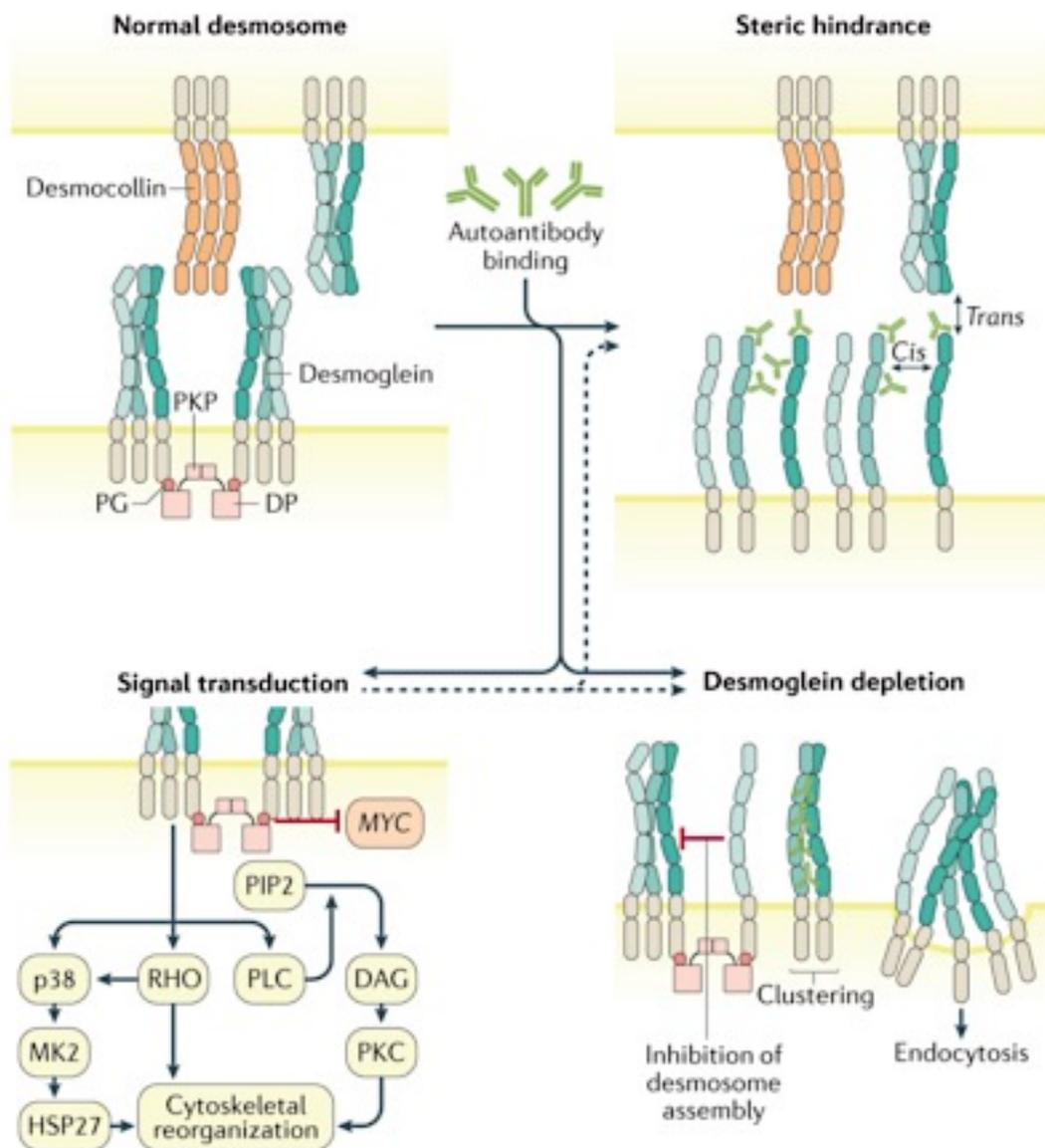


Abbildung 9 Mögliche Mechanismen der Akantholyse nach Kasperkiewicz *et al.*⁵⁸ In der Pathogenese des Pemphigus vulgaris (PV) kommt es durch die Bindung von Autoantikörpern an Desmoglein-1 und -3 zur Akantholyse, da die Desmoglein-vermittelte Interaktion zwischen zwei Zellen (*trans*-Adhäsion) und innerhalb einer Zelle (*cis*-Adhäsion) gestört wird. Dadurch ist die Anordnung der Desmosomen gestört. Dies führt einerseits zur Inhibition des Zusammenschlusses von Desmosomen und führt darüber zur Endozytose und Internalisierung von Desmoglein von der Zelloberfläche, andererseits zur Aktivierung von Signalkaskaden, die wiederum durch die Reorganisation des Zytoskelettes die Endozytose von Desmoglein bewirken kann. Abkürzungen: Diacylglycerol (DAG), Desmoplakin (DP), Hitzeschockprotein 27 (HSP27), MAPKAP-Kinase 2 (MK2), Plakoglobin (PG), Phosphatidylinositol 4,5- Bisphosphat (PIP2), Proteinkinase C (PKC), Plakophilin (PKP), Phospholipase C (PLC). p38- Mitogen activated protein kinase (p38), Rho GTPase (Rho)

1.3.4.3. Hypothese der intrazellulären Signalwege

Die Annahme, dass es zu einer Aktivierung von intrazellulären Signalwegen kommt, entspringt einer Studie von Seishima *et al.*⁵⁹, die in der humanen squamösen Zelllinie (DJM-1 Zellen) durch PV IgG und PF IgG eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) feststellte⁴. Dieses Ergebnis ließ die Schlussfolgerung zu, dass auch die Phospholipase C (PLC), welche die Spaltung von Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat (PIP_2) in Diacylglycerol (DAG) und IP_3 katalysiert, und die Proteinkinase C (PKC) als nachgeschaltetes Molekül der PLC in die Signaltransduktion involviert sind^{33,59,60}.

Die Arbeitsgruppe von Chernyavsky *et al.*⁶¹ konnte eine protektive Wirkung von Cholinmimetika auf PV IgG induzierte Akantholyse zeigen, wodurch eine Involvierung der nikotinergen und muskarinergen G-Protein Aktivierung in der Pathogenese der PV IgG induzierten Akantholyse zu diskutieren ist.

Als ein weiteres Schlüsselmolekül wurde bisher PG identifiziert, welches einen Komplex mit Dsg einget^{33,62}. PG-defiziente Maus Keratinozyten zeigen keine Keratinretraktion und keinen Verlust der Zelladhäsion auf PV IgG Exposition und die Zahl der Desmosomen ist um das 20-fache reduziert⁴⁸.

PV IgG bewirkt einen Umbau von Membranen Dsg-3 und PG, welches ebenfalls nach der Bindung des Antikörpers an Dsg-3 transloziert, so dass es zu einem Verlust der Zell-Zell-Adhäsion kommt. Aus dem Umbau von Membranen Dsg-3 und PG resultiert eine Überexpression des Transkriptionsfaktor *c-myc*. Inhibitoren von *c-myc* und der Glykogensynthetase-Kinase 3β (GSK 3β), eine Kinase welche in die Degradierung von β -Catenin und PG involviert ist³³, können die Blasenbildung durch PV IgG in neonatalen Mäusen verhindern^{42,50}.

Das wohl am meisten diskutierte Molekül in der durch die Autoantikörper gegen Dsg-3 ausgelösten Signalkaskade, ist die p38MAPK³³. Berkowitz *et al.*^{49,63} konnten über den Nachweis von phosphoryliertem Hitzeschockprotein 27 (HSP27), ein nachgeschaltetes Produkt der p38MAPK, dessen Aktivitätserhöhung *in vitro* nach etwa 30 Minuten und *in vivo* nachweisen. Ebenfalls zeigten sie, dass die Inhibition der p38MAPK den PV Phänotyp im neonatalen Mausmodell verhindern kann und die PV IgG induzierten Keratin- und Aktinreorganisation *in vitro* blockiert. Das HSP27 wird mittels Phosphorylierung durch die p38MAPK von großen in kleine Oligomere geteilt⁴⁹. Danach folgten weitere Studien

verschiedener Arbeitsgruppen, die eine Korrelation des Verlustes der Zelladhäsion mit der Aktivität von p38MAPK durch Phosphorylierung herstellen konnten^{34,38,51,64–66}. Die p38MAPK wird über einen vorbestehenden Komplex der Kinase mit Dsg-3 aktiviert, wenn dieser von einem Autoantikörper gebunden wird^{38,64,65}.

Haupteffektor unterhalb der p38MAPK ist die MAPKAP-Kinase 2 (MK2). PV Antikörper können die MK2 *in vivo* in Hautbiopsaten von PV Patienten und im Mausmodell, wie auch *in vitro* in normalen humanen epidermalen Keratinozyten (NHEK) aktivieren. Nach der Aktivierung (Phosphorylierung) erfolgt eine Translokation vom Nukleus ins Zytoplasma, wo MK2 direkt das HSP27, wie in **Abbildung 10** dargestellt, phosphoryliert. Eine Inhibition von MK2 und p38MAPK kann die spontane Blasenbildung verringern, nicht aber die Blasenbildung durch mechanischen Stress⁶⁷.

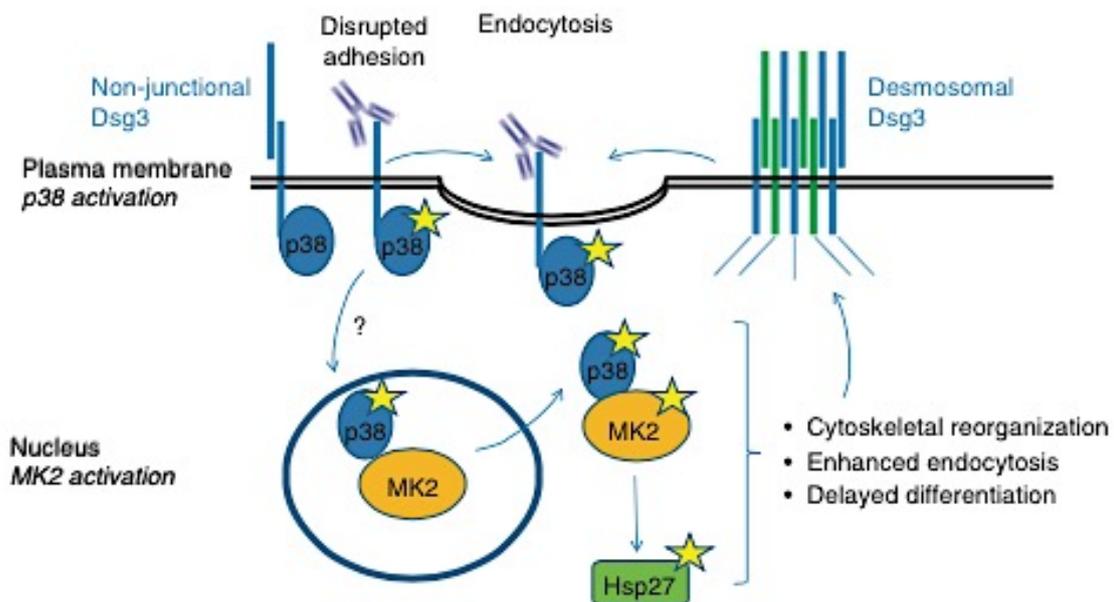


Abbildung 10 Ein hypothetisches Modell der p38 MAPK Aktivierung durch Desmoglein-3 (Dsg3) Antikörper Bindung⁶⁴. Die Bindung von pathogenen Dsg3 Antikörpern an nicht gebundenem Dsg3 führt zur Aktivierung der p38 MAPK Kinase und damit über die Translokation in den Nucleus zur Aktivierung und ebenfalls Phosphorylierung der MAPKAP-Kinase 2 (MK2), welche daraufhin das Hitzeschockprotein 27 (Hsp27) aktiviert. Dies führt zu einer Reorganisation des Zytoskelettes und einer verstärkten Endozytose des Dsg3.

Als ein weiteres Zielmolekül der p38MAPK wird Rho A-Guanosintrisphosphatase (GTPase) vermutet, welche durch die p38MAPK phosphoryliert und dadurch inaktiviert wird. Waschke *et al.*⁶⁸ konnten zeigen, dass Rho A in einer zentralen Rolle die Verankerung der desmosomalen Proteine an den Keratinfilamenten des Zytoskeletts reguliert.

Ebenfalls Gegenstand der gegenwärtigen Diskussion ist der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (*Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR). Diverse Arbeitsgruppen konnten darstellen, dass eine Inhibition des EGFR bzw. eine ausbleibende Aktivierung durch vorgeschaltete Moleküle mit einer verringerten Akantholyse assoziiert sind^{41,51,66}.

1.3.5. Therapie

In der Therapie des PV hat sich vor allem die Verabreichung von Kortikosteroiden, in Form von Prednisolon, etabliert. Nach systemischer Applikation wirken sie zwar relativ schnell, allerdings nicht lokal auf die zirkulierenden Antikörper und sind daher für eine topische Applikation ungeeignet. Als ein therapeutischer Effekt der Kortikosteroide wird vermutet, dass sie die Synthese von Dsg-Isoformen erhöhen und angelehnt an die Dsg-Kompensations-Hypothese dadurch die Zellverbindung der Epidermis stärken^{23,58}.

Zudem sind Kortikosteroide Teil eines immunsuppressiven Therapieansatzes, welcher das Ziel verfolgt, die Antikörperproduktion generell zu vermindern. Hierzu werden in der klinischen Praxis weitere immunsuppressive Substanzen wie z.B. Azathioprin und Mycophenolat-Mofetil verwendet. Sie können einerseits den Bedarf von Kortikosteroiden senken, bringen jedoch andererseits durch ihre immunsuppressive Wirkung und lebensbedrohliche Knochenmarksuppression ebenfalls eine hohe Nebenwirkungsrate mit sich^{23,58,69}.

Hingegen zeigt die immunmodulative Therapie mit Rituximab, einem monoklonalen anti-CD20-Antikörper, der sich gegen die CD20⁺ B-Zellen richtet und deren Antikörperproduktion hierdurch herunterreguliert, eine hohe Rate an Remissionen bei PV Patienten^{23,58,69-71}.

Ein weiterer therapeutischer Ansatz um die Anzahl der zirkulierenden Antikörper zu reduzieren, werden intravenöse Immunglobuline, Immunapherese und Plasmapherese bei Patienten mit einer sehr hohen Last an Antikörpern oder bei therapierefraktären Patienten eingesetzt. Diese Methoden wirken schnell und zuverlässig, werden allerdings mit einer immunsuppressiven Therapie kombiniert und sind ebenfalls mit deren Nebenwirkungen verbunden^{23,58,69}. Bisher ist noch keine zielgerichtete topische Therapie vorhanden, so dass häufig eine systemische Therapie mit einer hohen Rate an Nebenwirkungen erfolgen muss.

1.4. Ziel der Arbeit

1.4.1. Spezifische Fragestellung

Durch diese Arbeit sollen weitere Mechanismen, die zum Verlust der Zell-Zell-Kontakte bei PV Patienten durch Dsg-3 Antikörper führen, aufgedeckt werden. Hierzu wurden 141 Substanzen der *Target Selective Inhibitory Library* von Selleckchem *in vitro* an immortalisierten humanen Keratinozyten (HaCat-Zellen) getestet und die Akantholyse mittels Fluoreszenzfarbstoffen dargestellt.

Ziel ist es, einige bereits häufig beschriebene Komponenten bekannten Signalkaskaden, wie z.B. p38MAPK, EGFR zu bestätigen und neue, bisher unbekannte Signalmoleküle dieser Mechanismen zu explorieren.

Zudem soll das Nachweisverfahren der Dsg-3 Internalisierung als Methode zur objektivierbaren Darstellung von Dsg-3-Internalisierung etabliert werden.

2 Material und Methoden

2.1. Zellkultur

Die immortalisierte humane Keratinozyten Zelllinie HaCat⁷² wurde in *Keratinocyte Growth Medium 2* (KGM2) (*Promocell, Heidelberg, Deutschland*) zusammen mit 0,6 mM CaCl₂, den mitgelieferten Zusatzpräparaten, bestehend aus bovinem hypophysären Extrakt, epidermalem Wachstumsfaktor, Insulin, Hydrokortison, Epinephrin und Holotransferrin (*jeweils Promocell, Heidelberg, Deutschland*), sowie 1% Penicillin G/Streptomycin (*PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland*) in einem angefeuchteten Klima (95% Luft/ 5% CO₂) bei 37°C des Heracell 240i CO₂-Inkubator (*Thermo-Fisher scientific, Waltham, MA, Vereinigte Staaten*) zu einer 100%igen Konfluenz in einer TC-Flasche 175 (*Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland*) herangezogen. Diese Konfluenz erreichten die Zellen etwa 7 Tage nach der Aussaat, woraufhin sie in der TC-Flasche 2x mit 20 ml Dulbecco's *Phosphate-Buffered Saline* (DPBS) (*Gibco, Thermo-Fisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten*) vorsichtig gewaschen wurden. Um die Zellen vom Boden der Flasche zu lösen, wurden sie mit 5 ml Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Lösung (*PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland*) für 10 Minuten im Inkubator bedeckt. Um den enzymatischen Prozess zu stoppen, wurde 1 ml von fetalem Kälberserum (FCS) (*Gibco, Thermo-Fisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten*) hinzugegeben und das gesamte Volumen, zusammen mit weiteren 24 ml KGM2, in ein



Abbildung 11
Kammerobjektträger mit 8
Kammern 8

50 ml Falcon Röhrchen (*Corning, Corning, Vereinigte Staaten*) transferiert. Das gesamte Volumen von nun 30 ml wurde dann für 5 Minuten bei 1.500 Umdrehungen pro Minute (rpm) in der Zentrifuge 5810 (*Eppendorf, Hamburg, Deutschland*) zentrifugiert und danach der Überstand über den am Boden des Falcon Röhrchens komprimierten Zellen mit einer Pasteurpipette 230 mm (*Hecht Assistent, Sondheim/ Rhön, Deutschland*) abgesaugt. Daraufhin wurden 10 ml frisches KGM2 hinzugegeben und dieses nun vorsichtig aber sorgfältig mit den Zellen durchmischt.

Zur Auszählung der Zelldichte, wurde 10 µl der Zelllösung in ein Eppendorf Gefäß (*Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland*) gegeben, mit 10 µl Trypan blau (*Sigma-*

Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten) vermischt und dann 10 µl auf die Neubauer Zählkammer (*Hecht Assistent, Sondheim von der Rhön, Deutschland*) aufgetragen und ausgezählt. Als finale Lösung wurden die Zellen mit KGM2 vermischt und einerseits in einer neuen TC-Flasche mit einer Konzentration von $0,8 \times 10^5$ Zellen/ml und andererseits 500 µl jeweils in die 8 Kammern der Kammerobjektträger (*Falcon culture slides, Corning, Corning, Vereinigte Staaten*) (s. **Abbildung 11**) mit einer Konzentration von $0,4 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät. Die ausgesäten Zellen auf den Kammerobjektträgern erreichten eine Konfluenz von etwa 95% durchschnittlich nach 3-4 Tagen.

2.2. Seren von Pemphigus vulgaris Patienten

Die verwendeten Seren stammen von Patienten mit PV, die sich im Zeitraum von 2009 bis 2015 ambulant oder stationär in der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie des Universitätsklinikums Lübeck zur Immunapherese vorstellten. Es handelt sich bei den Seren also um Immunapheresematerial, jedoch zur Vereinfachung im weiteren Verlauf der Arbeit von PV Seren gesprochen wird.

Das Alter der 8 Patienten lag zum Zeitpunkt der Verwendung der Seren zwischen 33 und 72 Jahren (im Durchschnitt 57,5 Jahre). Das Sammeln und Aufreinigen der Proben wurde von der medizinisch-technischen Angestellten Vanessa Krull unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Enno Schmidt durchgeführt. Das Verwenden der Proben wurde durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck (*Ethikvotum-Nr. 12-178*) genehmigt. Über die Proben sind neben Entnahmedatum, auch die ELISA-Werte für Dsg-1 und Dsg-3 bestimmt und dokumentiert worden.

Die Auswahl geeigneter Seren erfolgte anhand der ELISA-Werte (Maßeinheit= Relative Einheit (RE)) nach dem Kriterium eines möglichst hohen Wertes (Min. 33 RE/ml, Max. 17180 RE/ml, im Durchschnitt 9129 RE/ml) für Dsg-3 und eines möglichst niedrigen Wertes für Dsg-1 (vergleiche **Anhang Tabelle 5**). Dadurch soll der Einfluss von Anti-Dsg-1 Antikörpern auf den Verlust der Zell-Zell-Kontakte möglichst niedrig gehalten werden. Vor der Verwendung der Seren wurden diese steril in *Centrifugal Filter Units* (*Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, Vereinigte Staaten*) für 30 Minuten bei 9.000 g in der Sigma Zentrifuge 1-14 (*Sigma- Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten*) filtriert.

Die IgG-Konzentration der einzelnen Seren wurde mithilfe des NanoDrop 2000 (*Thermo- Fisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten*) bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt.

2.2.1. Titration der Pemphigus vulgaris Serumkonzentration für das Nachweisverfahren der Desmoglein-3 Internalisierung

Die Internalisierung von Dsg-3 muss zum einen gut sichtbar, aber auch zu einer prozentual an der Fluoreszenzintensität gemessenen Reduktion von Dsg-3 führen. Daher wurde in Vorversuchen durch Dr. Hiroshi Koga und mich die Konzentration des PV-IgGs im Versuchsaufbau wie in **2.4.** beschrieben graduell gesteigert. Es wurden hierzu folgende Konzentrationen 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml und 160 µg/ml verwendet. Diese wurden immer mit einer Negativkontrolle mit normalem humanem Serum (NHS) in einer Konzentration von 100 µg/ml verglichen.

Bei einem der 4 PV Seren musste die IgG-Konzentration auf 1 mg/ml erhöht werden, da der gewünschte Effekt bei 160 µg/ml ausblieb. Hier erfolgte eine Titration von 240 µg/ml, 320 µg/ml und schließlich 1 mg/ml, die die gewünschte prozentuale Reduktion der Fluoreszenzintensität auf etwa 60% im Vergleich zur Negativkontrolle erbrachte.

2.3. Selleckchem *Target Selective Inhibitory Library*

Die *Target Selective Inhibitory Library* von Selleckchem (*München, Deutschland*)⁷³ umfasst 141 verschiedene Substanzen, die sich gegen unterschiedliche Zielsubstanzen verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden richten. Die Firma Selleckchem verspricht dabei eine minimale Nebenaktivität gegenüber anderen möglichen Zielen intrazellulärer Signalwege, d.h. eine hohe Spezifität. Darunter fallen bekannte Ziele wie z.B. mTOR, MAPKinasen, HSP90, etc.. Des Weiteren sind Struktur, die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) und der spezifische Wirkort bekannt⁷³. Alle Substanzen sind in 100%igem Dimethylsulfoxid (DMSO) (*Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten*) gelöst. Bis zur Verwendung werden sie bei -80°C gelagert.

2.4. Nachweisverfahren der Internalisierung von Desmoglein-3

Die Keratinozyten wurde auf dem Kammerobjektträger bis zur Konfluenz von 95% in KGM2 mit 0,6 mM Ca^{2+} kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurde die Ca^{2+} -Konzentration auf 1,5 mM erhöht, um die Ausformung der Zell-Zell-Kontakte und die Differenzierung der Keratinozyten zu induzieren³⁶. Alle Schritte erfolgen daraufhin in den Kammern der Kammerobjektträger (s. **Abbildung 11**).

Vierundzwanzig Stunden nach Erhöhung der Kalziumkonzentration erfolgte die Zugabe der Substanzen der *Target Selective Inhibitory Library*, so dass die Keratinozyten einer Konzentration von entweder 10 μM , 1 μM oder 0,1 μM in je 0,1% DMSO und in DPBS Lösung in KGM2 ausgesetzt wurden. Nach 2 Stunden Präinkubation mit den Substanzen wurden die Keratinozyten mit dem Serum eines PV Patienten mit einer IgG-Konzentration von 160 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 1 mg/ml (s. **Abschnitt 2.2.1.**) behandelt. Zusätzlich wurden die in DPBS gelösten Substanzen erneut hinzugegeben und nun für weitere 24 Stunden bei 37°C im Inkubator belassen.

Nach 24 Stunden wurde der Überstand in den Kammern vorsichtig mit einer Pasteurpipette 230 mm (*Hecht Assistent, Sondheim/ Rhön, Deutschland*) abgesaugt und 3x mit je 500 μl DPBS gewaschen. Um die Zellen zu fixieren, wurden sie mit Formalaldehyd (4% Histofix) (*Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland*) für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgten wiederum 3 Waschschrte mit DPBS.

Die Zellschicht wurde nachfolgend mit einem blockierenden Puffer aus 10% Ziegenserum (*Dako, Glostrup, Dänemark*) und 1% bovinem Serumalbumin (BSA) (*Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland*) für 20 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Daraufhin wurde der blockierenden Puffer abgesaugt und die Zellen mit einem Anti-Dsg-3-Antikörper (*Acris Antibodies, Herford, Deutschland*) verdünnt in 1:100 DPBS und für 1 Stunde gefärbt. Es folgten erneut 3 Waschschrte mit DPBS, um die Zellen dann mit dem sekundären Cy3-konjugiertem Anti-Maus-Antikörper (aus der Ziege) (*Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, Vereinigte Staaten*), verdünnt in 1:100 DPBS, für 1 Stunde im Dunkeln zu färben. Die Zellen wurden wieder 3x mit DPBS gewaschen und danach mit 100%igem Ethanol (*Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland*) für 10 Minuten im Dunkeln fixiert.

Mit dem, den Kammerobjektträgern beiliegendem, Werkzeug wurde das aufliegende Kammerfeldgerüst von den Objektträgern entfernt, die Objektträger

kurz an der Luft getrocknet und dann mit 1 µl Mowiol (*Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten*) pro Kammerfeldfeld des Objektträgers beschichtet. Abschließend wurde der Objektträger mit einem Deckglas 24 x 60 mm (*Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland*) versehen.

Alle fertig gefärbten Objektträger wurden bei 4°C im Dunkeln gelagert und etwa 2-3 Tage nach der Färbung unter dem Fluoreszenz-Mikroskop von Keyence (*Osaka, Japan*) untersucht.

2.5. Evaluation der Desmoglein-3 Internalisierung mittels ImageJ

Die Objektträger wurden 2-3 Tage nach der Färbung unter dem Keyence-Mikroskop untersucht und es wurden von jedem Kammerfeld 6 Fotos gemacht, d.h. von jedem einzelnen Versuchsansatz. Die Einstellungen für die Aufnahme jedes einzelnen Kammerfeldes einer Versuchsreihe, also der am gleichen Tag gefärbten Objektträger, waren die gleichen und sahen wie folgt aus:

1. *Immunofluorescence Mono*
2. 0 dB
3. *Exposure time* je nach Versuchsreihe zwischen 1,5 und 3,5/s

Es erfolgten Aufnahmen von 5 zufällig gewählten, unterschiedlichen Stellen eines jeden Kammerfeldes des Objektträgers in 100-facher Vergrößerung und ein sechstes Foto, zur Detailansicht und besseren Darstellbarkeit in einer 400-fachen Vergrößerung. Die Fotos in 100-facher Vergrößerung wurden von Stellen genommen, die nicht am Rand des Kammerfeldes lagen, da dort die Keratinozyten häufig dichter und überlagert wuchsen und dort somit eine stärkere Fluoreszenzintensität zeigten.

Für jeden Versuch, der durchschnittlich aus 3-4 Objektträgern mit je 8 Kammerfeldern bestand, gab es ein Kammerfeld mit der Positivkontrolle, die nur aus dem PV Serum zusammen mit dem Lösungsmittel (DPBS mit 0,1% DMSO) bestand, und eine Negativkontrolle mit NHS zusammen mit dem o.g. Lösungsmittel.

Die gesamte Fluoreszenzintensität der Fotos wurde mit dem *OpenSource* Programm ImageJ (*Version 1.48, Entwickler: Wayne Rasband, National Institute of Health, USA*) gemessen und folgende Parameter erhoben:

1. *Area*
2. *Mean*

3. *Standard deviation*
4. *Mode*
5. *Minimum*
6. *Maximum*
7. *Intensity density*
8. *Raw intensity density*

Von den 5 Fotos wurde jeweils der Mittelwert der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (*Mean*) ermittelt. Der Mittelwert einer jeden Substanz wurde nun ins Verhältnis zu den Mittelwerten der Positiv- und Negativkontrolle gesetzt. Dabei stellt die Negativkontrolle die 100%ige Fluoreszenzintensität und die Positivkontrolle eine prozentual verringerte Fluoreszenzintensität dar. Die Fluoreszenzintensität der Bilder repräsentiert einen Wert, mit dem es möglich gemacht werden soll, die Internalisierung des angefärbten Dsg-3 objektivierbar zu machen und zu messen. Es wird also davon ausgegangen, dass nur das Dsg-3 angefärbt wird, welches sich noch an der Zelloberfläche/Zellmembran befindet und nicht in Vesikeln im Zellinneren verpackt und damit nicht anfärbbar ist. So bedeuten 100% Fluoreszenzintensität keine Internalisierung von Dsg-3. Die Prozentzahl der die Positivkontrolle, normiert an der Negativkontrolle, der Grad der Internalisierung von Dsg-3 von der Zelloberfläche (s. **Abbildung 12**).

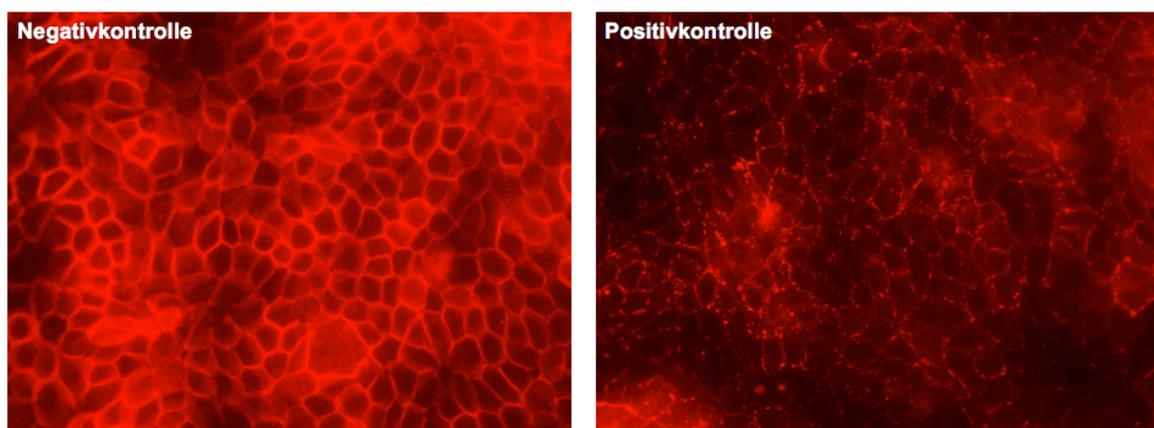


Abbildung 12 Fluoreszenzintensität der Negativ- und Positivkontrolle im Desmoglein-3 Internalisierungsassay. Das linke Bild zeigt die Positivkontrolle, bei der die Keratinozyten mit dem Pemphigus vulgaris Serum mit einer IgG-Konzentration von 160 µg/ml für 24 Stunden ausgesetzt waren. Im rechten Bild wurden die Keratinozyten nur mit normalem humanem Serum inkubiert. Hier zeigt sich mittels Immunfluoreszenz eine deutlich intensivere Fluoreszenzintensität von Desmoglein-3 entlang der Zellmembranen.

Nach subjektiver Bestätigung der Methode (s. **Abschnitt 2.5.1**) wurde eine Grenze zur Auswahl der weiteren Investigation der Substanzen gesetzt. Diese Grenze wurde erreicht, wenn das Delta aus der Fluoreszenzintensität von Negativ- und Positivkontrolle durch Zugabe der Substanz um mehr als 50% verbessert werden konnte.

2.5.1. Evaluation der Werte von ImageJ und des Grades der Internalisierung

Um die Werte der ImageJ Kalkulation zu bestätigen, wurden zufällig ausgewählte einzelne Substanzen mit ihrer jeweiligen Positiv- und Negativkontrolle verblindet untersucht und bewertet. Dabei wurde folgender *Score* festgelegt:

0= keine Dsg-3 Internalisierung

1= geringe Dsg-3 Internalisierung

2= mäßige Dsg-3 Internalisierung

3= starke Dsg-3 Internalisierung

Der Untersucher legte für die Fotos in 400-facher Vergrößerung einen *Score* verblindet fest, ohne die Werte der Messung mit ImageJ zu kennen.

2.6. Nachweisverfahren zur Keratinozyten Dissoziation

Wie in 2.1. beschrieben wurden die Zellen kultiviert und danach auf einer 12-Well Mikrotiterplatte (*Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland*) mit einer Zelldichte von $0,4 \times 10^5$ Zellen/ ml und 1 ml pro Well ausgesät. Die Konfluenz von 100% wurde auch hier nach etwa 3-4 Tagen erreicht.

Das folgende Prozedere ist an den *Keratinocyte Dissociation Assay* von Ishii *et al.*³⁶ angelehnt, enthält aber einige Änderungen, die im Nachfolgenden beschrieben werden. Die Schritte bis zur Stimulation mit den PV Seren sind identisch zum Vorgehen in **Abschnitt 2.4.**, nur dass, angepasst an das größere *Well*, jeweils das doppelte Volumen aller Flüssigkeiten und Substanzen verwendet wurde.

Es wurde eine PV-IgG Konzentration von 2 mg/ml gewählt, die sich in vorbereitenden Experimenten, in der Arbeit von Fanny Weiß als wirkungsvoll in Bezug auf eine deutliche Fragmentierung von etwa 10 bis 100 Fragmente erwiesen hatte.

Nach 24-stündiger Inkubation mit dem PV Serum wurden die Zellen 2x mit 1 ml pro Well der *Hanks' Balanced Salt Solution* (HBSS mit CaCl_{2+} und MgCl_{2+}) (*Gibco, Thermo- Fisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten*) gewaschen. Es folgte

eine mindestens 20-minütige Inkubation mit einer Lösung aus Dispase (*Stemcell technologies, Vancouver, British Columbia, Kanada*) mit einer Aktivität von 5 U/ml, 1:1 verdünnt in HBSS, und einem Volumen von 500 µl pro Well bei 37°C im Inkubator. Nach dem vollständigen Ablösen der Zellschicht vom Boden des Wells wurde die Dispase-Lösung vorsichtig gegen 1 ml HBSS ausgetauscht und die Zellschicht wiederum zweimal mit je 1 ml HBSS gewaschen. Vor dem nächsten Pipettierschritt wurden die Pipetten für mindestens 15 Minuten mit 1% BSA in HBSS beschichtet. Um die Zellschicht nun mechanischem Stress in Form von Scherkräften auszusetzen, wurde die Zellschicht 5x in die Pipettenspitze (*Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland*), mit einer 1ml Pipette (*Eppendorf, Hamburg, Deutschland*) vollständig bei gleichbleibender Kraft und Geschwindigkeit hinein- und hinauspipettiert.

Die dadurch entstandenen Fragmente wurden mit 100 µl Formaldehyd (4% Histofix) fixiert und mit 1-2 µl Kristallviolett (*Sigma- Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten*), 1:10 verdünnt in DPBS, gefärbt.

Nach 2-3 Tagen wurden Fotos von jeweils 2 Wells ein jeder Platte im *Gel Dokumentations System (Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland)* gemacht und die einzelnen Fragmente auf den Fotos manuell ausgezählt. Hierbei ergab die Negativkontrolle zwischen 1 und 5 Fragmente und je nach Serum die Positivkontrolle bis zu einem Zehnfachen mehr (s. **Abbildung 13**).

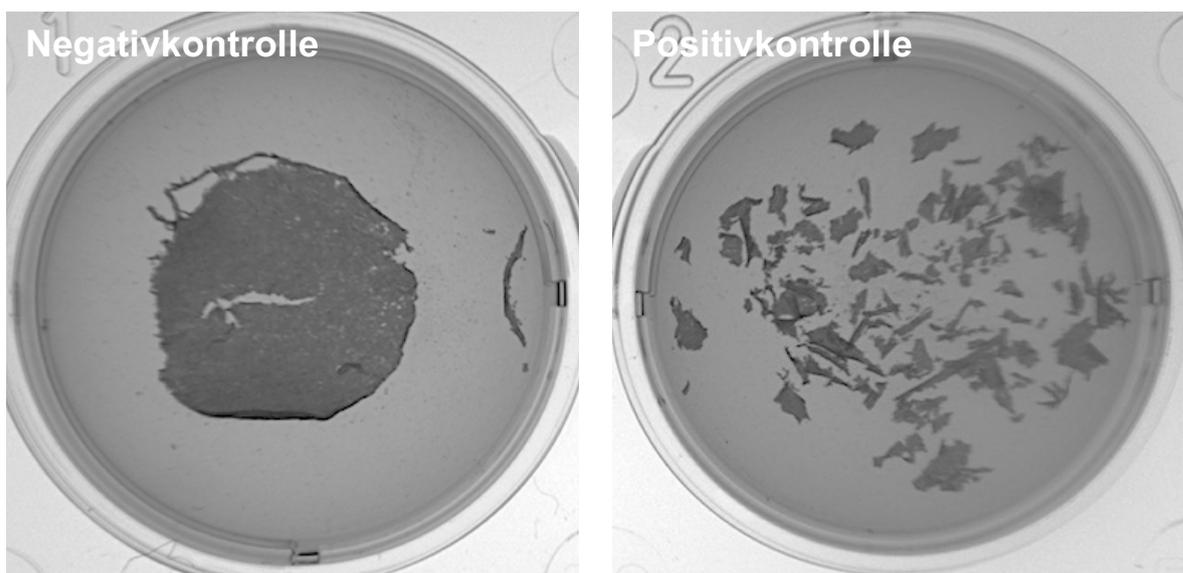


Abbildung 13 Negativ- und Positivkontrolle im Keratinozyten Dissoziationsnachweis. Das linke Bild zeigt die Negativkontrolle mit 2 Fragmenten, während im rechten Bild die Positivkontrolle zu sehen ist, welche eine starke Fragmentierung zeigt.

2.7. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism (Version 7.0e, geladen am 23.08.2018) für die 19 Substanzen, welche mit einem PV Serum im Nachweisverfahren der Dsg-3 Internalisierung das Delta aus der Fluoreszenzintensität von Negativ- und Positivkontrolle durch Zugabe der Substanz um mehr als 50% verbessert werden konnten. Die Tests wurden sowohl auf die Ergebnisse der Dsg-3 Internalisierung wie auch auf die Ergebnisse der Keratinozyten Dissoziation angewendet.

Zunächst wurde der Shapiro-Wilk Test auf die Normalverteilung angewendet. Wenn diese vorlag, wurden als erstes die Positiv- und Negativkontrolle mit einem ungepaartem t-Test verglichen. Zuletzt folgte dann bei Normalverteilung im Shapiro-Wilk Test, die Analyse mittels *One-way* ANOVA im Tukey's multiplen Vergleichstest, bei dem die einzelnen Konzentrationen jeweils mit der Positivkontrolle verglichen wurden.

Wenn keine Normalverteilung vorlag, wurden die Werte der einzelnen Konzentrationen gegen die Positivkontrolle mit dem Kruskal-Wallis Test bzw. im Dunn's multiplen Vergleichstest getestet.

Das Signifikanzniveau wurde zuvor mit $p < 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1. Etablierung des Nachweisverfahrens zur Quantifizierung der Desmoglein-3 Internalisierung

Das Nachweisverfahren der Dsg-3 Internalisierung wurde in der bisherigen Literatur zur Erforschung der Pathophysiologie des PV zur qualitativen Darstellung, aber nicht zur quantitativen Darstellbarkeit der Dsg-3 Internalisierung genutzt. In dieser Arbeit wurde nun die Intensität der Fluoreszenz als objektiver Parameter verwendet, um den Grad der Dsg-3 Internalisierung messbar zu machen.

Zunächst erfolgte jedoch die subjektive Bestätigung der Methode anhand des in **Abschnitt 2.5.1.** beschriebenen Scores, der die Werte der Fluoreszenzintensität mit dem Grad der Internalisierung vergleicht. Die Auswertung hierzu findet sich im **Anhang Tabelle 6.**

3.1.1. Die Reduktion der Fluoreszenzintensität durch *Pemphigus vulgaris* Seren liegt zwischen 60-70%

In der ersten Phase der Etablierung wurden jeweils alle 141 Substanzen der Selleckchem *Target Selective Inhibitory Library* in zwei Konzentrationen 10 μM oder 0,1 μM , und dem Spenderserum der ersten beiden Patienten getestet.

Hierzu wurde zu jedem Versuchsansatz eine Negativkontrolle mit normalem humanem Serum und eine Positivkontrolle mit einem der beiden Spenderseren hinzugegeben. Die gemittelte Fluoreszenzintensität der Positivkontrolle wurde wie in **Abschnitt 2.5.** beschrieben ins Verhältnis zur Negativkontrolle gesetzt. Dies wurde für das erste PV Serum 13x und für das zweite Serum 11x durchgeführt.

Das Serum des ersten Spenders zeigte eine durchschnittliche Reduktion der Farbintensität der Positivkontrollen auf 58,23%. Die Konzentration des Serums in den einzelnen Feldern der Kammerobjektträger war dabei immer 160 $\mu\text{g/ml}$.

In den Vorexperimenten mit dem Serum eines zweiten Spenders konnte mittels derselben Konzentration von 160 $\mu\text{g/ml}$, wie beim ersten Spender verwendet, keine genügende Internalisierung erreicht werden. Daraufhin wurde eine systematische Titration in Schritten von 160 $\mu\text{g/ml}$, 240 $\mu\text{g/ml}$ und 320 $\mu\text{g/ml}$ durchgeführt. Da hierdurch die Farbintensitätsreduktion nicht wie gewünscht erfolgte, wurde eine Konzentration von 1 mg/ml verwendet. Hierunter zeigte sich

eine vergleichbare Reduktion der Farbtintensität wie in den Experimenten, die mit dem ersten Spenderserum durchgeführt wurden. Die Farbtintensität der Positivkontrollen betrug dabei durchschnittlich 63,11%, so dass von einer Vergleichbarkeit zum ersten Spenderserum (58,23%) ausgegangen werden konnte. Wenn durch Hinzugabe einer Substanz die Differenz der Farbtintensität zwischen Positiv- und Negativkontrolle um mehr als 50% gesteigert werden konnte und dies im Versuch mit einem der beiden PV Seren gelang, qualifizierten sich diese Substanzen für eine nähere Investigation in der zweiten Phase. Nach Anwendung dieser Kriterien wurde nach zweifacher Testung mit den PV Seren PV-1 und PV-2 die Anzahl der Substanzen von 141 auf 19 Substanzen reduziert.

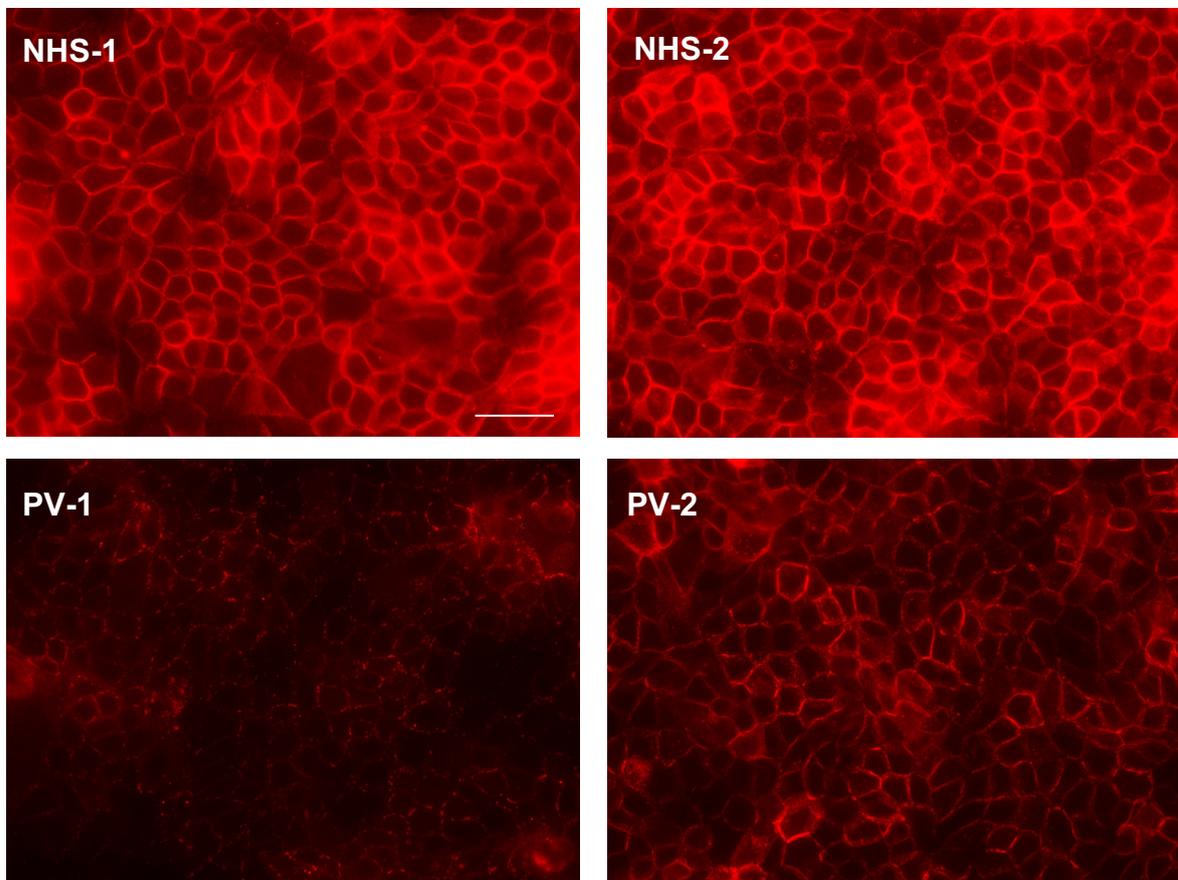


Abbildung 14 Negativkontrollen mit normalem humanem Serum (NHS) und Positivkontrollen mit den ersten beiden Pemphigus vulgaris (PV) Seren. Die Negativkontrollen mit NHS zeigen eine deutlich intensivere Fluoreszenzintensität und eine gleichmäßige Anfärbung der Zellmembranen, was auf eine durchgehende Präsenz von Desmoglein-3 (Dsg-3) an der Zelloberfläche hinweist. Hingegen weisen die Positivkontrollen mit den PV Seren 1 und 2 eine deutliche Reduktion der Fluoreszenzintensität auf. Zudem ist vor allem bei PV-2 eine Ansammlung des angefärbten Dsg-3 an der Zellmembran erkennbar. (Balken = 5 µm)

In der zweiten Phase der Etablierung erfolgte die nähere Investigation dieser 19 Substanzen zunächst mit der Testung von Patientenserum 3 und 4 mit der gleichen Serumkonzentration von 160 µg/ml und mit den 3 verschiedenen Substanzkonzentrationen von 10 µM, 1 µM und 0,1 µM. Die Positivkontrollen konnten hierbei eine ähnliche Reduktion der Fluoreszenzintensität erreichen, wie schon in der ersten Phase mit den Seren 1 und 2 und wurden 3x getestet. Das dritte Serum zeigte eine durchschnittliche Reduktion der Fluoreszenzintensität auf 65,76%, das vierte Serum eine durchschnittliche Reduktion der Fluoreszenzintensität 70,58%. Die **Abbildung 15** zeigt hierbei exemplarisch die Negativ- und Positivkontrollen für die PV Seren 3 und 4.

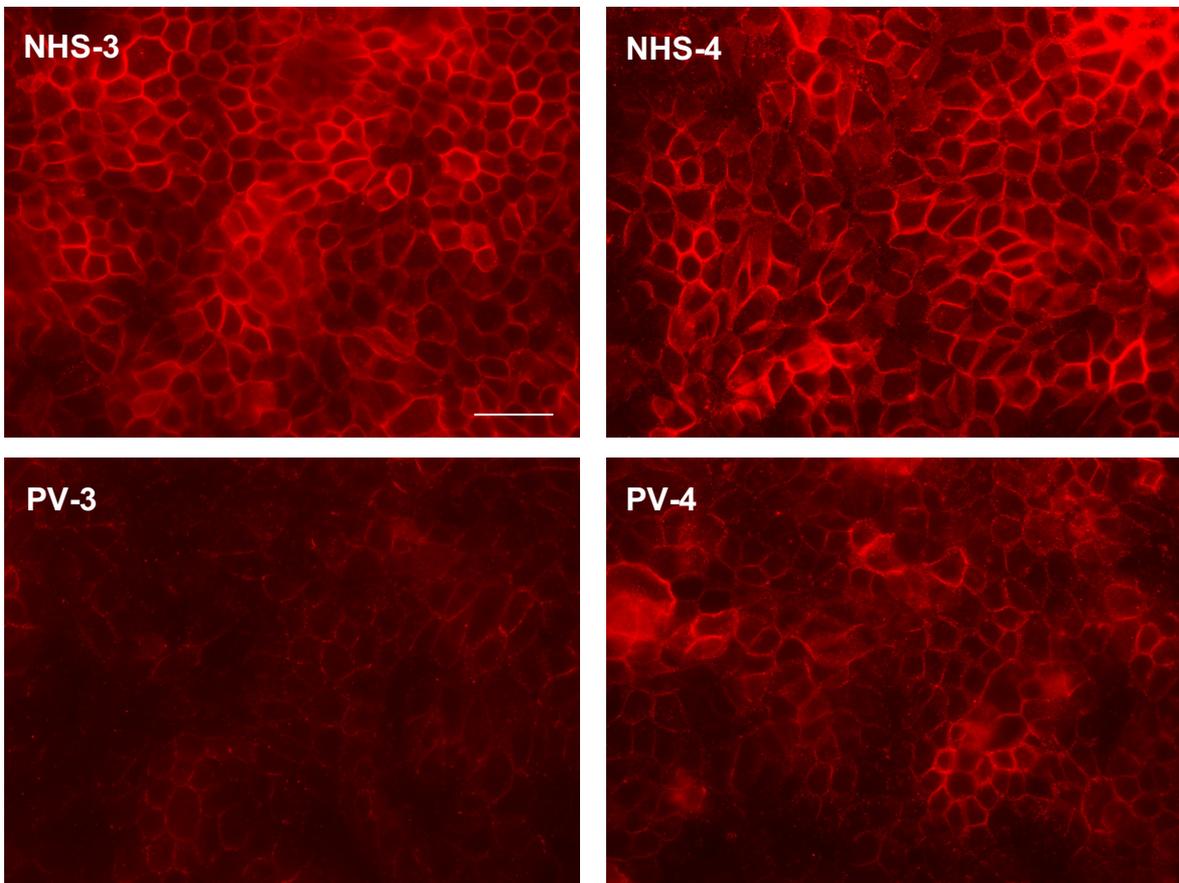


Abbildung 15 Negativkontrollen mit normalem humanem Serum (NHS) und Positivkontrollen mit den Pemphigus vulgaris (PV) Seren der zweiten Phase. Die Negativkontrolle zeigt eine deutlich intensivere Fluoreszenzintensität und eine gleichmäßige Anfärbung der Zellmembranen, was auf eine durchgehende Präsenz von Desmoglein-3 (Dsg-3) an der Zelloberfläche hinweist. Hingegen weisen die Positivkontrollen mit den PV Seren eine deutliche Reduktion der Fluoreszenzintensität auf. (Balken = 5 µm)

Alle 4 PV Seren konnten dabei die Fluoreszenzintensität signifikant (p-Wert $\leq 0,0001$), wie in **Abbildung 16** dargestellt, verringern, so dass diese Methode zur quantitativen Bewertung der Dsg-3 Internalisierung verwendet werden kann.

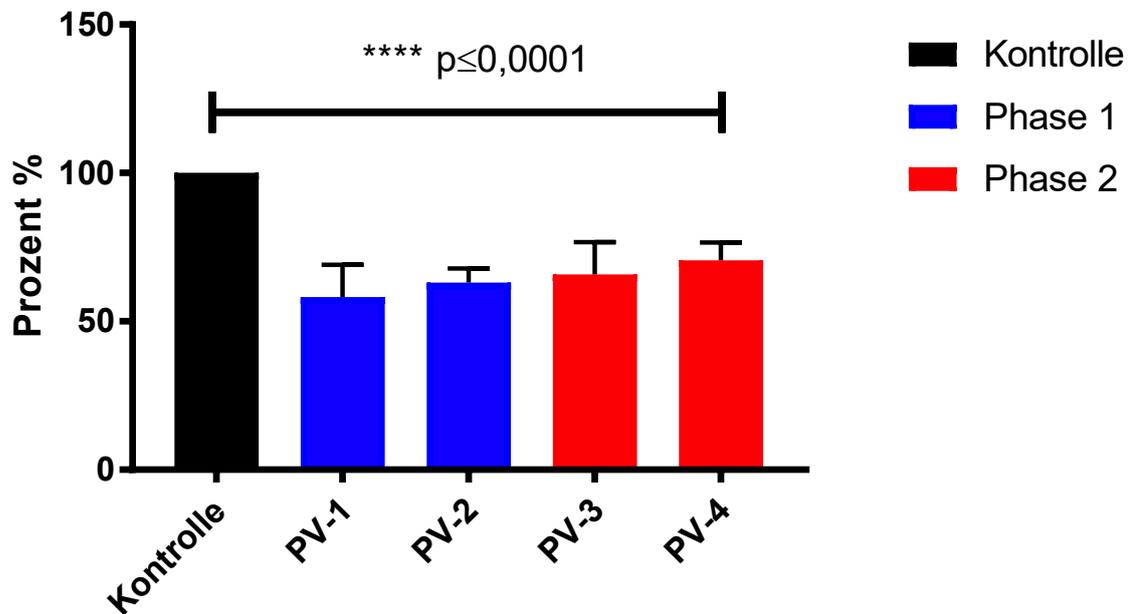


Abbildung 16 Die durchschnittliche Reduktion der Fluoreszenzintensität der Positivkontrollen. Die Keratinozyten wurden dem Pemphigus vulgaris (PV) Serum der verschiedenen Spender ausgesetzt und zeigten die dargestellte Reduktion der Fluoreszenz. Die prozentuale Reduktion ergab sich aus der ermittelten Fluoreszenzintensität der Negativkontrolle als 100% und die daraus errechnete relative Fluoreszenzreduktion (PV-1: 58,23%, PV-2: 63,11%, PV-3: 65,76% und PV-4: 70,58%).

3.2. Anwendung des Nachweisverfahrens der Desmoglein-3 Internalisierung zur Testung der Selleckchem Target Selective Inhibitory Library

Wie bereits in **Abschnitt 3.1.1.** beschrieben, wurden die 141 Substanzen in der ersten Phase in 2 verschiedenen Konzentrationen und mit 2 Spenderseren getestet und die Anzahl auf 19 Substanzen reduziert. Diese Substanzen lagen in einer Konzentration mit einem der beiden Seren über dem gesetzten Schwellenwert (s. **Abbildung 17**).

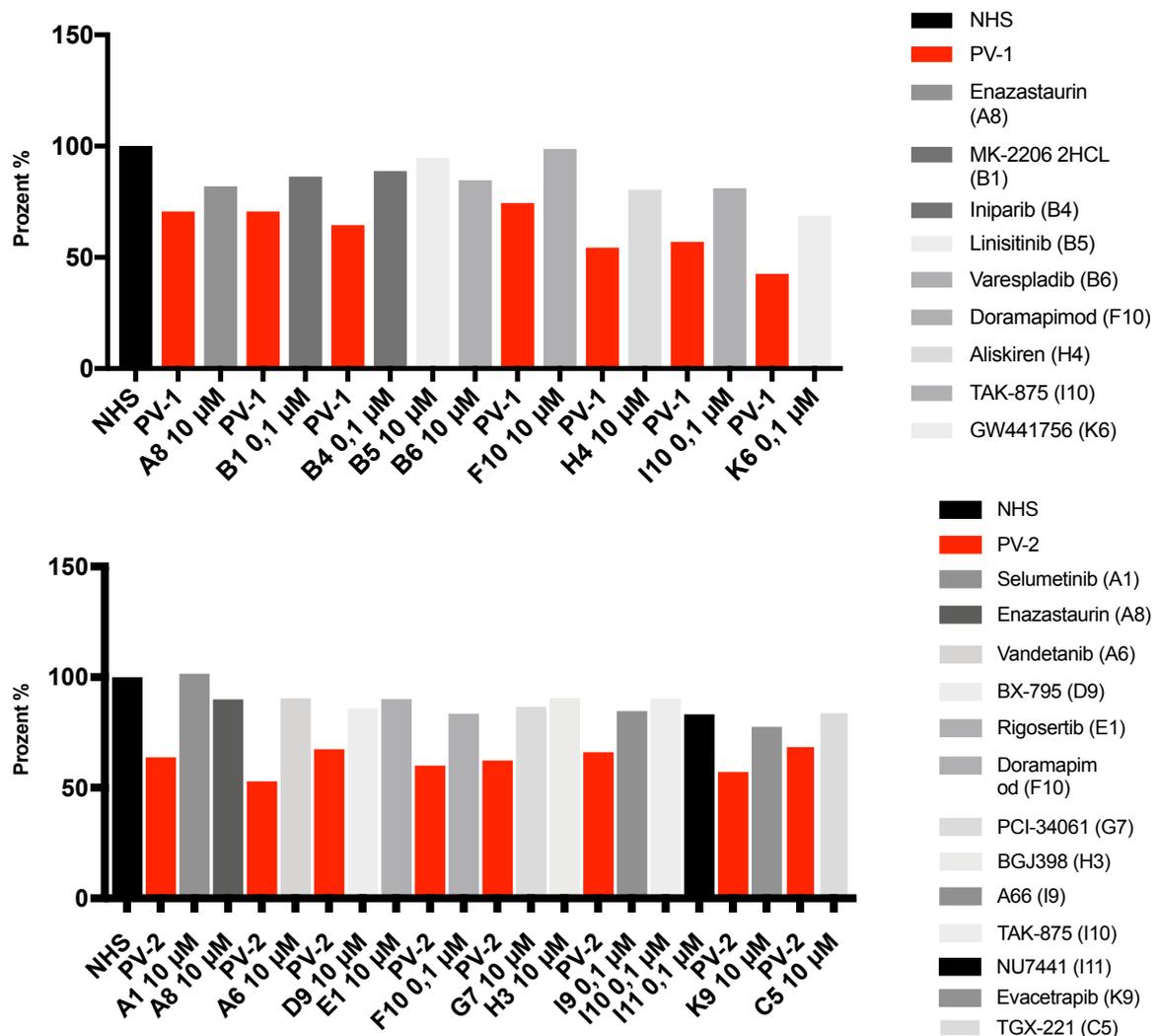


Abbildung 17 Mit dem Pemphigus vulgaris (PV) Serum 1 konnten 9 der 141 Substanzen und mit dem PV Serum 2 konnten 13 der 141 Substanzen in der ersten Phase die Auswahlgrenze übertreffen. Im oberen Graph dargestellt sind die 9 Substanzen, welche in einer Konzentration die Auswahlgrenze von mehr als 50% des Deltas zwischen der Negativkontrolle mit normalem humanem Serum (NHS) und der Positivkontrolle mit PV-1 erreichten. Links neben den Substanzen ist die jeweilige Positivkontrolle des Versuches in Rot hervorgehoben. Im unteren Graph dargestellt sind die 13 Substanzen, welche in einer Konzentration die Auswahlgrenze von mehr als 50% des Deltas zwischen der Negativkontrolle mit normalem humanem Serum (NHS) und der Positivkontrolle mit PV-2 erreichten. Jeweils Links neben den einzelnen Substanzen ist die Positivkontrolle des Versuches in Rot hervorgehoben.

Von diesen 19 Substanzen lagen 3 Substanzen oberhalb des Schwellenwertes mit beiden PV Seren. Um den Trend dieser 19 Substanzen zu bestätigen, wurde mit 2 weiteren PV Seren das Nachweisverfahren der Dsg-3 Internalisierung nun in 3 Konzentrationen, 10 μM , 1 μM und 0,1 μM , wiederholt. Nach der Testung der 19 Substanzen mit 4 verschiedenen PV Seren, waren insgesamt 3 Substanzen in allen 4 Testungen erfolgreich.

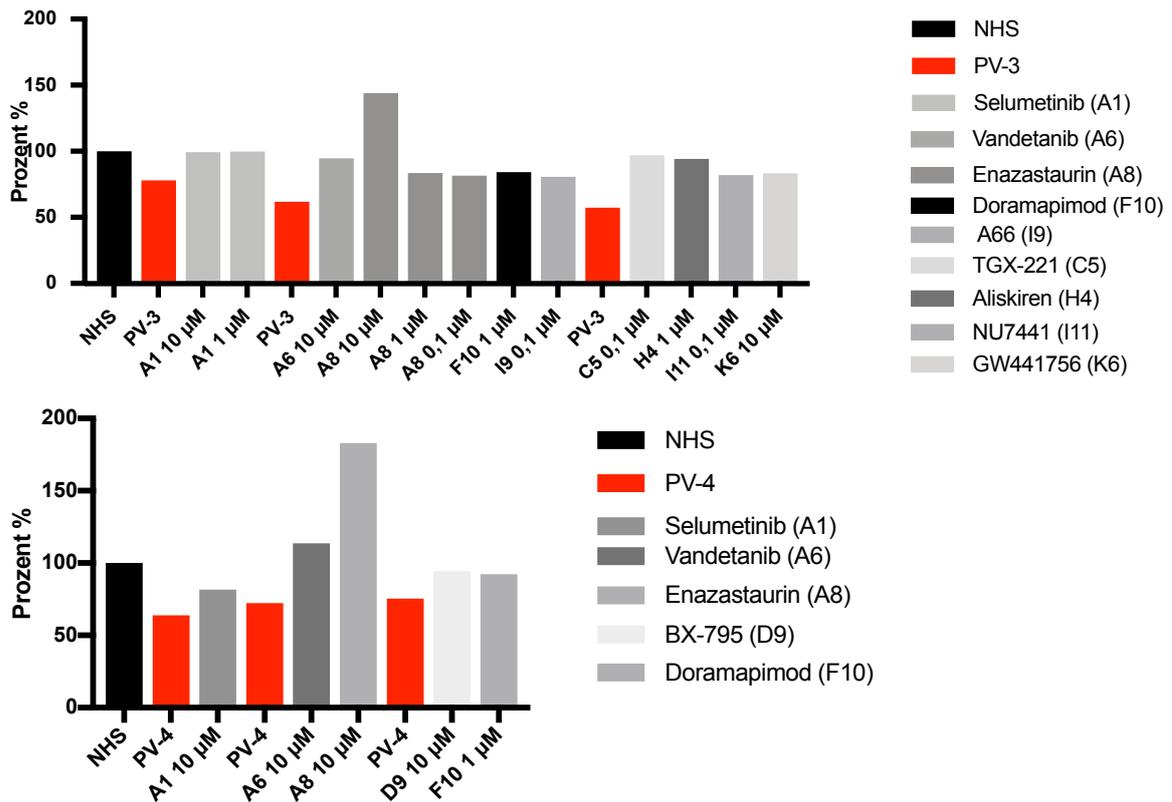
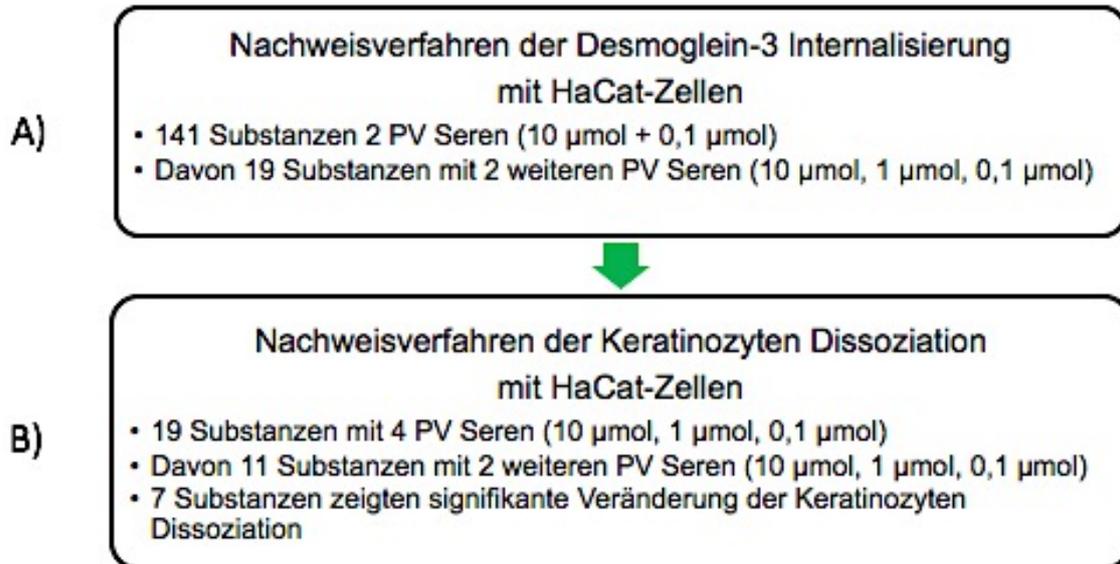


Abbildung 18 In der zweiten Phase konnten 9 der 19 Substanzen mit dem *Pemphigus vulgaris* (PV) Serum 3 die Auswahlgrenze übertreffen und 5 der 19 Substanzen mit PV Serum 4. Im oberen Graph dargestellt sind die 9 Substanzen, welche in einer Konzentration die Auswahlgrenze von mehr als 50% des Deltas zwischen der Negativkontrolle mit normalem humanem Serum (NHS) und der Positivkontrolle mit PV-3 erreichten. Jeweils links neben den einzelnen Substanzen ist die Positivkontrolle des Versuches in Rot hervorgehoben. Im unteren Graph dargestellt sind die 5 Substanzen, welche in einer Konzentration die Auswahlgrenze von mehr als 50% des Deltas zwischen der Negativkontrolle mit normalem humanem Serum (NHS) und der Positivkontrolle mit PV-4 erreichten. Jeweils Links neben den einzelnen Substanzen ist die Positivkontrolle des Versuches in Rot hervorgehoben.

Zudem wurden die 19 Substanzen in den o.g. 3 Konzentrationen mit dem Nachweisverfahren der Keratinozyten Dissoziation validiert. In den folgenden Abschnitten werden die Substanzen mit deren jeweiligen Ergebnissen vorgestellt, welche im Dsg-3 Internalisierungsverfahren und im Nachweisverfahren der Keratinozyten Dissoziation einen positiven Trend und/oder eine Signifikanz zeigen konnten. Eine Übersicht des Prozesses dieser Arbeit ist in **Tabelle 2** dargestellt.

Tabelle 2 Flussdiagramm des Arbeitsprozesses. Der grüne Pfeil symbolisiert die in dieser Arbeit bereits abgeschlossenen Schritte. Im Nachweisverfahren der Desmoglein-3 Internalisierung wurden zunächst mit immortalisierten humanen Keratinozyten (HaCat-Zellen) 141 verschiedenen Substanzen mit 2 Seren von Pemphigus vulgaris (PV) Patientin in 2 verschiedenen Konzentrationen 10 µmol und 0,1 µmol getestet. Davon zeigten 19 Substanzen einen positiven Effekt mit einem der beiden PV Seren oder mit beiden in jeweils einer oder zwei Konzentrationen. Diese wurden wiederum mit 2 weiteren PV Seren in 3 verschiedenen Konzentrationen (10µmol, 1µmol und 0,1 µmol) getestet. Um die Ergebnisse aus der ersten Phase zu validieren, wurden die 19 Substanzen mit dem Nachweisverfahren der Keratinozyten Dissoziation nach Ishii *et al.*³⁶ und zunächst 4 verschiedenen PV Seren in 3 Konzentrationen (10 µmol, 1 µmol und 0,1 µmol) getestet. 8 Substanzen zeigten dabei bereits keinen Effekt. Die anderen 11 Substanzen wurden nochmals mit 2 weiteren PV Seren getestet in 3 Konzentrationen (10 µmol, 1 µmol und 0,1 µmol). Von den 11 Substanzen zeigten 7 im Nachweisverfahren der Keratinozyten Dissoziation eine signifikante Veränderung.



3.3. A66 reduziert signifikant die Keratinozyten Dissoziation

Der Inhibitor der PI3K p110 α Untereinheit konnte in der 0,1 μ M Konzentration mit dem PV Serum PV-2 über die Auswahlgrenze hinweg die Fluoreszenzintensität verstärken. Die Experimente mit den weiteren PV Seren konnten die Auswahlgrenze jedoch kein weiteres Mal übertreffen. In **Abbildung 19** ist eine Zunahme der Fluoreszenzintensität und damit der Expression von Dsg-3 an der Zellmembran zu sehen.

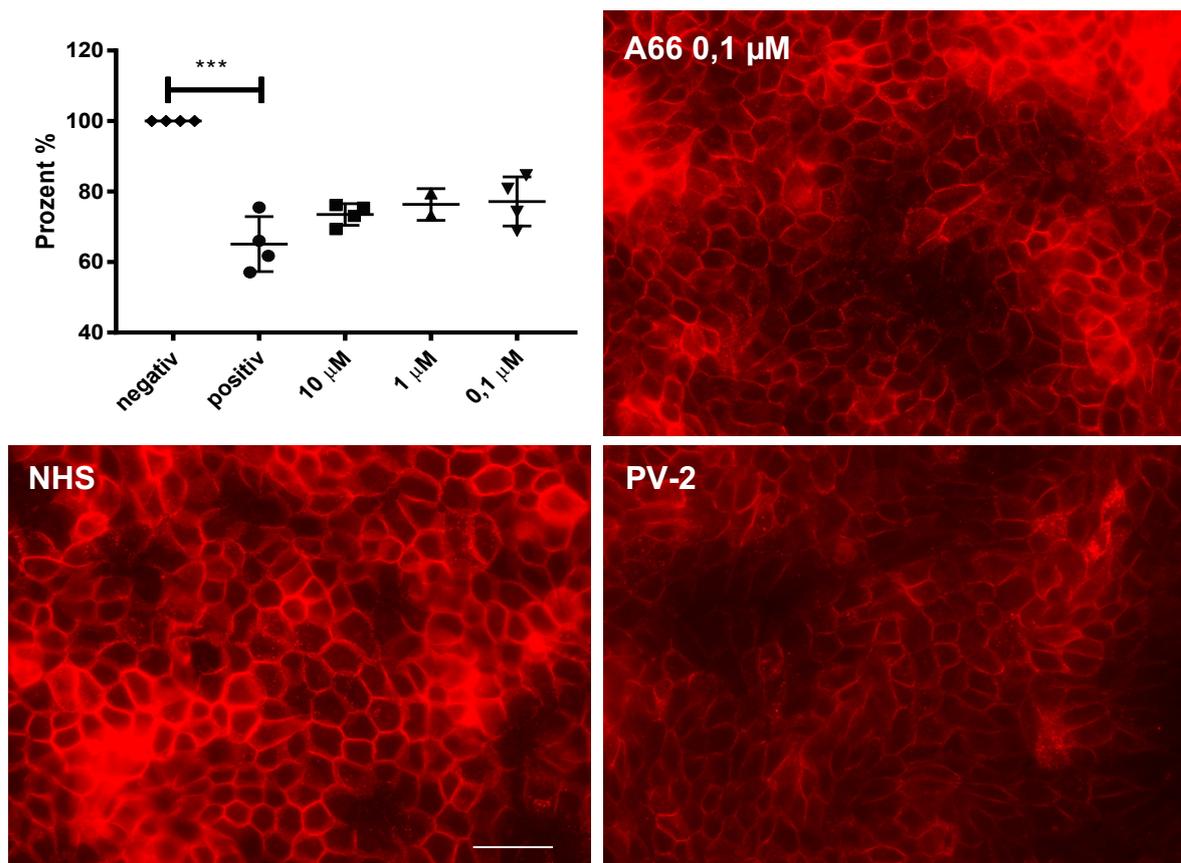


Abbildung 19 A66 verstärkt scheinbar die Fluoreszenzintensität im Nachweisverfahren der Desmoglein-3 Internalisierung. Der Graph zeigt die Fluoreszenzintensität in Prozent (%) für die jeweiligen Versuchsansätze: Negativkontrolle mit normalem humanem Serum (NHS), Positivkontrolle mit dem Pemphigus vulgaris (PV) Serum von 4 verschiedenen Patienten und daneben die Substanz A66 in 3 verschiedenen Konzentrationen, getestet mit 4 verschiedenen PV Seren in den Konzentrationen 10 und 0,1 μ M und 2 PV Seren in der Konzentration von 1 μ M. Die PV Seren konnten die Fluoreszenzintensität signifikant (***) verringern, jedoch konnte die Substanz in keiner Konzentration eine signifikante Steigerung der Fluoreszenzintensität erzielen. Die beispielhaften Immunfluoreszenzbilder zeigen jedoch eine Zunahme der Fluoreszenzintensität gegenüber der Positivkontrolle mit PV-2 bei Hinzugabe des Inhibitors A66 in einer Konzentration von 0,1 μ M. (Balken = 5 μ m, mean \pm SD, Shapiro-Wilk-Test, ungepaarter t-Test, Tukey's multipler Vergleichstest)

Im Keratinozyten Dissoziationsnachweisverfahren zeigte die Substanz A66 eine signifikante Reduktion der Keratinozyten Fragmentierung in der Konzentration von 10 μM (p-Wert 0,002), wie in **Abbildung 20** zu sehen.

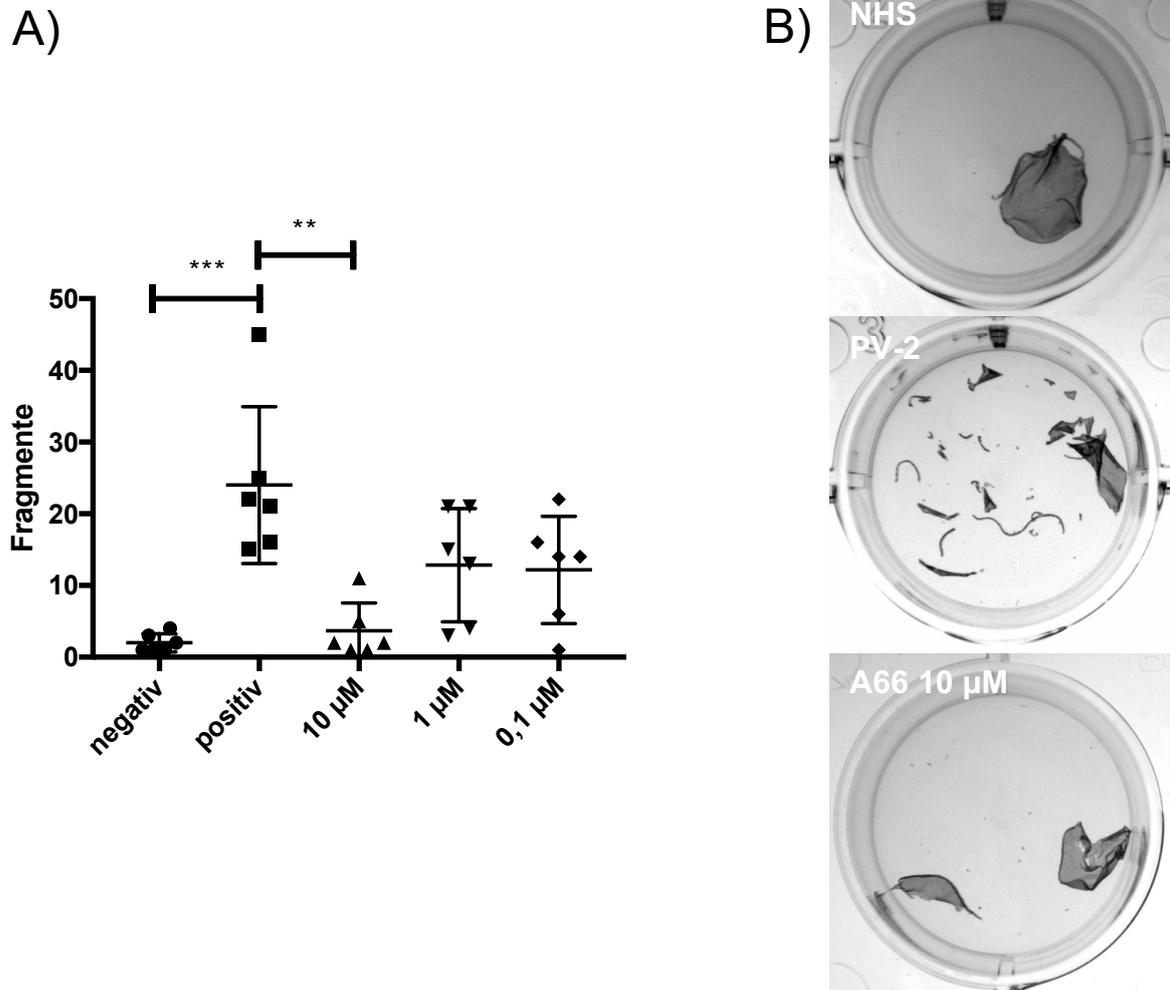


Abbildung 20 A66 verringert signifikant die Keratinozyten Dissoziation. A) Dargestellt ist die Anzahl der Fragmente in den jeweiligen Versuchsansätzen: Negativkontrolle mit normalem humanem Serum (NHS), Positivkontrolle mit dem Pemphigus vulgaris (PV) Serum von 6 verschiedenen Patienten und daneben die Substanz A66 in 3 verschiedenen Konzentrationen, getestet mit 6 verschiedenen PV Seren. Die PV Seren konnten die Fragmentierung der Keratinozyten Monoschicht signifikant ($***p=0,006$) provozieren, während A66 in der Konzentration von 10 μM die Fragmentierung der Zellschicht wiederum signifikant ($**p=0,002$) verringern konnte. **B)** Dargestellt ist exemplarisch die Fragmentierung der Keratinozyten Monoschicht mit Hinzugabe von NHS, eines PV Serum oder PV Serum und dem Inhibitor A66 in den Konzentrationen von 10 μM . Die Fragmentierung ist bei Hinzugabe von A66 deutlich verringert und es zeigen sich nur 2 Fragmente der Zellschicht aus Keratinozyten. (mean \pm SD, Shapiro-Wilk-Test, ungepaarter t-Test, Kruskal-Wallis Test bzw. im Dunn's multipler Vergleichstest)

3.4. BGJ398 reduziert signifikant die Keratinozyten Dissoziation

Der Inhibitor des Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptor (FGFR) BGJ398 konnte im Nachweisverfahren der Dsg-3 Internalisierung in der Konzentration von 10 μM die Fluoreszenzintensität verstärken und somit die Dsg-3 Internalisierung verringern. Der FGFR Inhibitor verstärkte in der Konzentration von 10 μM mit allen PV Seren die Fluoreszenzintensität und mit PV-2 über die getroffene Auswahlgrenze. Wie in **Abbildung 21** im Immunfluoreszenzbild zu sehen, kommt es durch 10 μM BGJ389 zu einer verringerten Dsg-3 Internalisierung verglichen mit der Positivkontrolle mit PV Serum 2.

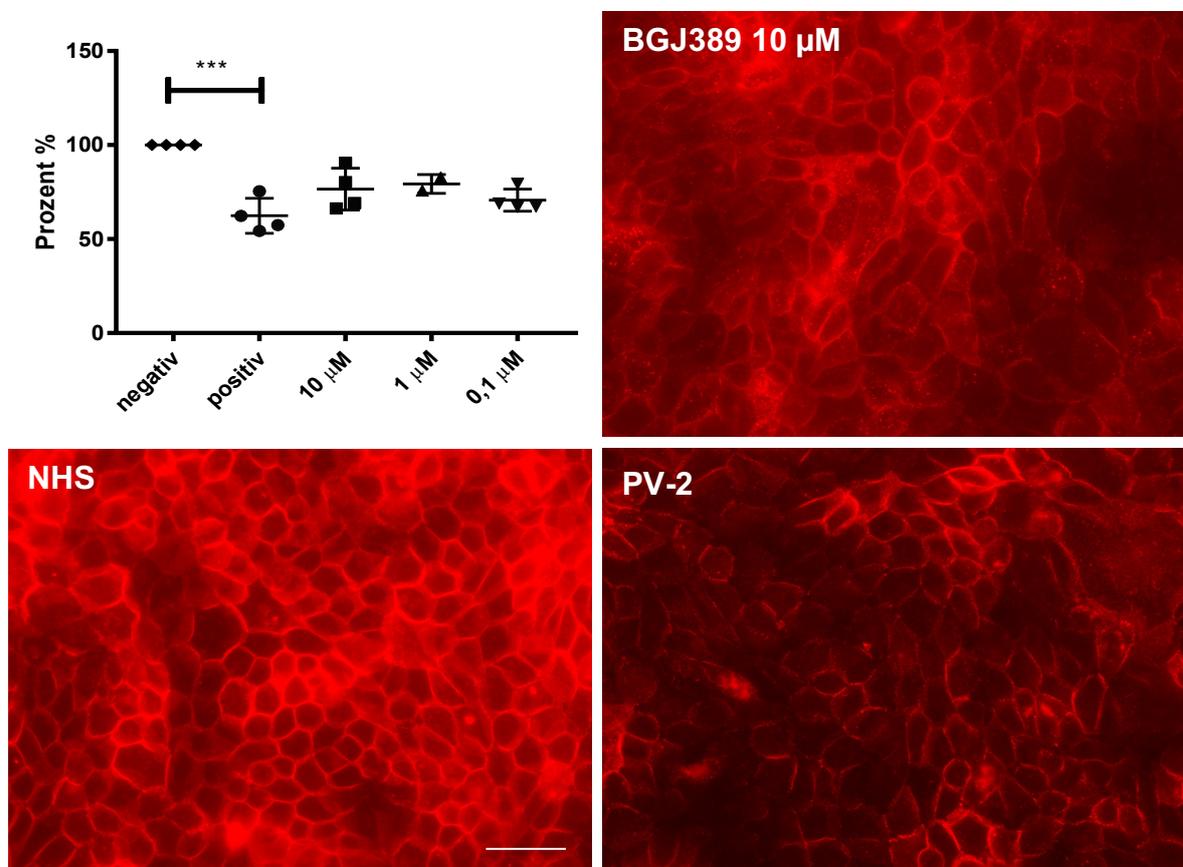


Abbildung 21 BGJ389 scheint die Fluoreszenzintensität im Nachweisverfahren der Desmoglein-3 Internalisierung zu verstärken. Der Graph zeigt die Fluoreszenzintensität in Prozent (%) für die jeweiligen Versuchsansätze: Negativkontrolle mit normalem humanem Serum (NHS), Positivkontrolle mit dem Pemphigus vulgaris (PV) Serum von 4 verschiedenen Patienten und daneben die Substanz BGJ389 in 3 verschiedenen Konzentrationen, getestet mit 4 verschiedenen PV Seren in den Konzentrationen 10 und 0,1 μM und 2 PV Seren in der Konzentration von 1 μM . Die PV Seren konnten die Fluoreszenzintensität signifikant (***) verringern, jedoch konnte die Substanz in keiner Konzentration eine signifikante Steigerung der Fluoreszenzintensität erzielen. Die beispielhaften Immunfluoreszenzbilder zeigen jedoch eine Zunahme der Fluoreszenzintensität gegenüber der Positivkontrolle mit PV-2 bei Hinzugabe des Inhibitors BGJ389 in einer Konzentration von 10 μM . (Balken = 5 μm , mean \pm SD, Shapiro-Wilk-Test, ungepaarter t-Test, Tukey's multipler Vergleichstest)

Im Nachweisverfahren der Keratinozyten Dissoziation konnte die Fragmentierung der Keratinozytenschicht in der Konzentration von 1 μM signifikant verringert werden (p -Werte 0,0097). Die Substanz wurde dabei mit einem n von 6 getestet. In der Konzentration von 10 μM und 0,1 μM zeigten sich hohe Standardabweichungen von 14,33 und 13 (s. **Abbildung 22**).

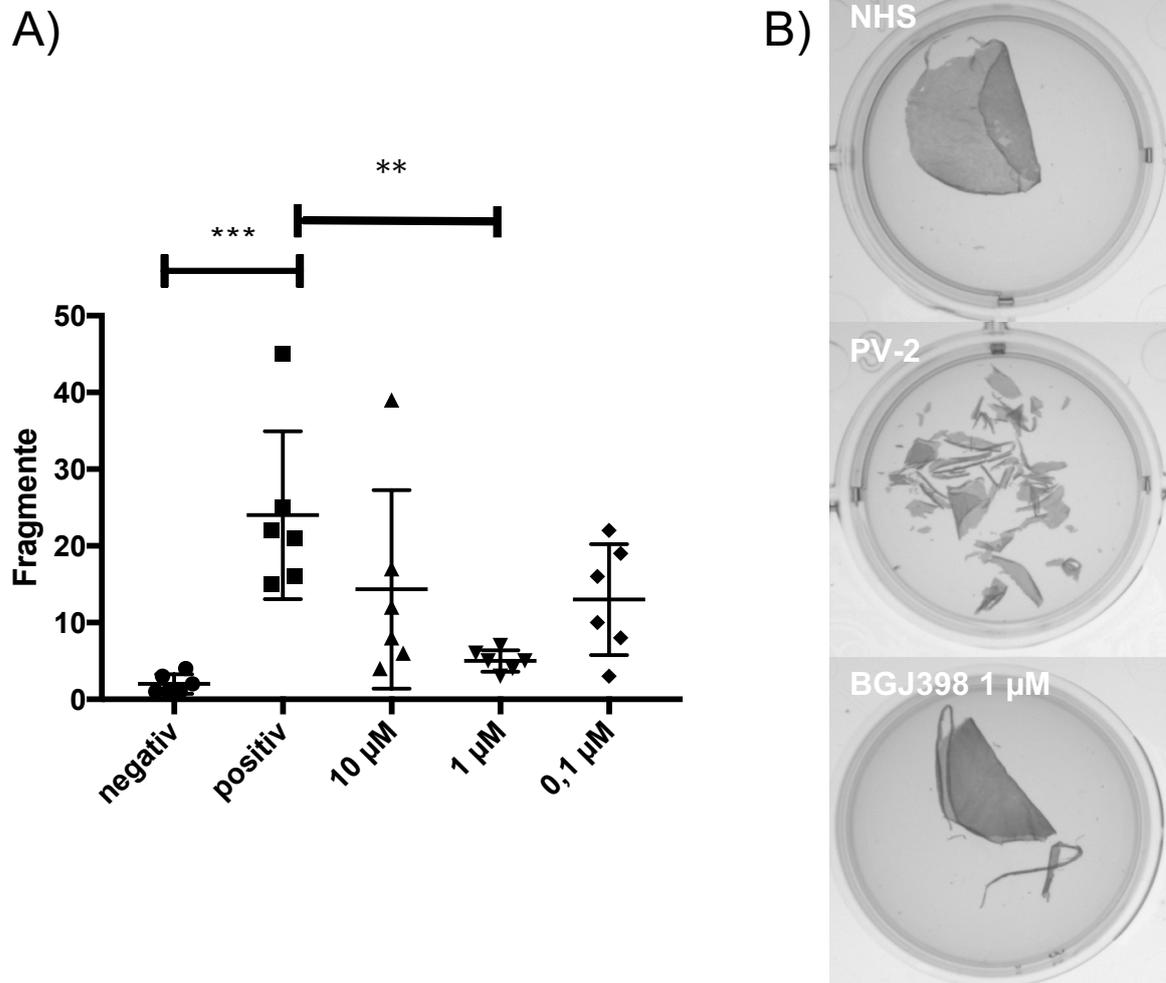


Abbildung 22 BGJ398 verringert signifikant die Keratinozyten Dissoziation. A) Dargestellt ist die Anzahl der Fragmente in den jeweiligen Versuchsansätzen: Negativkontrolle mit normalem humanem Serum (NHS), Positivkontrolle mit dem Pemphigus vulgaris (PV) Serum von 6 verschiedenen Patienten und daneben die Substanz BGJ398 in 3 verschiedenen Konzentrationen, getestet mit 6 verschiedenen PV Seren. Die PV Seren konnten die Fragmentierung der Keratinozyten Monoschicht signifikant (** $p=0,006$) induzieren, während BGJ398 in der Konzentration von 1 μM die Fragmentierung der Zellschicht wiederum signifikant (** $p=0,0097$) verringern konnte. **B)** Dargestellt ist exemplarisch die Fragmentierung der Keratinozyten Monoschicht mit Hinzugabe von entweder NHS, eines PV Serum oder PV Serum und dem Inhibitor BGJ398 in den Konzentrationen von 1 μM . Die Fragmentierung ist bei Hinzugabe von BGJ398 deutlich verringert und es zeigt sich eine beinahe intakte Zellschicht aus Keratinozyten. (mean \pm SD, Shapiro-Wilk-Test, ungepaarter t-Test, Tukey's multipler Vergleichstest,)

3.5. GW441756 reduziert signifikant die Keratinozyten Dissoziation

Der Tropomyosinkinase A (TrkA) Inhibitor GW441756 konnte im *Screening* des Dsg-3 Internalisierungsnachweises mit beiden PV Seren die Grenze nur knapp nicht übertreffen. Aufgrund des positiven Trends wie in **Abbildung 23** zu sehen, wurde die Substanz jedoch weiter untersucht und zeigte im Test mit dem PV Serum 3 eine Verstärkung der Fluoreszenzintensität in den Konzentrationen 10 μM und 0,1 μM .

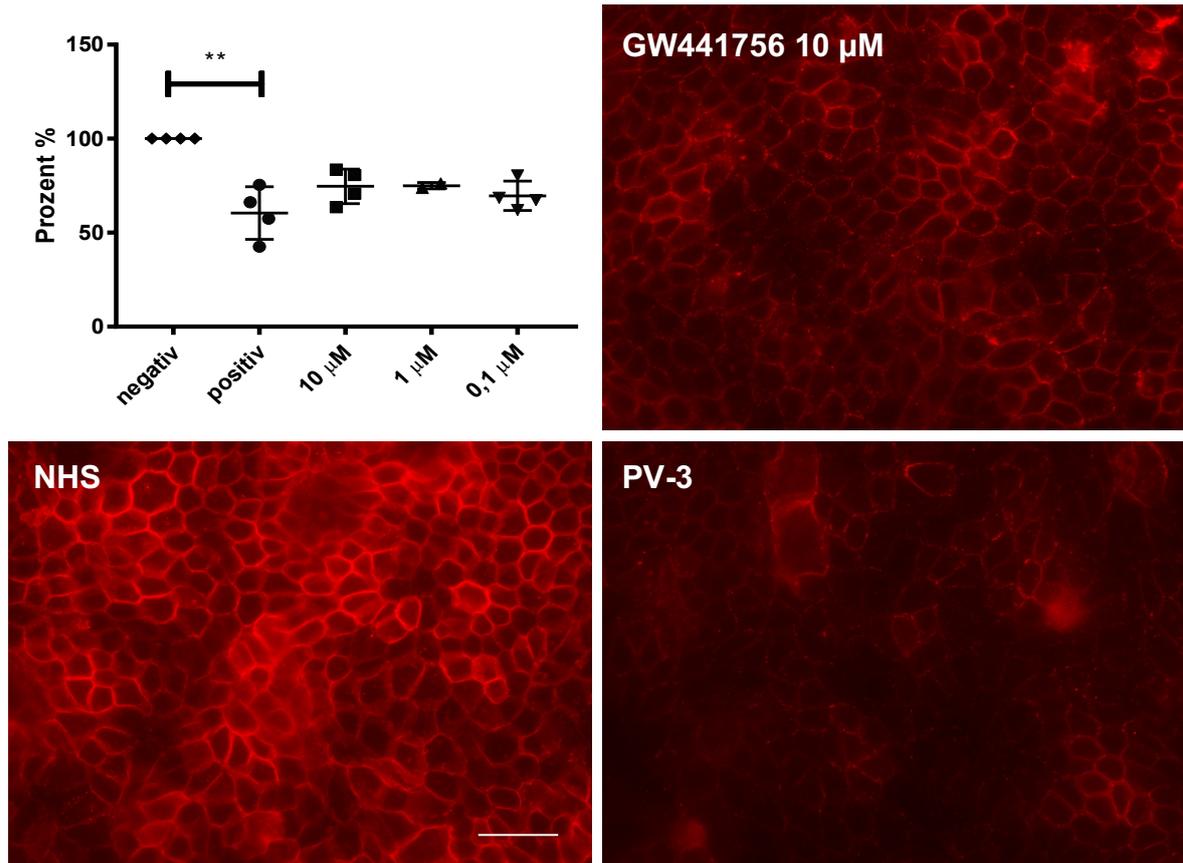


Abbildung 23 GW441756 scheint die Fluoreszenzintensität im Nachweisverfahren der Desmoglein-3 Internalisierung zu verstärken. Der Graph zeigt die Fluoreszenzintensität in Prozent (%) für die jeweiligen Versuchsansätze: Negativkontrolle mit normalem humanem Serum (NHS), Positivkontrolle mit dem Pemphigus vulgaris (PV) Serum von 4 verschiedenen Patienten und daneben die Substanz GW441756 in 3 verschiedenen Konzentrationen, getestet mit 4 verschiedenen PV Seren in den Konzentrationen 10 und 0,1 μM und 2 PV Seren in der Konzentration von 1 μM . Die PV Seren konnten die Fluoreszenzintensität signifikant (** $p=0,0013$) verringern, jedoch konnte die Substanz in keiner Konzentration eine signifikante Steigerung der Fluoreszenzintensität erzielen. Die beispielhaften Immunfluoreszenzbilder zeigen jedoch eine Zunahme der Fluoreszenzintensität gegenüber der Positivkontrolle mit PV-3 bei Hinzugabe des Inhibitors GW441756 in einer Konzentration von 10 μM . (Balken = 5 μm , mean \pm SD, Shapiro-Wilk-Test, ungepaarter t-Test, Tukey's multipler Vergleichstest)

Im Keratinozyten Dissoziationsnachweis wurde die Substanz GW441756 mit einem n von 6 getestet und zeigte dabei in der Konzentration von 10 μM eine signifikante Verringerung der Fragmentierung (p-Wert 0,0301), wie in **Abbildung 24** zu sehen ist.

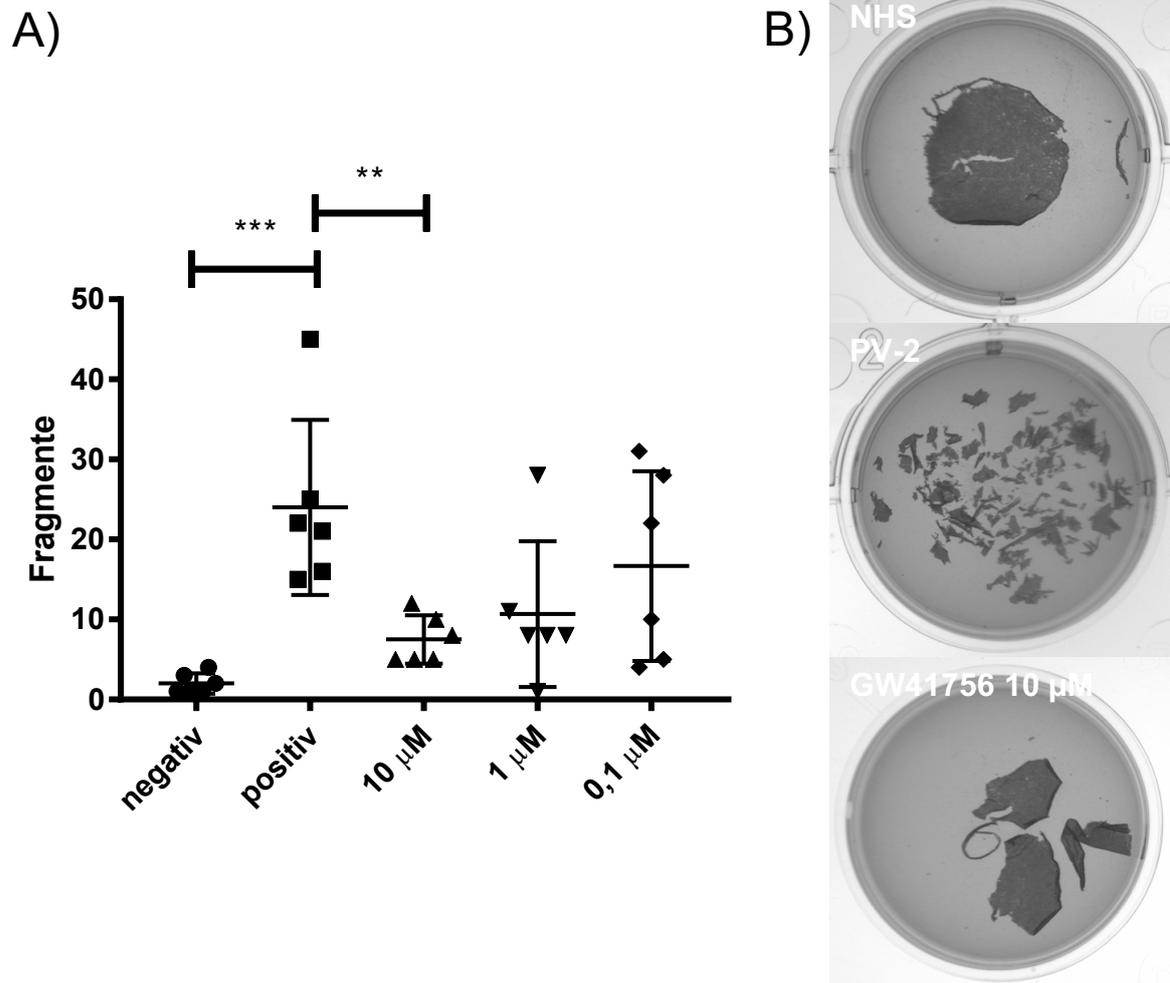


Abbildung 24 GW441756 verringert signifikant die Keratinozyten Dissoziation. **A)** Dargestellt ist die Anzahl der Fragmente in den jeweiligen Versuchsansätzen: Negativkontrolle mit normalem humanem Serum (NHS), Positivkontrolle mit dem Pemphigus vulgaris (PV) Serum von 6 verschiedenen Patienten und daneben die Substanz GW441756 in 3 verschiedenen Konzentrationen, getestet mit 6 verschiedenen PV Seren. Die PV Seren konnten die Fragmentierung der Keratinozyten Monoschicht signifikant (***) induzieren, während GW441756 in der Konzentration von 10 μM die Fragmentierung der Zellschicht wiederum signifikant (**p=0,0301) verringern konnte. **B)** Dargestellt ist exemplarisch die Fragmentierung der Keratinozyten Monoschicht mit Hinzugabe von entweder NHS, eines PV Serum oder PV Serum und dem Inhibitor GW441756 in den Konzentrationen von 10 μM . Die Fragmentierung ist bei Hinzugabe von GW441756 deutlich verringert. (mean \pm SD, Shapiro-Wilk-Test, ungepaarter t-Test, Kruskal-Wallis Test bzw. im Dunn's multipler Vergleichstest)

3.6. Selumetinib reduziert signifikant die Keratinozyten Dissoziation

Der Mitogen-aktivierte Protein Kinase/ERK Kinase (MEK) Inhibitor Selumetinib wurde im Nachweisverfahren der Dsg-3 Internalisierung zunächst in 2 Konzentrationen, 10 μM und 0,1 μM , und mit 2 Spenderseren, PV-1 und PV-2, getestet. Hierbei zeigte Selumetinib in der Konzentration von 10 μM bei einem PV Serum eine Verstärkung der Fluoreszenzintensität auf 101,59% (s. **Abbildung 25**). Daraufhin wurde die Substanz mit 2 weiteren PV Seren, PV-3 und PV-4 getestet, wobei ebenfalls in der 10 μM Konzentration eine Verstärkung der Fluoreszenzintensität auf fast 100% erreicht werden konnte.

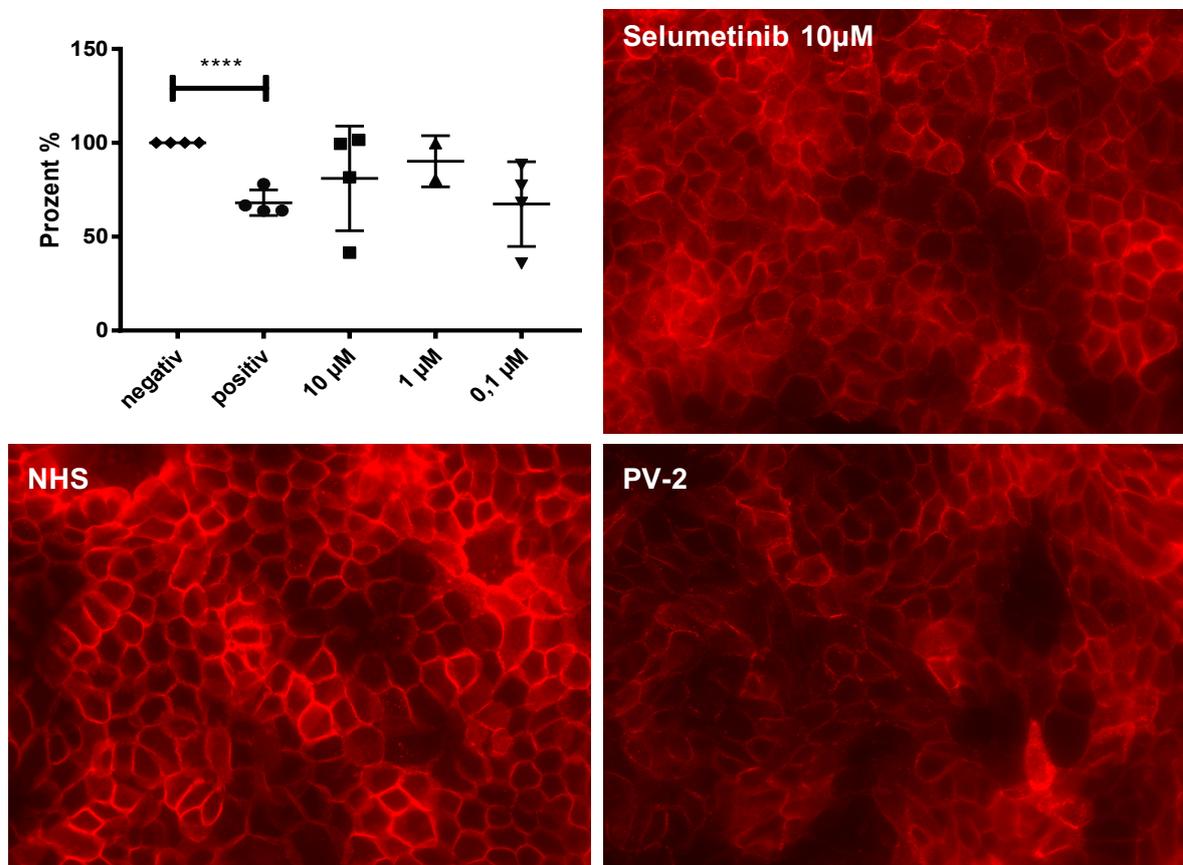


Abbildung 25 Selumetinib scheint die Fluoreszenzintensität im Nachweisverfahren der Desmoglein-3 Internalisierung zu verstärken. Der Graph zeigt die Fluoreszenzintensität in Prozent (%) für die jeweiligen Versuchsansätze: Negativkontrolle mit normalem humanem Serum (NHS), Positivkontrolle mit dem Pemphigus vulgaris (PV) Serum von 4 verschiedenen Patienten und daneben die Substanz Selumetinib in 3 verschiedenen Konzentrationen, getestet mit 4 verschiedenen PV Seren in den Konzentrationen 10 und 0,1 μM und 2 PV Seren in der Konzentration von 1 μM . Die PV Seren konnten die Fluoreszenzintensität gegenüber der Negativkontrolle signifikant ($****p \leq 0,0001$) verringern, jedoch konnte die Substanz in keiner Konzentration eine signifikante Steigerung der Fluoreszenzintensität erzielen. Die beispielhaften Immunfluoreszenzbilder zeigen jedoch eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität gegenüber der Positivkontrolle mit PV-2 bei Hinzugabe des Inhibitors Selumetinib in einer Konzentration von 10 μM . (Balken = 5 μm , mean \pm SD, Shapiro-Wilk-Test, ungepaarter t-Test, Tukey's multipler Vergleichstest)

Zur Validierung der Ergebnisse aus dem Nachweisverfahren der Dsg-3 Internalisierung, wurde Selumetinib mit dem Nachweisverfahren der Keratinozyten Dissoziation mit einer Anzahl von 6 PV Seren getestet. Es konnte mit der Konzentration von 10 μM die Fragmentierung der Keratinozytenschicht signifikant mit einem p-Wert von 0,0194 verringert werden (s. **Abbildung 26**).

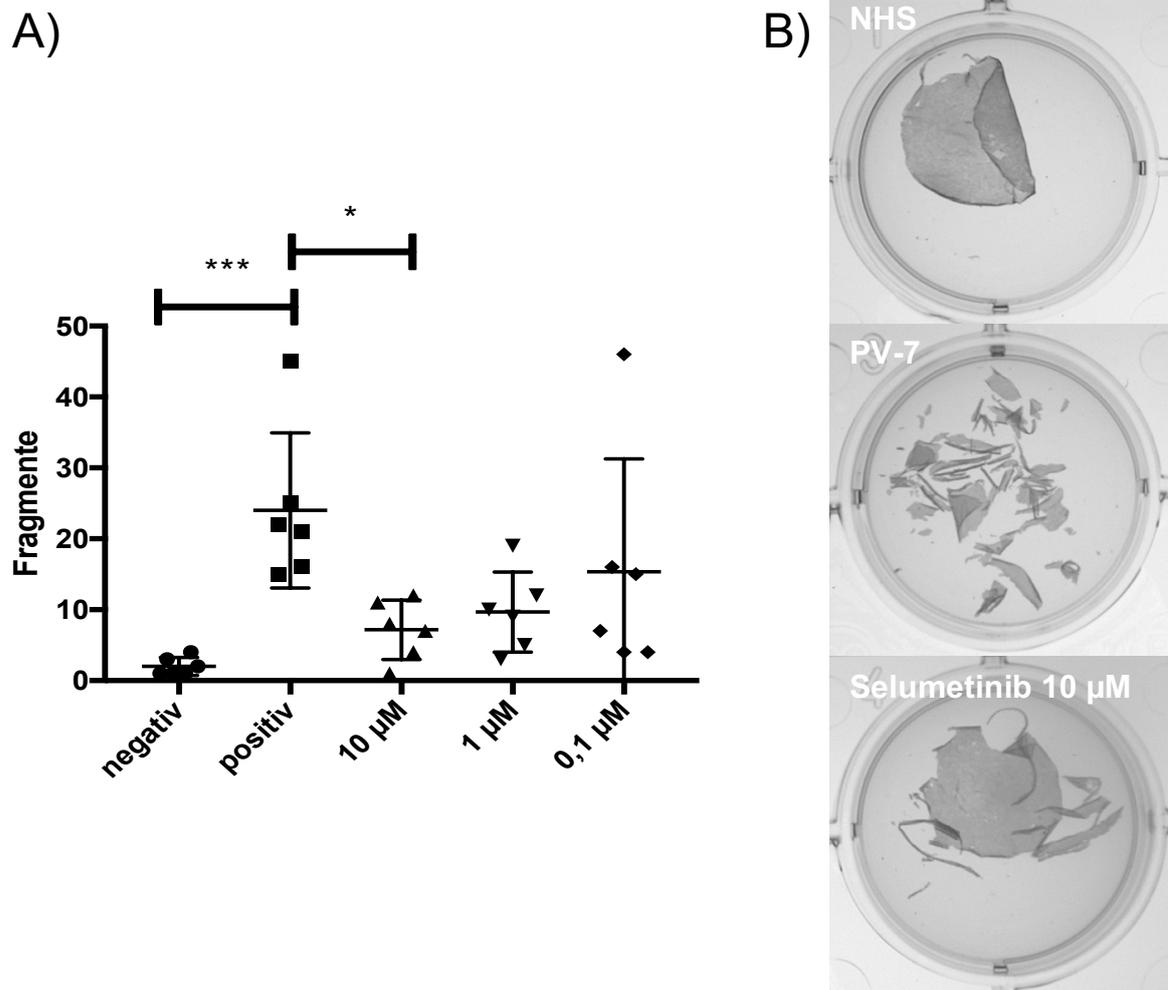


Abbildung 26 Selumetinib verringert signifikant die Keratinozyten Dissoziation. **A)** Dargestellt ist die Anzahl der Fragmente in den jeweiligen Versuchsansätzen: Negativkontrolle mit normalem humanem Serum (NHS), Positivkontrolle mit dem Pemphigus vulgaris (PV) Serum von 6 verschiedenen Patienten und daneben die Substanz Selumetinib in 3 verschiedenen Konzentrationen, getestet mit 6 verschiedenen PV Seren. Die PV Seren konnten die Fragmentierung der Keratinozyten Monoschicht signifikant (** $p=0,006$) provozieren, während Selumetinib in der Konzentration von 10 μM die Fragmentierung der Zellschicht wiederum signifikant (* $p=0,0194$) hemmen konnte. **B)** Dargestellt ist exemplarisch die Fragmentierung der Keratinozyten Monoschicht mit Hinzugabe von entweder NHS, eines PV Serum oder PV Serum mit dem Inhibitor Selumetinib in einer Konzentration von 10 μM . Die Fragmentierung ist bei Hinzugabe von Selumetinib deutlich verringert und es zeigt sich eine beinahe intakte Zellschicht aus Keratinozyten. (mean \pm SD, Shapiro-Wilk-Test, ungepaarter t-Test, Kruskal-Wallis Test bzw. im Dunn's multipler Vergleichstest)

3.7. TGX-221 reduziert signifikant die Keratinozyten Dissoziation

Der Inhibitor der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) p110 β Untereinheit konnte im Nachweisverfahren der Dsg-3 Internalisierung in der Konzentration von 10 μ M die Fluoreszenzintensität mit dem PV Serum PV-2 um 50% des Deltas aus Negativ- und Positivkontrolle erhöhen (s. **Abbildung 27**). In den nachfolgenden Experimenten zur Dsg-3 Internalisierung zeigte die Substanz jedoch keine weitere Auswirkung auf die Fluoreszenzintensität.

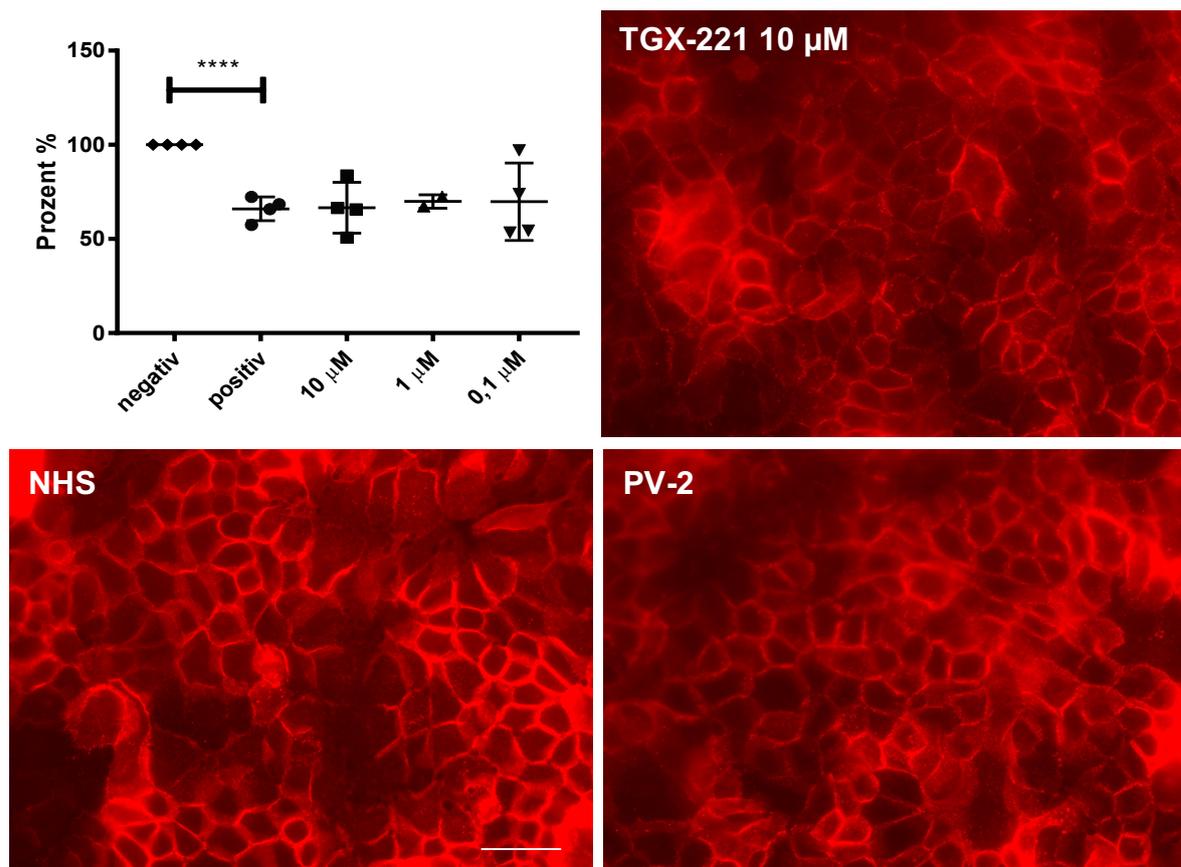


Abbildung 27 TGX-221 scheint die Fluoreszenzintensität im Nachweisverfahren der Desmoglein-3 Internalisierung mit einem Pemphigus vulgaris Serum zu verstärken. Der Graph zeigt die Fluoreszenzintensität in Prozent (%) für die jeweiligen Versuchsansätze: Negativkontrolle mit normalem humanem Serum (NHS), Positivkontrolle mit dem Pemphigus vulgaris (PV) Serum von 4 verschiedenen Patienten und daneben die Substanz TGX-221 in 3 verschiedenen Konzentrationen, getestet mit 4 verschiedenen PV Seren in den Konzentrationen 10 und 0,1 μ M und 2 PV Seren in der Konzentration von 1 μ M. Die PV Seren konnten die Fluoreszenzintensität signifikant ($****p \leq 0,0001$) verringern, jedoch konnte die Substanz in keiner Konzentration eine signifikante Steigerung der Fluoreszenzintensität erzielen. Die beispielhaften Immunfluoreszenzbilder zeigen eine leichte Zunahme der Fluoreszenzintensität gegenüber der Positivkontrolle mit PV-2 bei Hinzugabe des Inhibitors TGX-221 in einer Konzentration von 10 μ M. (Balken = 5 μ m, mean \pm SD, Shapiro-Wilk-Test, ungepaarter t-Test, Tukey's multipler Vergleichstest)

Im Nachweisverfahren der Keratinozyten Dissoziation wurde die Substanz TGX-221 mit einer Anzahl von 6 PV Seren getestet. Die Substanz konnte in der Konzentration von 10 μM die Fragmentierung der Keratinozytenschicht gegenüber der Positivkontrolle signifikant mit einem p-Wert von 0,0203 und in der Konzentration von 1 μM gegenüber der Positivkontrolle signifikant mit einem p-Wert von 0,0371 verringern, wie in **Abbildung 28** zu sehen ist.

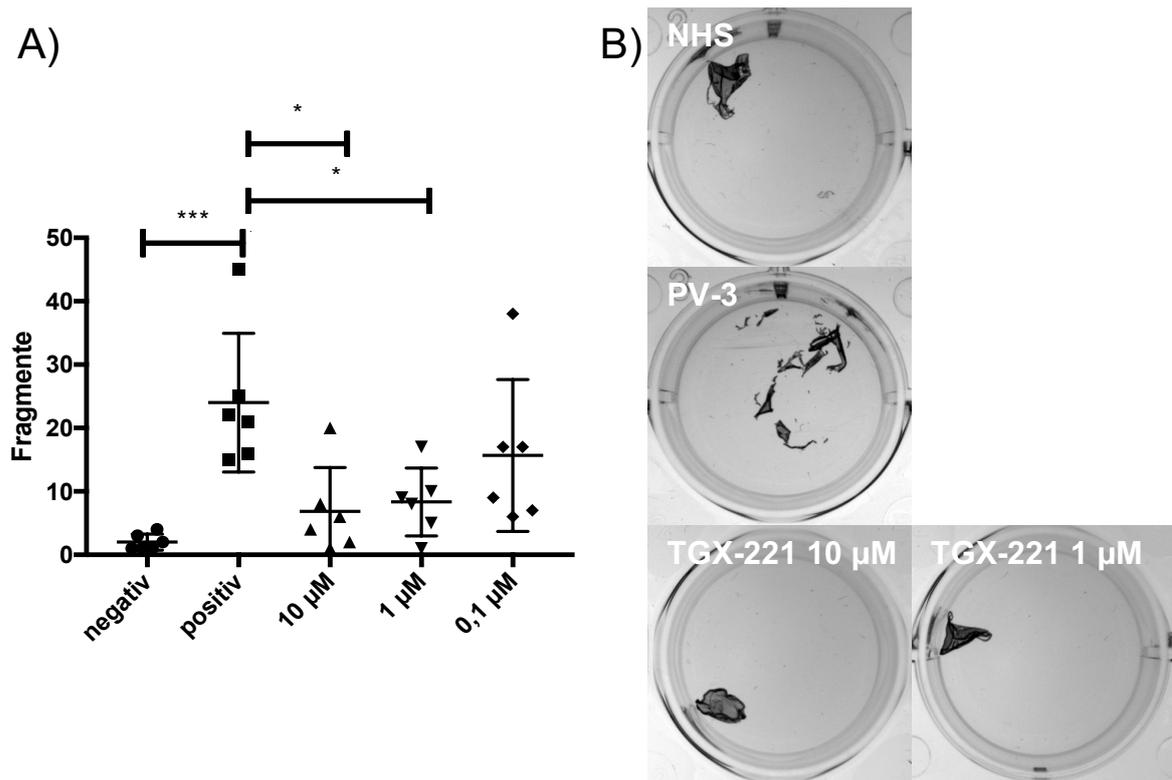


Abbildung 28 TGX-221 verringert signifikant die Keratinozyten Dissoziation. **A)** Dargestellt ist die Anzahl der Fragmente in den jeweiligen Versuchsansätzen Negativkontrolle mit normalem humanem Serum (NHS), Positivkontrolle mit dem Pemphigus vulgaris (PV) Serum von 6 verschiedenen Patienten und daneben die Substanz TGX-221 in 3 verschiedenen Konzentrationen, getestet mit 6 verschiedenen PV Seren. Die PV Seren konnten die Fragmentierung der Keratinozyten Monoschicht signifikant (** $p=0,006$) provozieren, während TGX-221 in der Konzentration von 10 μM (* $p=0,0203$) und 1 μM (* $p=0,0371$) die Fragmentierung der Zellschicht wiederum signifikant verringern konnte. **B)** Dargestellt ist exemplarisch die Fragmentierung der Keratinozyten Monoschicht mit Hinzugabe von entweder NHS, eines PV Serum oder PV Serum und dem Inhibitor TGX-221 in den Konzentrationen von 10 μM und 1 μM . Die Fragmentierung ist bei Hinzugabe von TGX-221 deutlich verringert und es zeigt sich eine intakte Zellschicht aus Keratinozyten. (mean \pm SD, Shapiro-Wilk-Test, ungepaarter t-Test, Tukey's multipler Vergleichstest)

3.8. Vandetanib reduziert signifikant die Keratinozyten Dissoziation

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor Rezeptor 2 (VEGFR2) Inhibitor Vandetanib lag im Nachweisverfahren der Dsg-3 Internalisierung in der Konzentration von 10 μM bei dem PV Serum PV-2 oberhalb des gesetzten Schwellenwertes und zeigte hier eine verstärkte Fluoreszenzintensität von 90,48%. Diese verringerte Dsg-3 Internalisierung konnte mit 2 weiteren PV Seren, PV-3 und PV-4, in der Konzentration von 10 μM reproduziert werden (s. **Abbildung 29**).

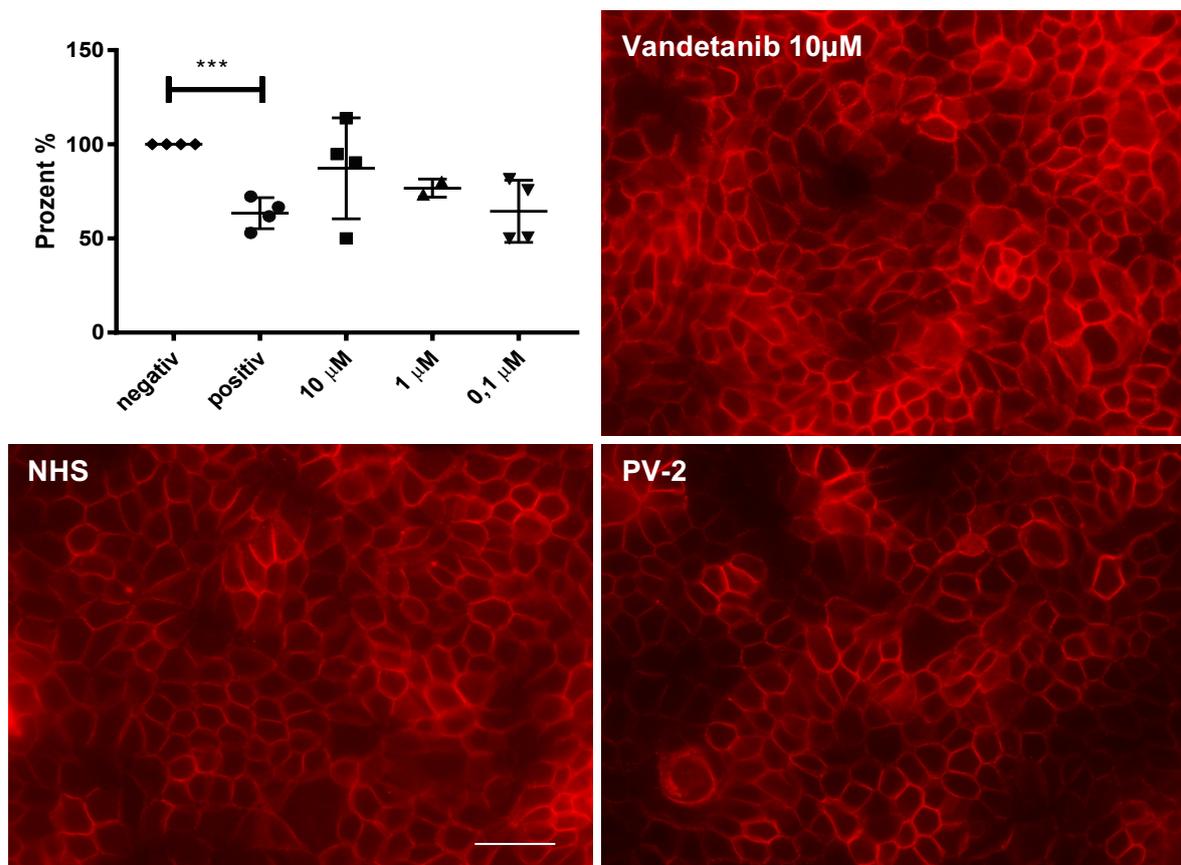


Abbildung 29 Vandetanib scheint die Fluoreszenzintensität im Nachweisverfahren der Desmoglein-3 Internalisierung zu verstärken. Der Graph zeigt die Fluoreszenzintensität in Prozent (%) für die jeweiligen Versuchsansätze: Negativkontrolle mit normalem humanem Serum (NHS), Positivkontrolle mit dem Pemphigus vulgaris (PV) Serum von 4 verschiedenen Patienten und daneben die Substanz Vandetanib in 3 verschiedenen Konzentrationen, getestet mit 4 verschiedenen PV Seren in den Konzentrationen 10 und 0,1 μM und 2 PV Seren in der Konzentration von 1 μM . Die PV Seren konnten die Fluoreszenzintensität signifikant ($***p=0,0001$) verringern, jedoch konnte die Substanz in keiner Konzentration eine signifikante Steigerung der Fluoreszenzintensität erzielen. Die beispielhaften Immunfluoreszenzbilder zeigen jedoch eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität gegenüber der Positivkontrolle mit PV-2 bei Hinzugabe des Inhibitors Vandetanib in einer Konzentration von 10 μM . (Balken = 5 μm , $\text{mean} \pm \text{SD}$, Shapiro-Wilk-Test, ungepaarter t-Test, Tukey's multipler Vergleichstest)

Im Nachweisverfahren der Keratinozyten Dissoziation wurde die Substanz ebenfalls mit einer Anzahl von 6 verschiedenen PV Seren getestet und konnte mit der Konzentration von 10 μM die Fragmentierung der Keratinozytenschicht signifikant mit einem p-Wert von 0,0129 verringern (s. **Abbildung 30**).

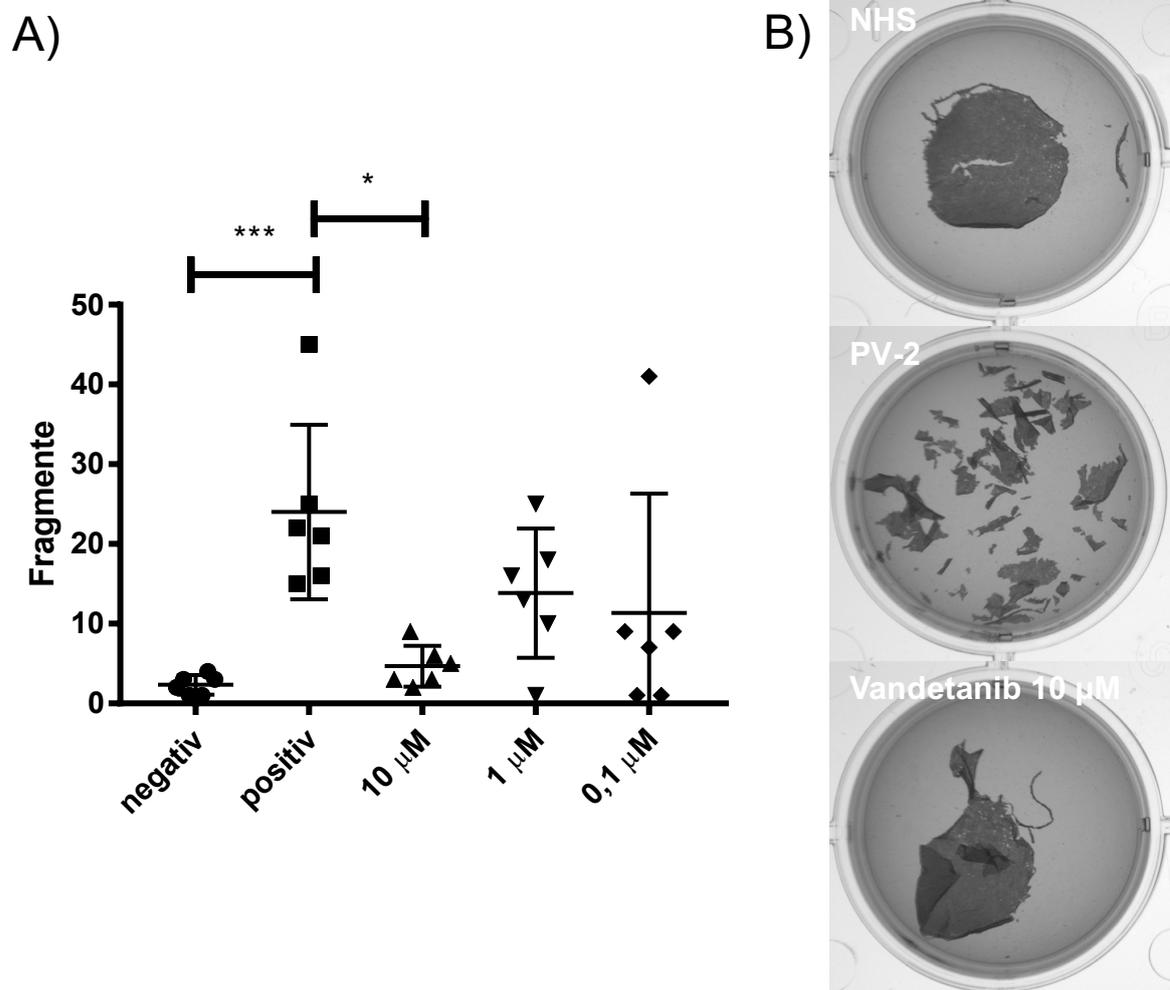


Abbildung 30 Vandetanib verringert signifikant die Keratinozyten Dissoziation. **A)** Dargestellt ist die Anzahl der Fragmente in den jeweiligen Versuchsansätzen: Negativkontrolle mit normalem humanem Serum (NHS), Positivkontrolle mit dem Pemphigus vulgaris (PV) Serum von 6 verschiedenen Patienten und daneben die Substanz Vandetanib in 3 verschiedenen Konzentrationen, getestet mit 6 verschiedenen PV Seren. Die PV Seren konnten die Fragmentierung der Keratinozyten Monoschicht signifikant (** $p=0,007$) provozieren, während Vandetanib in der Konzentration von 10 μM die Fragmentierung der Zellschicht wiederum signifikant (* $p=0,0129$) verringern konnte. **B)** Dargestellt ist exemplarisch die Fragmentierung der Keratinozyten Monoschicht mit Hinzugabe von entweder NHS, eines PV oder PV Serum und dem Inhibitor Vandetanib in einer Konzentration von 10 μM . Die Fragmentierung ist bei Hinzugabe von Vandetanib deutlich verringert und es zeigt sich eine beinahe intakte Zellschicht aus Keratinozyten. (mean \pm SD, Shapiro-Wilk-Test, ungepaarter t-Test, Kruskal-Wallis Test bzw. im Dunn's multipler Vergleichstest)

3.9. Enzastaurin verstärkt signifikant die Keratinozyten Dissoziation

Der Inhibitor der Proteinkinase C (PKC, β Isoenzym) verstärkte hingegen als einzige Substanz im Nachweisverfahren der Dsg-3 Internalisierung die Fluoreszenzintensität in der ersten Phase sowohl mit PV Serum 1 als auch PV Serum 2 in der Konzentration von 10 μ M über die genannte Auswahlgrenze. Bei weiterer Testung der Substanz mit PV Serum 3 und 4 wurde konnten die Ergebnisse reproduziert werden und die Fluoreszenzintensität ist insgesamt signifikant ($p = 0,0361$) durch Enzastaurin 10 μ M verstärkt. Jedoch zeigte sich bei der näheren Betrachtung ein verändertes Zellbild, wie in **Abbildung 31** zu sehen. Die Keratinozyten waren dabei in ihrer Form verändert und stellten sich rundlich und gelöst dar, während sich das Färbeverhalten ebenfalls änderte und die Zellen nicht nur an der Zellmembran, sondern auch als Ganzes angefärbt waren.

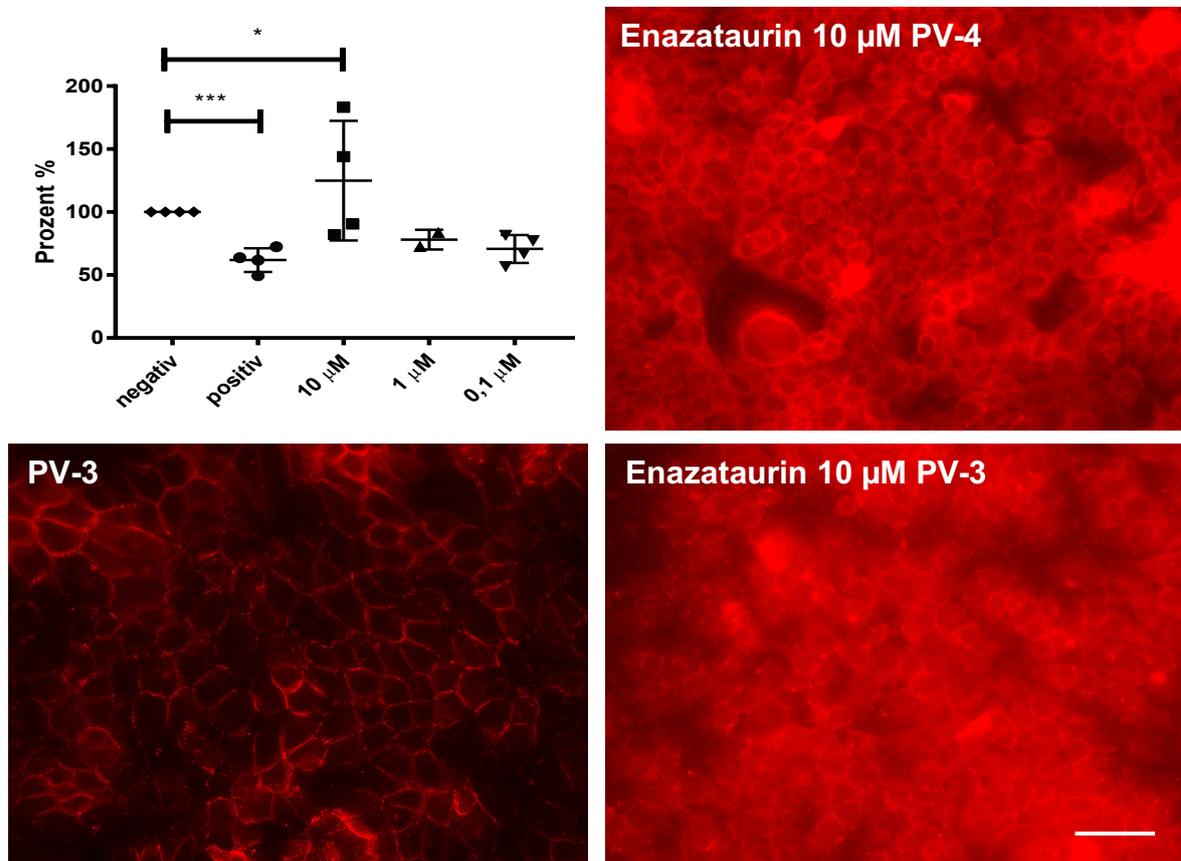


Abbildung 31 Enzastaurin verstärkt die Fluoreszenzintensität in der Testung mit allen 4 PV Seren in der Konzentration von 10 μ M im Nachweisverfahren zur Desmoglein-3 Internalisierung. Der Graph zeigt die Fluoreszenzintensität in Prozent (%) für die jeweiligen Versuchsansätze: Negativkontrolle mit normalem humanem Serum (NHS), Positivkontrolle mit dem Pemphigus vulgaris (PV) Serum von 4 verschiedenen Patienten und daneben die Substanz Enzastaurin in 3 verschiedenen Konzentrationen, getestet mit 4 verschiedenen PV Seren in den Konzentrationen 10 und 0,1 μ M und 2 PV Seren in der Konzentration von 1 μ M. Die PV Seren konnten die Fluoreszenzintensität signifikant ($***p=0,0002$) verringern. Die Substanz erzielte in der Konzentration von 10 μ M eine signifikante Steigerung ($*p=0,0361$) der Fluoreszenzintensität. Die beispielhaften Immunfluoreszenzbilder zeigen jedoch eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität gegenüber der Positivkontrolle mit PV-3 bei Hinzugabe des Inhibitors Enzastaurin in einer Konzentration von 10 μ M. Die Keratinozyten zeigen sich jedoch in ihrer Form rundlich und diffus angefärbt. (Balken = 5 μ m, mean \pm SD, Shapiro-Wilk-Test, ungepaarter t-Test, Tukey's multipler Vergleichstest)

Im Nachweisverfahren der Keratinozyten Dissoziation verstärkt hingegen als einzige Substanz der Inhibitor Enzastaurin in der Konzentration von 10 μM die Fragmentierung der Keratinozyten Zellschicht wie in **Abbildung 32** zu sehen ist. Im Vergleich mit der Behandlung mit Enzastaurin 10 μM gegenüber 1 μM und 0,1 μM , verringerten die beiden kleineren Konzentrationen die Fragmentierung der Keratinozytenschicht, jedoch nicht im Vergleich zur Positivkontrolle.

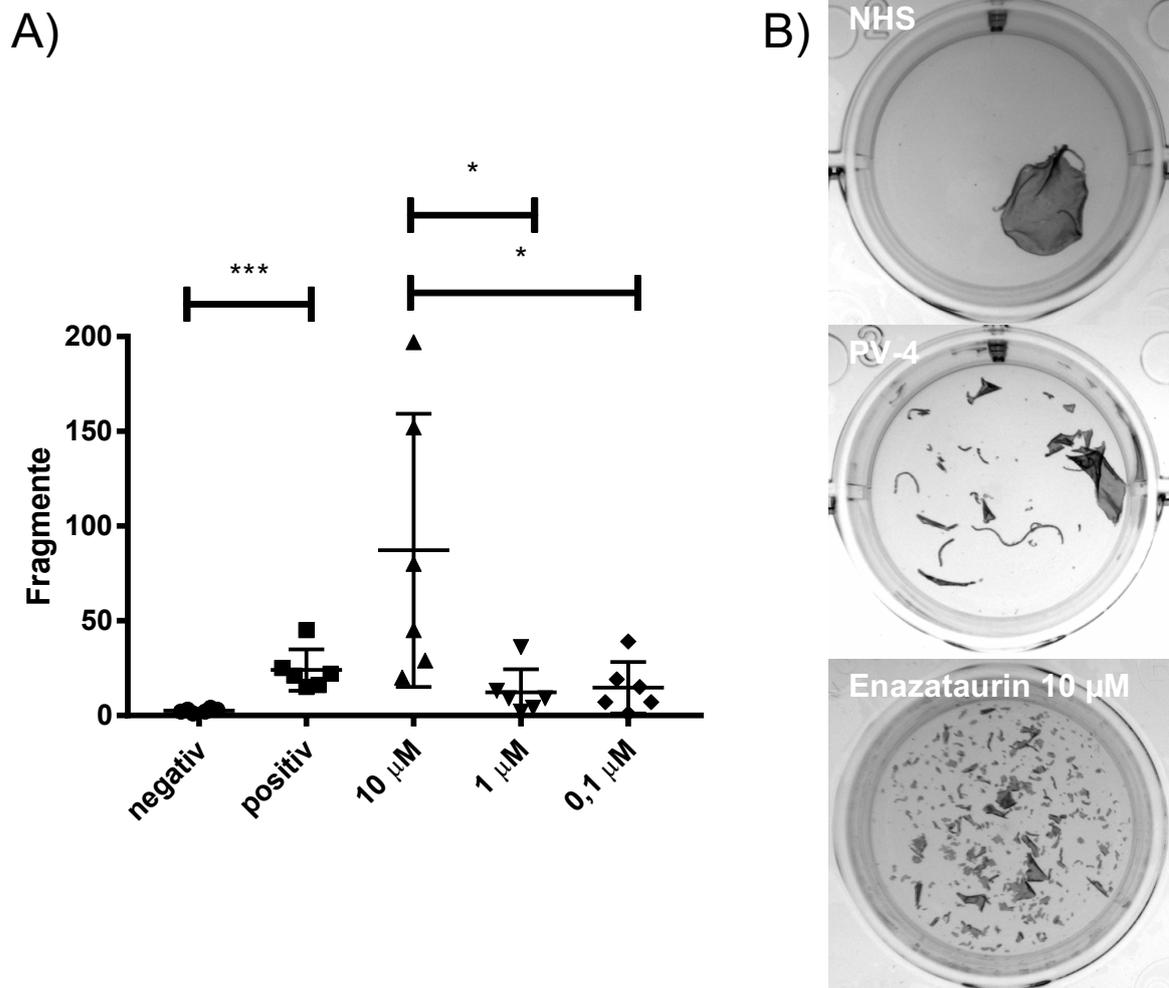


Abbildung 32 Enzastaurin verstärkt die Keratinozyten Dissoziation in einer Konzentration von 10 μM . **A)** Dargestellt ist die Anzahl der Fragmente in den jeweiligen Versuchsansätzen Negativkontrolle mit normalem humanem Serum (NHS), Positivkontrolle mit dem Pemphigus vulgaris (PV) Serum von 6 verschiedenen Patienten und daneben die Substanz Enzastaurin in 3 verschiedenen Konzentrationen, getestet mit 6 verschiedenen PV Seren. Die PV Seren konnten die Fragmentierung der Keratinozyten Monoschicht signifikant (***) induzieren. Enzastaurin verstärkte in der Konzentration von 10 μM die Fragmentierung, verglichen damit verringerten die Konzentrationen 1 μM und 0,1 μM die Fragmentierung signifikant (*). **B)** Dargestellt ist exemplarisch die Fragmentierung der Keratinozyten Monoschicht mit Hinzugabe von entweder NHS, eines PV Serum oder PV Serum und dem Inhibitor Enzastaurin in den Konzentrationen von 10 μM . Die Fragmentierung ist bei Hinzugabe von Enzastaurin deutlich verstärkt und es zeigt sich eine nahezu aufgelöste Zellschicht aus Keratinozyten. (mean \pm SD, Shapiro-Wilk-Test, ungepaarter t-Test, Kruskal-Wallis Test bzw. im Dunn's multipler Vergleichstest)

4 Diskussion

4.1. Bekannte Signalkaskaden sind verantwortlich für die Desmoglein-3 Internalisierung

In dieser Arbeit waren 4 der 7 Substanzen, die einen signifikanten Einfluss auf die Fragmentierung von Keratinozyten hatten, Inhibitoren von Signalkaskaden, die ubiquitär im Körper vorkommen und für viele verschiedene Prozesse verantwortlich sind. Darunter der MAPK Signalweg, die Aktivierung der PKC und die Steigerung des Levels von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Einige dieser Signalkaskaden sind bereits in der Literatur beschrieben.

So zeigte eine Studie von Berkowitz *et al.*⁴⁹, dass der Prozess der Dsg-3 Internalisierung p38MAPK-abhängig ist und daher ebenfalls durch einen spezifischen Inhibitor unterdrückt werden kann. Es kommt nach etwa 120 Minuten zu einer signifikanten Schrumpfung der Keratinozyten, die als Kollaps des Zytoskeletts mit der Spitzenaktivität von *Rous sarcoma*-Kinase (Src) nach 30 Minuten und von epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor Kinase (EGFRK) nach 60 Minuten in Verbindung gebracht werden⁵¹.

4.1.1. Die Blockade des MAPK Signalweges verstärkt den Zusammenhalt der Keratinozyten

Das inhibitorische Ziel von Selumetinib ist als Teil des MAPK Signalweges beschrieben. Es befindet sich dabei direkt oberhalb der ERK, welche nach dessen Phosphorylierung durch MEK die Phosphorylierung multipler Transkriptionsfaktoren induziert, darunter *c-myc*⁷⁴, wie in **Abbildung 33** dargestellt. Der MEK1/2 Inhibitor Selumetinib konnte in dieser Arbeit jedoch auch die Fragmentierung der Keratinozyten signifikant verringern. Die Inhibierung von MEK als Teil des Ras/MEK/ERK-Signalweges führt dabei zu einer verringerten Proliferation des Tumorgewebes⁷⁵⁻⁷⁷. Bisher ist Selumetinib in Studien als Chemotherapeutikum zur Therapie z.B. des Melanoms oder des kolorektalen Karzinoms in der Diskussion.

Wie bei Bektas *et al.*⁷⁸ beschrieben, induziert PV IgG die Phosphorylierung von ERK, welches ebenfalls das Ziel MEK1/2 Inhibitors Selumetinib darstellt. Die Phosphorylierung von ERK führt zur einer erhöhten Transkription von *c-myc*⁷⁴,

welches zu einer erhöhten Zellproliferation und einer geschwächten Zell-Zell-Adhäsion führt^{23,79}. Daher kann es einen frühen Marker für PV darstellen⁸⁰. Auch Src oberhalb von MEK wird von PV IgG aktiviert und sorgt damit auch über die erhöhte Produktion von *c-myc* zu einer verringerten Zell-Zell-Adhäsion^{4,81}. Die Überexpression des Protoonkogen *c-myc* in Keratinozyten wird von Williamson *et al.*⁸⁰ als ein früher Marker für den Verlust der Zelladhäsion deklariert und ist normalerweise in malignen Tumoren hochreguliert.

Dies lässt vermuten, dass Selumetinib als Inhibitor der MEK1/2 einen antagonistischen Effekt zu PV IgG hat und somit die Zellintegrität der Keratinozyten stärken kann.

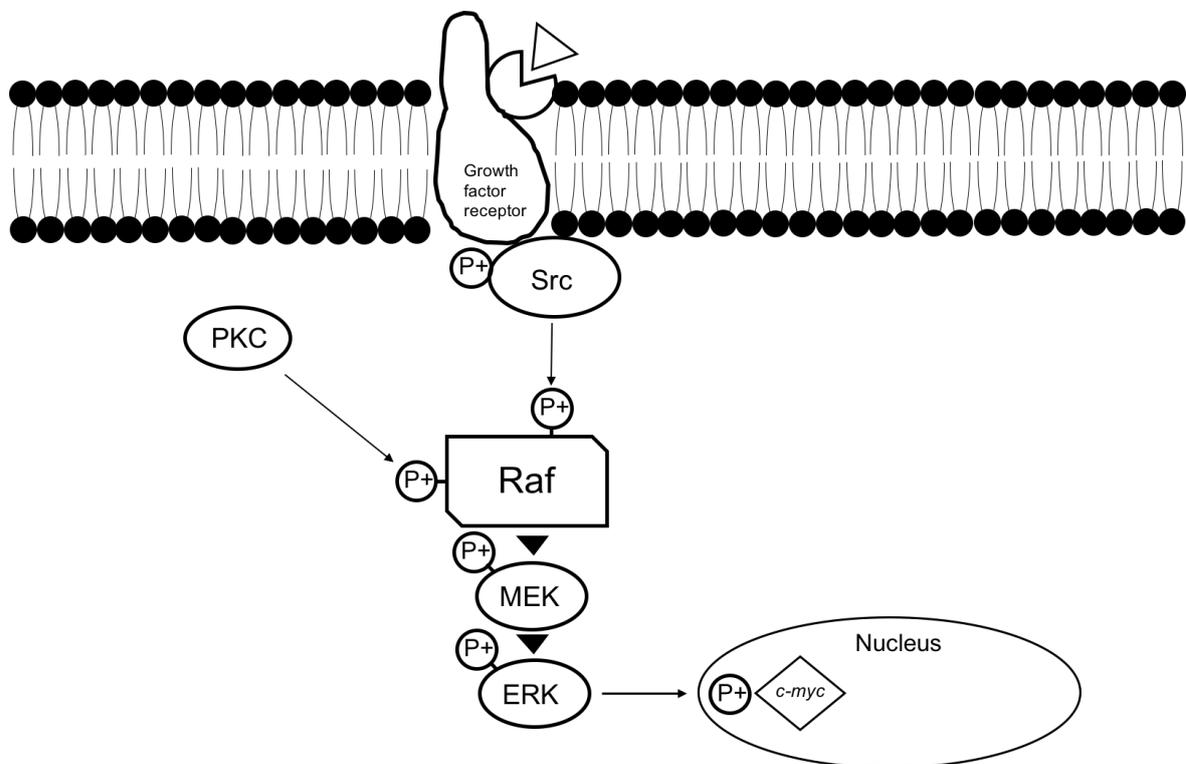


Abbildung 33 modifiziert nach McCubrey *et al.*⁷⁴. Der Ras/MEK/ERK-Signalweg ist Teil eines komplexen Netzwerkes aus verschiedenen Signalkaskaden. Hier dargestellt ist isoliert nur der Ras/MEK/ERK-Signalweg ohne die stimulierenden oder inhibierenden Einflüsse von anderen Molekülen zur Veranschaulichung der Ergebnisse dieser Arbeit. Kommt es durch einen Wachstumsfaktor, hier als Dreieck dargestellt, zur Aktivierung des Wachstumsfaktorrezeptors (*Growth factor receptor*), wird Src über Phosphorylierung aktiviert und phosphoryliert seinerseits Raf. Raf kann durch Src aktiviert werden, jedoch auch über die PKC. Raf phosphoryliert und aktiviert daraufhin MEK, welches ERK phosphoryliert und aktiviert. Diese Signalkaskade sorgt dafür, dass *c-myc* im Nucleus phosphoryliert und hochreguliert wird. Abkürzungen: Extrazellulär-Signal regulierte Kinase (ERK), Mitogen-aktivierte Protein Kinase/ERK Kinase (MEK), Phosphorylierung (P), Proteinkinase C (PKC), *Rapidly growing fibrosarcoma* (RAF)

Als weiterer Einflussfaktor des Ras/MEK/ERK-Signalweges ist die Rolle der PKC in der Literatur zu PV bereits beschrieben und wurde als Zielstruktur eines Inhibitors dieser Arbeit verwendet. Bisher ist die Inhibition der PKC von anderen Arbeitsgruppen, wie z.B. der von Walter *et al.*⁸² als Schlüsselregulator und protektiver Faktor für die Keratinozytendissoziation durch PV IgG beschrieben worden. Laut Waschke⁴ führe PV IgG über die Aktivität der Phospholipase C (PLC) zu vermehrter Freisetzung von IP₃ und Ca²⁺ und darüber zur Aktivierung der PKC, welche wiederum einen stimulierenden Einfluss auf die Raf/MEK/ERK-Signalkaskade habe. Die *in vitro* Inhibition der PKC bei gleichzeitiger Inkubation von HaCat-Zellen mit PV IgG konnte die Depletion von Dsg-3 signifikant verringern⁸³. Auch im passiven neonatalen Mausmodell konnten Inhibitoren der PLC und der PKC die Blasenbildung verhindern⁸⁴. Die Aktivierung von PLC und PKC, sowie die Ausschüttung von Ca²⁺ und IP₃ geschieht jeweils zu frühen Zeitpunkten innerhalb der ersten 60 Sekunden nach Exposition mit dem pathogenen Antikörper³³.

Ein weiterer Effekt der PKC im Kontext von PV IgG Exposition auf Keratinozyten beinhaltet die Phosphorylierung von β -Catenin, sowie die Phosphorylierung von p120-Catenin durch die Src⁶¹. Die Aktivierung von Src nach Keratinozyten Exposition mit PV IgG, sowie die Aktivierung der EGFRK stellen Chernyavsky *et al.*⁵¹ in einer weiteren Studie jedoch nicht in den direkten Zusammenhang mit Dsg-3 Antikörpern, sondern propagieren eher Antikörper gegen andere PV Antigene (z.B. Plakophilin, Desmoplakin, u.a.). Denn die Inhibition von Src verringert die PV IgG abhängige EGFRK und p38MAPK Aktivität nur um 45% bzw. 30%, was die Annahme zulässt, dass Src sich zwar oberhalb von EGFRK und p38MAPK in der Signalkaskade befindet, jedoch die Bindung von PV IgG an Keratinozyten auch andere primäre Signalkaskaden aktiviert^{41,51}. Es wurde zudem ein Komplex aus extradesmosomalem Dsg-3, E-Cadherin und Src von Rötzer *et al.*⁸⁵ beschrieben.

In den in **Abschnitt 3.9.** dargestellten Versuchen zeigte Enzastaurin, als Inhibitor der PKC, in der 10 μ M Konzentration jedoch ein gegenteiliges Phänomen. Die Blockade der PKC sollte eigentlich über die verminderte Aktivierung des Raf/MEK/ERK-Signalweges zu einer ebenfalls verminderten Transkription von *c-myc* führen, wodurch die Zell-Zell-Adhäsion verringert wird. In unseren

Ergebnissen zeigte sich aber ein verstärkter Verlust der Zelladhäsion in der 10 μ M Konzentration und keine klaren keratinozytären Zellverbände mehr, wie in **Abbildung 31** zu sehen ist. Auch wenn die Ergebnisse keinen präventiven Effekt von Enzastaurin zeigen, können sie doch als unterstützender Hinweis gesehen werden, dass die PKC eine wichtige Rolle in der PV Pathogenese spielt.

4.1.2. Die Phosphatidylinositol 3-Kinase ist Teil der komplexen Desmoglein-3 Internalisierungskaskade

Sowohl die Substanz A66 als Inhibitor der PI3K α Untereinheit, als auch die Substanz TGX-221 als Inhibitor der PI3K β Untereinheit hatten in den Experimenten einen signifikanten Einfluss auf die Dissoziation der Keratinozyten. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass hier die PI3K, welche ubiquitär exprimiert und in viele Signalkaskaden involviert ist⁸⁶, ebenfalls einen regulierenden Effekt auf die Dsg-3 Internalisierung hat. **Abbildung 34** setzt die PI3K in den Kontext der Signalkaskaden. Die Aktivierung der PI3K führt zur Phosphorylierung der Proteinkinase B (Akt), woraufhin es im nachgeschalteten Signalverlauf zu einer Aktivierung des Ziels von Rapamycin im Säugetier (mTOR) kommt.

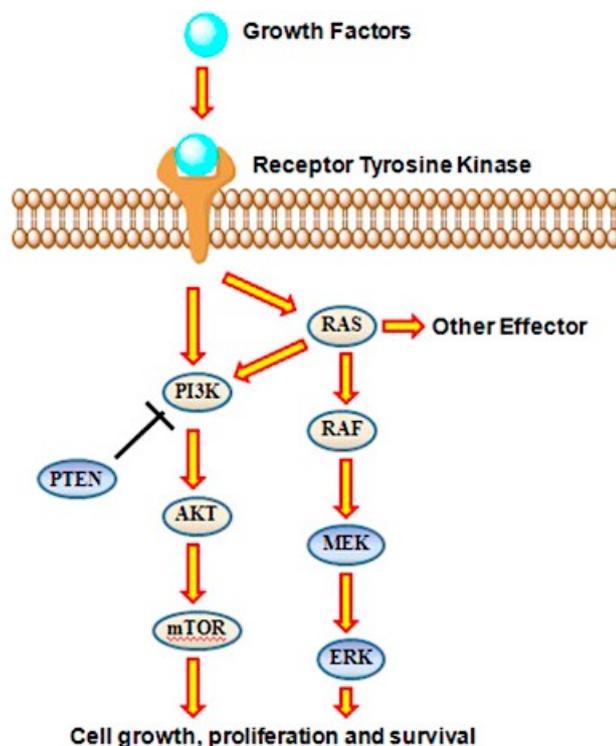


Abbildung 34 Ras/Raf/MEK/ERK und Ras/PI3K/PTEN/Akt/mTOR Signalwege⁸⁷. Gelbe Pfeile stellen die Aktivierung des Signalweges dar. Schwarze, blockierende Pfeile die Inaktivierung des Signalweges. Abkürzungen: Extrazellulär-Signal regulierte Kinase (ERK), Mitogen-aktivierte Protein Kinase/ERK Kinase (MEK), Ziels von Rapamycin im Säugetier (mTOR), Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), Proteinkinase B (Akt), Phosphatase und Tensin Homolog (PTEN), *Rapidly growing fibrosarcoma* (Raf), Ratten Sarkom G-Protein (Ras)

Der Einfluss des mTOR ist in der Literatur zur Signaltransduktion des PV bereits von einigen Arbeitsgruppen^{88,89} beschrieben und unterstützt die These, dass die PI3K eine Rolle in der Signalkaskade der Dsg-3 Internalisierung spielt. Nach Pretel *et al.*⁸⁸ kommt es in PV Läsionen zu einem Missverhältnis von Akt, dem direkt nachgeschalteten Ziel von PI3K, und mTOR, welches im weiteren Verlauf zu finden ist. Die Rolle des PI3K/mTOR Signalweges ist bereits für die Differenzierung, Proliferation, Migration und Überleben von Keratinozyten beschrieben⁹⁰. Auch in der PV Pathogenese kann die Blockade von mTOR mit Sirolimus eine Rolle spielen und die suprabasale Blasenbildung verhindern^{86,91,92}. Zudem konnte in Einzelfällen durch die Therapie mit Sirolimus eine Remission bei PV Patienten erzielt werden^{93,94}.

Um den genauen Mechanismus in dieser Teil der Strecke des insgesamt komplizierten Signalweges in Bezug auf die Pathogenese des PV nachvollziehen zu können, sind jedoch weitere spezifische Versuche notwendig.

In dieser Arbeit zeigte die spezifische Inhibition von mTOR jedoch nicht den erwarteten Effekt. Mögliche Gründe und Fehlerquellen sind im folgenden **Abschnitt 4.4.** unter der methodischen Limitierung beschrieben.

4.2. Wachstumsfaktor-Rezeptoren können der initiale Schritt der Desmoglein-3 Internalisierung sein

In den Versuchen zeigten sowohl die Inhibierung des FGFR, als auch des VEGFR-2 eine verringerte Keratinozyten Dissoziation. Der VEGFR-2 Inhibitor, Vandetanib (Zactima, ZD6474), ist derzeit in der klinischen Entwicklung gegen humanes Tumorwachstum. Dabei konnten Ciardello *et al.*⁹⁵ zeigen, dass dadurch nicht nur der VEGFR-2 inhibiert wird, sondern ebenfalls eine Aktivierung der EGFR Tyrosin Kinase stattfindet, welche wiederum die oben beschriebenen Ras/Raf/MEK/ERK und Ras/PI3K/PTEN/Akt/mTOR Signalwege initiieren kann^{74,78,96} (s. **Abbildung 35**).

Die Beteiligung von EGFR in der Pathogenese des PV wurde bereits von einigen Arbeitsgruppen nachgewiesen^{66,78}. Sie konnten zeigen, dass die Inhibition von EGFR die Menge an membranassoziiertem Dsg-3 und PG, sowie die Zell-Zell-Adhäsion in NHEK verbessern konnte. Bektas *et al.*⁷⁸ schlugen vor, dass oberhalb von EGFR eine Aktivierung von p38MAPK stattfindet, da eine Inhibition von

p38MAPK auch die Aktivität von EGFR verringerte, sowie die Phosphorylierung der ERK, dem Substrat unterhalb der EGFR, vermindert.

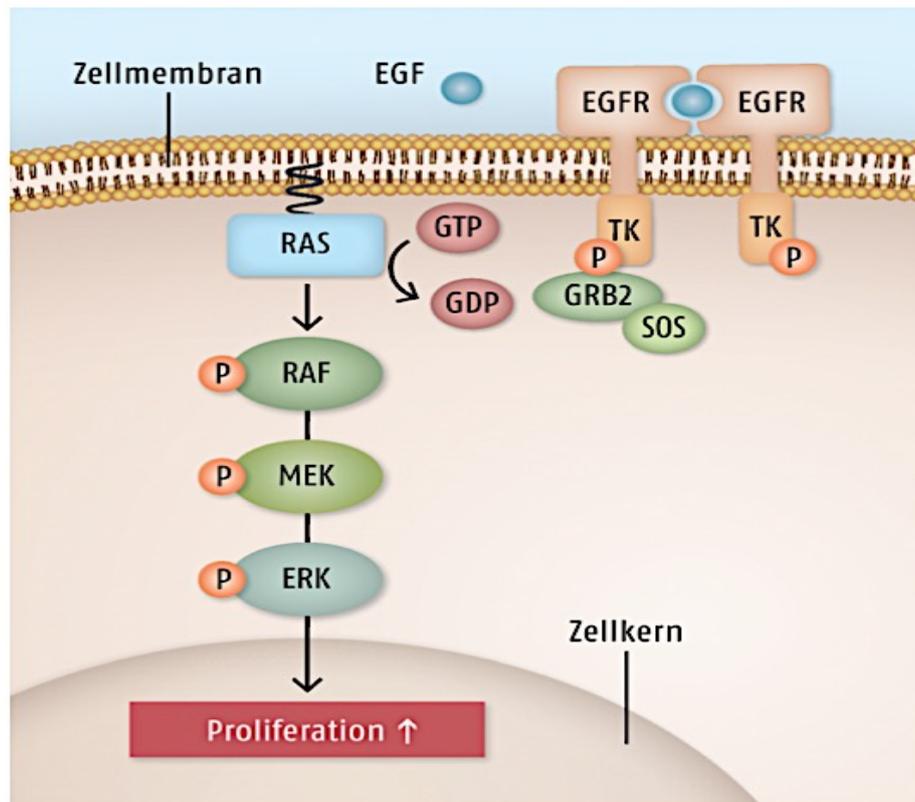


Abbildung 35 modifiziert nach Bendas⁹⁷ Aktivierung der Signalkaskade durch den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) als vereinfachte Darstellung führt zur verstärkten Zellproliferation. Es kommt über die Bindung des EGF an dem transmembranen EGFR zur Phosphorylierung des GRB2 durch die TK. Daraufhin wird durch das RAS über die Spaltung von GTP zu GDP RAF phosphoryliert und somit aktiviert. Dieser Vorgang findet durch Phosphorylierung ebenfalls mit MEK und ERK statt. Das Signal der ERK führt im Zellkern dann zu einer verstärkten Proliferation. Abkürzungen: Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR), Extrazelluläre signal-regulierte Kinase (ERK), Guanidin Bisphosphat (GDP), Wachstumsfaktor Rezeptor gebundenes Protein 2 (GRB2), Guanidin Trisphosphat (GTP), Mitogen-aktivierte Protein Kinase/ERK Kinase (MEK), Phosphat (P), *rapidly growing fibrosarcoma* (RAF), Ratten Sarkom G-Protein (RAS), *son of sevenless* (SOS), Tyrosin Kinase (TK)

Es ist jedoch zu diskutieren, ob der EGFR in direktem Zusammenhang zur Akantholyse, vermittelt über die Bindung der Dsg-3 Autoantikörper, steht^{41,51} oder eher einen unabhängigen Weg zur p38MAPK Aktivierung darstellt⁶⁶. In einem p38MAPK unabhängigen Weg ist die Verbindung des EGFR mit Src^{41,51,89} und der untergeordneten *neural nitric oxid synthetase* (nNOS)^{89,98} zu erwägen. Deren Expression ist vor allem in Wundrand- assoziierten Keratinozyten nach der Verwundung vorzufinden. Spitzenwerte der Expression des nNOS Proteins werden vor allem in der späten Phase der Reparatur erreicht. Während der entzündlichen und proliferativen Phase der Wundheilung liegt auch eine transiente Erhöhung von aktiviertem EGFR vor⁹⁸.

Ein genauer Zusammenhang zwischen der Aktivierung des VEGFR-2/FGFR und der Pathogenese von Pemphigus und ob die gleiche Wirkung an unterschiedlichen Rezeptoren erzielt werden kann, ist bisher nicht beschrieben. Jedoch ist der FGFR-Inhibitor (BGJ389) im Fokus der Forschung für Therapieoptionen des Mammakarzinoms und gastrointestinalen Stromatumoren und kann seinerseits die Aktivierung des Ras/Raf/MEK/ERK und Ras/PI3K/PTEN/Akt/mTOR Signalweges bewirken^{99,100}.

Die Zusammenschau der Ergebnisse und die Aktivierung des EGFR durch VEGFR-2 lassen die Vermutung zu, dass auch der Inhibitor der FGFR eine Reaktion am EGFR hervorrufen kann.

4.3. Tropomyosinkinase A spielt möglicherweise eine Rolle in der Signalkaskade des Pemphigus vulgaris

Wie im **Abschnitt 3.5.** beschrieben, verringerte der TrkA Inhibitor GW441756 signifikant die Keratinozyten Dissoziation und konnte im Screening des Dsg-3 Internalisierungsnachweises mit beiden PV Seren die Grenze nur knapp nicht übertreffen. Ein direkter Zusammenhang zwischen der TrkA und PV ist aber bisher in der Literatur nicht beschrieben. Ein topisch applizierter TrkA Inhibitor konnte bereits in der Therapie der Psoriasis zu einer Verringerung des Juckreizes führen, was die Schlussfolgerung zulässt, dass es bei entzündlichen Prozessen in der Epidermis zu einer erhöhten NGF und TrkA Expression kommt¹⁰¹.

Howe *et al.*¹⁰² zeigten jedoch, dass der Nervenwachstumsfaktor (NGF) über die Bindung an TrkA den Ras-MAPK Signalweg und damit Erk1/2 aktivieren kann. Somit kann die Blockade von TrkA die Internalisierung von NGF verhindern und damit auch die Aktivierung von Erk1/2 unterdrücken.

Dies hebt wiederum den Zusammenhang zwischen der Dsg-3 Internalisierung und der Aktivierung des Ras-Signalweges hervor, der somit mit allen signifikant getesteten Substanzen in Verbindung steht. Eine Übersicht über die Zusammenhänge der signifikanten Substanzen mit dem Ras-Signalweg ist in **Abbildung 36** dargestellt.

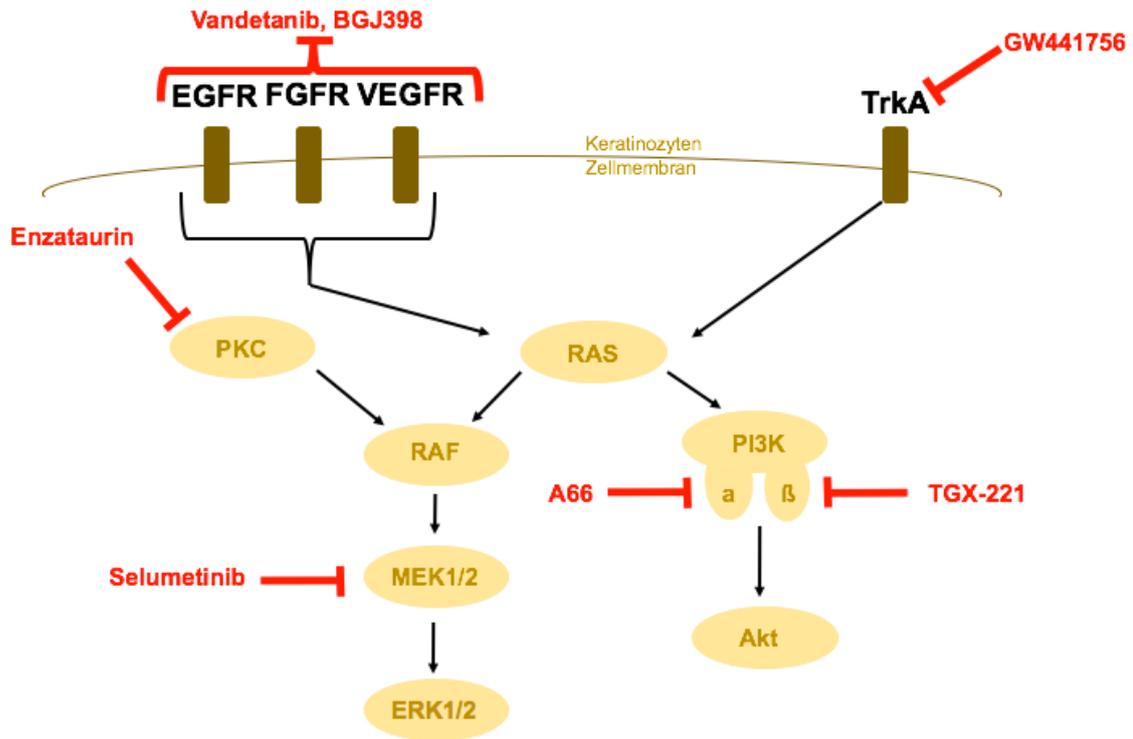


Abbildung 36 Interaktion der verschiedenen signifikanten Inhibitoren in der Signalkaskade der Desmoglein-3 Internalisation. Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR), Extrazellulär-Signal regulierte Kinase (ERK), Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptor (FGFR), Mitogen-aktivierte Protein Kinase/ERK Kinase (MEK), Ratten Sarkom G-Protein (RAS), *Rapidly growing fibrosarcoma* (RAF), Proteinkinase B (Akt), Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), Proteinkinase C (PKC), Tropomyosinkinase A (TrkA), Vasoendothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor (VEGFR)

4.4. Methodische Limitierung des Nachweisverfahrens der Desmoglein-3 Internalisierung

Das Nachweisverfahren der Dsg-3 Internalisierung soll in dieser Arbeit zu einem objektiven Nachweis zur quantitativen Messung der Dsg-3 Internalisierung etabliert werden. In den einzelnen Experimenten konnten einige Schritte, bei denen eine hohe Fehleranfälligkeit auftrat, erkannt werden. Aufzählung der potenziellen Fehlerquellen:

1. Zunächst ist die gleichmäßige Verteilung der Keratinozyten auf den Kammerobjektträgern die maßgebliche Voraussetzung für eine objektive Aufnahme der Fluoreszenzintensität. Wurde keine gleichmäßige Konfluenz der Keratinozyten auf dem Kammerobjektträger erreicht, musste das Feld des Kammerobjektträgers verworfen werden. Hierdurch entstand ein hoher Material-, sowie zeitlicher Aufwand.
2. Ebenso kam es bei den häufigen Waschschritten, wie in **Abschnitt 2.4.** beschrieben, dass die Keratinozyten beim Waschvorgang verloren gingen, da sie dem Boden nicht fest genug anhafteten. Der Versuch musste daraufhin wiederholt werden, was ebenfalls zu einem hohen Material-, wie auch zeitlichen Aufwand führte.
3. Die Intensität der Färbung der Keratinozyten mit dem Fluoreszenz-markierten Antikörper ist stark abhängig vom Öffnungszeitpunkt des Fluoreszenzfarbstoffes. Je älter die Lösung, desto geringer die Intensität der Färbung. Da zu jedem Versuchsansatz jedoch eine Negativ- und Positivkontrolle hinzugefügt wurden, an denen die prozentuale Ab- oder Zunahme der Fluoreszenzintensität durch die Substanzen gemessen wurde, fällt dies nicht zu sehr ins Gewicht.
4. Die Aufnahmen der einzelnen Felder des Kammerobjektträgers mit dem Fluoreszenz-Mikroskop erfolgten an 5 zufällig ausgewählten Stellen pro Feld eines Kammerobjektträgers. Die Auswahl dieser Felder ist dadurch limitiert, dass diese nicht am Rand des Kammerfeldes, sowie nicht überlappend mit den Voraufnahmen sein soll. Zudem kam es gelegentlich zu Artefakten durch z.B. Staubpartikel, die sich durch den Immunfluoreszenzfarbstoff sehr intensiv anfärbten. Diese Artefakte sollten natürlich auch nicht mit auf den Aufnahmen sein, da sie die gesamte Fluoreszenzintensität beeinflussten.

In der Selleckchem *Target Selective Inhibitory Library* waren auch Inhibitoren enthalten, welche sich spezifisch gegen den EGFR oder andere Strukturen der Signalkaskaden richten (z.B. Ras, Raf, Akt, mTOR) und bereits durch mehrere Forschungsgruppen bestätigt wurden (s. **Anhang**).

Es stellt sich somit die Frage, warum bei Verwendung dieser Inhibitoren keine verringerte Keratinozyten Dissoziation reproduziert werden konnte.

Die Antwort darauf lässt sich teilweise in der Komplexität des Nachweisverfahren der Dsg-3 Internalisierung finden. Die methodische Limitierung, wie zuvor beschrieben, kann in Kombination mit dem hohen zeitlichen Aufwand der Überprüfung von 141 Substanzen in je 2 verschiedenen Konzentrationen und mit 2 verschiedenen Spenderseren eine Ursache dafür sein. Außerdem wurde in dem Versuchsaufbau nicht zwischen dem Einfluss von Dsg-1 und Dsg-3 unterschieden, da in den Spenderseren, sowohl Dsg-1 als auch Dsg-3 präsent waren. Dies lässt nicht ausschließen, dass durch den Einfluss von Dsg-1 eine, durch die Experimente nicht repräsentierte, Veränderung an den Signalkaskaden vorgenommen wurde. Trotzdem ist dieser Ansatz für die Erforschung von protektiven, topischen Therapeutika vermutlich realistischer, als ein Versuchsansatz mit einem monoklonalen Dsg-3 Antikörper, da die Situation in PV Patienten naturgetreuer dargestellt werden kann¹⁰³.

Um die methodische Limitierung des Nachweisverfahrens der Dsg-3 Internalisierung zu kontrollieren und die Etablierung des Verfahrens zu stützen, wurde das Nachweisverfahren der Keratinozyten Dissoziation zur Validierung der Ergebnisse genutzt. Die Darstellung der Dsg-3 Internalisierung mittels Immunfluoreszenz ist zwar keine Neuerung, jedoch bisher nur zur repräsentativen Darstellung und nicht zur Quantifizierung der Dsg-3 Internalisierung und Pathogenität genutzt worden^{34,104,105}. Das Nachweisverfahren der Keratinozyten Dissoziation von Ishii *et al.*³⁶ ist bereits von vielen Arbeitsgruppen zur quantitativen *in vitro* Darstellung des Pathomechanismus des PV genutzt worden^{46,106}. Die Validierung der 19 Substanzen, welche sich durch die Testung der 141 Substanzen mit 2 Spenderseren und in je 2 Konzentrationen herauskristallisierten, konnten so mit einer Anzahl von 6 verschiedenen Spenderseren und 3 verschiedenen Konzentrationen getestet werden, was den statistischen Fehler kleiner gehalten hat.

4.5. Ausblick für die weitere Forschung zur Desmoglein-3 Internalisierung

Wie in **Tabelle 3** dargestellt, wäre das Prozedere eine mögliche Vorgehensweise, um die Substanzen weiter zu validieren und auch im Hinblick auf ihre eventuelle Toxizität zu testen. Die 7 Substanzen, welche eine signifikante Reduzierung der Keratinozyten Dissoziation zeigten, können im weiteren Verlauf noch mit NHEK und mit mehreren verschiedenen Spenderseren im Nachweisverfahren der Keratinozyten Dissoziation getestet werden.

Die dort positiv getesteten Substanzen könnten daraufhin, sowohl im Hautorgankulturmodell nach Burmester *et al.*¹⁰⁷, als auch in verschiedenen Mausmodellen^{103,108,109} weiter untersucht werden.

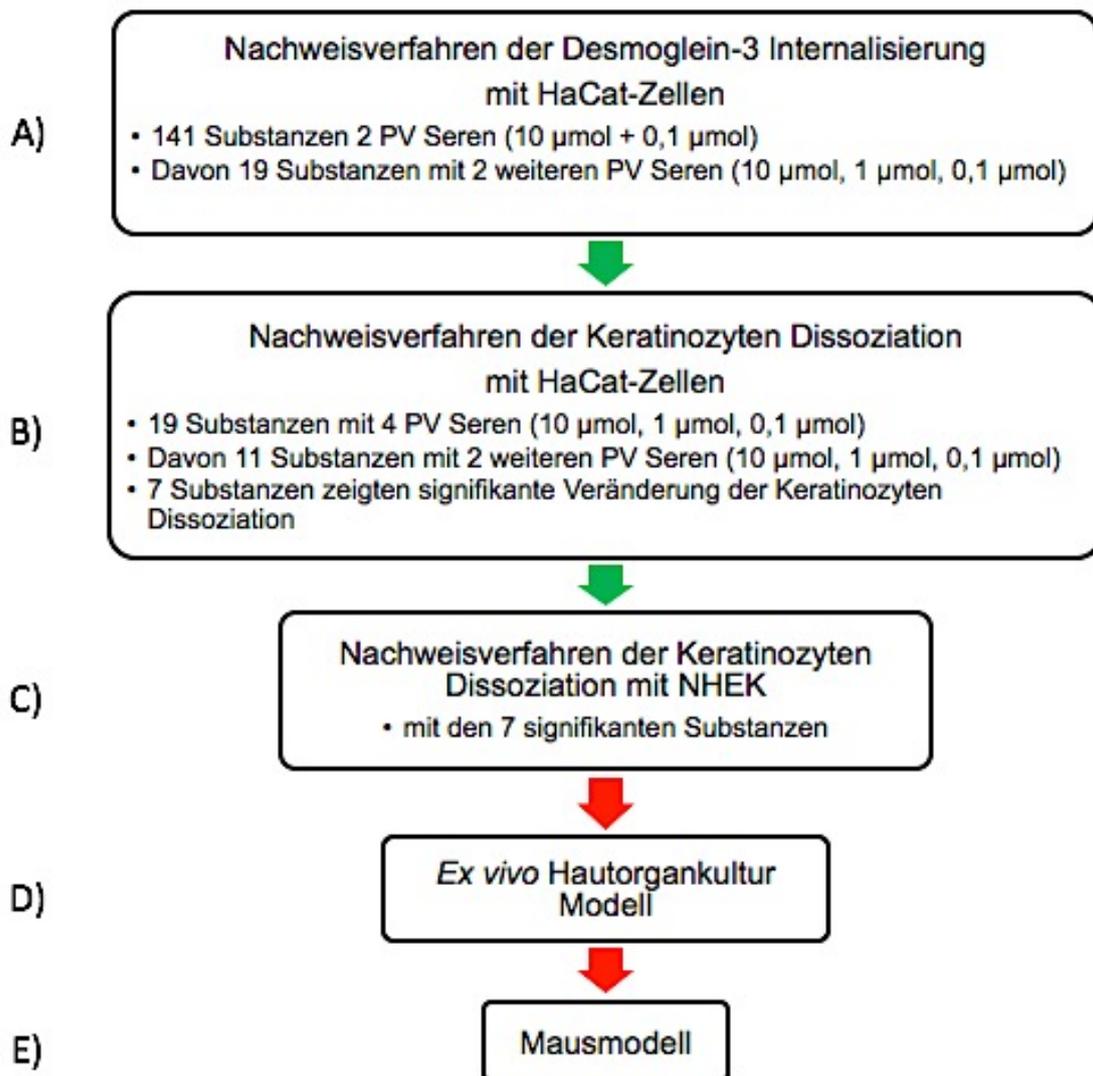
Wie in **Abschnitt 4.4.** beschrieben, waren in der Selleckchem *Target Selective Inhibitory Library* auch Substanzen enthalten, welche in den oben beschriebenen Signalkaskaden nach der Literaturrecherche inhibitorische Effekte haben könnten.

Da nicht auszuschließen ist, dass bei der Testung der 141 Substanzen mit 2 Spenderseren diese falsch negativ getestet wurden, könnten diese Substanzen z.B. der Inhibitor des EGFR, Ras, Raf, Akt oder mTOR erneut im Nachweisverfahren der Keratinozyten Dissoziation untersucht werden.

Zudem könnte auch die Kombination von zwei oder drei Substanzen weitere Aufschlüsse über die komplexe Wirkung der Signalkaskaden geben.

Schlussendlich sind die Substanzen der *Target Selective Inhibitory Library* von Selleckchem, z.B. Selumetinib und Vandetanib, teilweise bereits in der klinischen Anwendung für andere Einsatzgebiete, so dass eine Toxizität für den Menschen bereits ausgeschlossen werden konnte. Dies ließe perspektivisch eine topische Anwendung bei PV Patienten in Studien im *off-label-use* zu.

Tabelle 3 Flussdiagramm des möglichen, weiteren Vorgehens in der Forschung zur Desmoglein-3 Internalisierung. Die grünen Pfeile symbolisieren die in dieser Arbeit bereits abgeschlossenen Schritte. Die roten Pfeile sind die möglichen, noch ausstehenden, Schritte. Im Nachweisverfahren der Desmoglein-3 Internalisierung wurden zunächst 141 Substanzen mit 2 Seren von Pemphigus vulgaris (PV) Patienten in 2 verschiedenen Konzentrationen (10 µmol und 0,1 µmol) getestet. Davon zeigten 19 Substanzen einen positiven Effekt mit einem der beiden PV Seren oder mit beiden in jeweils einer oder zwei Konzentrationen. Diese wurden wiederum mit 2 weiteren PV Seren in 3 verschiedenen Konzentrationen (10 µmol, 1 µmol und 0,1 µmol) getestet. Um die Ergebnisse aus der ersten Phase zu validieren wurden die 19 Substanzen mit dem Nachweisverfahren der Keratinozyten Dissoziation nach Ishii *et al.*³⁶ und zunächst 4 verschiedenen PV Seren in 3 Konzentrationen (10 µmol, 1 µmol und 0,1 µmol) mit 2 weiteren PV Seren getestet. Von den 11 Substanzen zeigten 7 im Nachweisverfahren der Keratinozyten Dissoziation eine signifikante Veränderung. Diese 7 Substanzen könnten nun mit weiteren PV Seren an normalen humanen epidermalen Keratinozyten (NHEK) getestet werden.



5 Zusammenfassung

Pemphigus vulgaris (PV) ist eine potenziell lebensbedrohliche Autoimmunerkrankung, die durch eine Autoantikörperbildung gegen Desmoglein (Dsg) -1 und Dsg-3 charakterisiert ist und zu einer intraepidermalen Blasenbildung führt. Für diese schwerwiegende Erkrankung gibt es bisher keine gezielten und zufriedenstellenden Therapieregime. Die genaue Pathogenese des Verlustes der Zell-Zell-Adhäsion ist noch immer unklar. In aktuellen Studien zum Adhäsionsverlust bei PV konnten verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege definiert werden, welche in den Keratinozyten nach Bindung des Dsg-3 Autoantikörpers an der Keratinozytenoberfläche ablaufen. In diese Signaltransduktionswege einzuwirken, könnte eine neue therapeutische Option für die gezielte Behandlung des PV darstellen.

In dieser Arbeit wurden insgesamt 141 Inhibitoren aus der Selleckchem *Target Selective Inhibitory Library* für unterschiedliche Signalkaskaden im Hinblick auf ihre inhibitorische Funktion und den Zusammenhang zur PV Pathogenese untersucht. Dabei wurde sowohl ein neues *in vitro* Testverfahren etabliert, als auch ein bereits etabliertes *in vitro* Verfahren genutzt.

Mittels des neu etablierten objektiven und quantitativen Nachweisverfahrens der Dsg-3 Internalisierung, welches die Immunfluoreszenz-markierte Dsg-3-Menge misst, konnten von den 141 Substanzen 19 herausgefiltert werden. Durch die weitere Validierung mit einem etablierten Testverfahren, dem Nachweisverfahren der Keratinozyten Dissoziation, wurden von den 19 Substanzen weitere 7 herausgefiltert, die einen signifikanten Einfluss auf die Stabilität der Keratinozytenverbände haben.

Die 7 Substanzen, welche sich durch diese Arbeit signifikant hervortaten, können nun im Kontext der PV Pathogenese in weiteren Testverfahren untersucht werden. Um den direkten Einfluss der Substanzen auf die Keratinozyten Dissoziation zu nutzen, könnte die topische Applikation eine mögliche neue Therapieoption für PV Patienten sein. Zusammenfassend konnten durch diese Arbeit neue Erkenntnisse zu Signalkaskaden in Keratinozyten gewonnen und potenzielle neue Therapiemöglichkeiten für PV gefunden werden.

6 Summary

Pemphigus vulgaris (PV) is a potentially life-threatening disease in which intraepidermal blistering occurs due to autoantibodies directed against cell adhesion contacts of desmoglein (dsg)- 1 and dsg- 3. Yet, there is no targeted therapeutic option that is considered as a sufficient treatment. The exact mechanism which takes place during the loss of adhesion due to binding of dsg-3 antibodies to the keratinocyte surface remains unclear. In recent studies, different intracellular signaling cascades have been detected to identify the reason for the loss of adhesion in PV, as autoantibodies directed against dsg-3 bind on the keratinocyte surface.

Influencing these signaling cascades could be a novel therapeutic option for a rather targeted and more sufficient therapy in PV.

In this thesis, 141 substances of the Selleckchem Target Selective Inhibitory Library were examined in order to find targets in PV pathogenesis and use these as new therapeutic options. Therefore, an *in vitro* novel screening method was established and a well-established *in vitro* assay for PV was used in addition.

By using this new objective and quantitative method, that measures the amount of dsg-3 stained with an immunofluorescence dye, out of 141 substances 19 could be detected that inhibited the internalisation of dsg-3 induced by the exposure to PV IgG.

Validating this with a well-established method, the keratinocyte dissociation assay, out of these 19 substances 7 could be defined that improved significantly keratinocyte adhesion.

In summary, this work provided new insights into signaling events in keratinocytes induced by PV IgG. By using our novel screening procedure, in total 7 compounds were found that had a significant impact on keratinocyte dissociation. Hence, their targets are most likely to be part of PV pathogenesis.

These compounds may now be taken into consideration for other methods to have a more detailed look on their effects so that in the future PV patients may benefit from these results.

7 Literaturverzeichnis

1. Welsch U, Kummer W. *Lehrbuch Histologie*. 4. Auflage. Elsevier GmbH, München; 2014.
2. Moll I. *Duale Reihe Dermatologie*. 7. Auflage. Stuttgart: Thieme Verlag; 2010.
3. Delva E, Tucker DK, Kowalczyk AP. The desmosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1(2):1-17. doi:10.1101/cshperspect.a002543.
4. Waschke J. The desmosome and pemphigus. *Histochem Cell Biol*. 2008;130(1):21-54. doi:10.1007/s00418-008-0420-0.
5. Kowalczyk AP, Green KJ. Structure, function, and regulation of desmosomes. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2013;116:95-118. doi:10.1016/B978-0-12-394311-8.00005-4.
6. Mihai S, Sitaru C. Immunopathology and molecular diagnosis of autoimmune bullous diseases. *J Cell Mol Med*. 2007;11(3):462-481. doi:10.1111/j.1582-4934.2007.00033.x.
7. Plewig, Landthaler, Burgdorf, Hertl, Ruzicka. *Braun- Falco's Dermatologie, Venerologie Und Allergologie*. 6. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2012.
8. Kempf, Hantschke, Kutzner, Burgdorf. *Dermatopathologie*. 2. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2011.
9. Murphy K. *Janeway's Immunology Biology*. 8. Auflage. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC; 2012.
10. Pschyrembel W. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. 263. Aufla. de Gruyter; 2012.
11. Löffler G. *Basiswissen Biochemie*. 7. Auflage. Springer; 2008.
12. Mackay IR, Burnet SFM. *Autoimmune Disease: Pathogenesis, Chemistry and Therapy*. Thomas; 1963.
13. Roberts-Thomson PJ, Jackson MW, Gordon TP. A seminal monograph: Mackay and Burnet's Autoimmune diseases. *Med J Aust*. 2012;196(1):74-76. doi:10.5694/mja11.10821.
14. Mackay IANR. Autoimmunity: Paradigms of Burnet and complexities of today. 1992:159-171.
15. Prüßmann W, Prüßmann J, Koga H, et al. Prevalence of pemphigus and

- pemphigoid autoantibodies in the general population. *Orphanet J Rare Dis.* 2015;10(1):1-8. doi:10.1186/s13023-015-0278-x.
16. Sitaru C, Mihai S, Zillikens D. The relevance of the IgG subclass of autoantibodies for blister induction in autoimmune bullous skin diseases. *Arch Dermatol Res.* 2007;299(1):1-8. doi:10.1007/s00403-007-0734-0.
 17. Lacroix-Desmazes S, Kaveri S V, Mouthon L, et al. Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. *J Immunol Methods.* 1998;216(1):117-137. doi:https://doi.org/10.1016/S0022-1759(98)00074-X.
 18. antikoerper-online.de. <https://www.antikoerper-online.de/resources/16/1208/antikoerper/>. (letzter Tag des Zugriffs 22.09.2020)
 19. Didona D, Di Zenzo G. Humoral epitope spreading in autoimmune bullous diseases. *Front Immunol.* 2018;9(APR):1-27. doi:10.3389/fimmu.2018.00779.
 20. McRae BL, Vanderlugt CL, Dal Canto MC, Miller SD. Functional evidence for epitope spreading in the relapsing pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 1995;182(1):75-85. doi:10.1084/jem.182.1.75.
 21. Amber KT, Valdebran M, Grando SA. Non-desmoglein antibodies in patients with pemphigus vulgaris. *Front Immunol.* 2018;9. doi:10.3389/fimmu.2018.01190.
 22. Iwata H, Bieber K, Ludwig MH and RJ. Animal Models to Investigate Pathomechanisms and Evaluate Novel Treatments for Autoimmune Bullous Dermatoses. *Curr Pharm Des.* 2015;21(18):2422-2439. doi:http://dx.doi.org/10.2174/1381612821666150316122502.
 23. Hammers, Christoph M.; Stanley JR. Mechanisms of Disease: Pemphigus and Bullous Pemphigoid. 2017:175-197. doi:10.1146/annurev-pathol-012615-044313.Mechanisms.
 24. Altmeyer P, Paech. P. Altmeyer - Enzyklopädie der Dermatologie, Venerologie, Allergologie und Umweltmedizin. <http://www.enzyklopaedie-dermatologie.de> (letzter Tag des Zugriffs 22.09.2020)
 25. Spindler V, Waschke J. Pemphigus-A disease of desmosome dysfunction caused by multiple mechanism. *Front Immunol.* 2018;9:1-8. doi:10.3389/fimmu.2018.00136.

26. Li X, Ishii N, Ohata C, Furumura M, Hashimoto T. Signalling pathways in pemphigus vulgaris. *Exp Dermatol.* 2014;23(3):155-156. doi:10.1111/exd.12317.
27. Saito M, Stahley SN, Caughman CY, et al. Signaling Dependent and Independent Mechanisms in Pemphigus Vulgaris Blister Formation. *PLoS One.* 2012;7(12). doi:10.1371/journal.pone.0050696.
28. Amagai M. Adhesion molecules. I: Keratinocyte-keratinocyte interactions; cadherins and pemphigus. *J Invest Dermatol.* 1995;104(1):146-152. doi:http://dx.doi.org/10.1111/1523-1747.ep12613668.
29. Eyre RW, Stanley JR. Identification of pemphigus vulgaris antigen extracted from normal human epidermis and comparison with pemphigus foliaceus antigen. *J Clin Invest.* 1988;81(3):807-812. doi:10.1172/JCI113387.
30. Tsunoda K, Ota T, Aoki M, et al. Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. *J Immunol.* 2003;170:2170-2178. doi:10.4049/jimmunol.170.4.2170.
31. Amagai M, Karpati S, Prussick R, Klaus-Kovtun V, Stanley JR. Autoantibodies against the amino-terminal cadherin-like binding domain of pemphigus vulgaris antigen are pathogenic. *J Clin Invest.* 1992;90(3):919-926. doi:10.1172/JCI115968.
32. Sekiguchi M, Futei Y, Fujii Y, Iwasaki T, Nishikawa T, Amagai M. Dominant autoimmune epitopes recognized by pemphigus antibodies map to the N-terminal adhesive region of desmogleins. *J Immunol.* 2001;167(9):5439-5448. doi:10.4049/jimmunol.167.9.5439.
33. Sharma P, Mao X, Payne AS. Beyond steric hindrance: The role of adhesion signaling pathways in the pathogenesis of pemphigus. *J Dermatol Sci.* 2007;48(1):1-14. doi:10.1016/j.jdermsci.2007.05.005.
34. Heupel W-M, Zillikens D, Drenckhahn D, Waschke J. Pemphigus vulgaris IgG directly inhibit desmoglein 3-mediated transinteraction. *J Immunol.* 2008;181:1825-1834. doi:181/3/1825 [pii].
35. Yamamoto Y, Aoyama Y, Shu E, Tsunoda K, Amagai M, Kitajima Y. Anti-desmoglein 3 (Dsg3) monoclonal antibodies deplete desmosomes of Dsg3 and differ in their Dsg3-depleting activities related to pathogenicity. *J Biol Chem.* 2007;282:17866-17876. doi:10.1074/jbc.M607963200.

36. Ishii K, Harada R, Amagai M. In Vitro Keratinocyte Dissociation Assay for Evaluation of the Pathogenicity of Anti-Desmoglein 3 IgG Autoantibodies in Pemphigus Vulgaris. 2005.
37. Calkins CC, Setzer S V., Jennings JM, et al. Desmoglein endocytosis and desmosome disassembly are coordinated responses to pemphigus autoantibodies. *J Biol Chem.* 2006;281(11):7623-7634. doi:10.1074/jbc.M512447200.
38. Delva E, Jennings JM, Calkins CC, Kottke MD, Faundez V, Kowalczyk AP. Pemphigus vulgaris IgG-induced desmoglein-3 endocytosis and desmosomal disassembly are mediated by a clathrin- and dynamin-independent mechanism. *J Biol Chem.* 2008;283:18303-18313. doi:10.1074/jbc.M710046200.
39. Kitajima Y. New insights into desmosome regulation and pemphigus blistering as a desmosome-remodeling disease. *Kaohsiung J Med Sci.* 2013. doi:10.1016/j.kjms.2012.08.001.
40. Stahley SN, Warren MF, Feldman RJ, Swerlick RA, Mattheyses AL, Kowalczyk AP. Super-resolution microscopy reveals altered desmosomal protein organization in pemphigus vulgaris patient tissue. *J Invest Dermatol.* 2016;136(1):59-66. doi:10.1038/JID.2015.353.
41. Heupel W-M, Engerer P, Schmidt E, Waschke J. Pemphigus Vulgaris IgG Cause Loss of Desmoglein-Mediated Adhesion and Keratinocyte Dissociation Independent of Epidermal Growth Factor Receptor. *Am J Pathol.* 2009;174(November):475-485. doi:10.2353/ajpath.2009.080392.
42. de Bruin A, Caldelari R, Williamson L, et al. Plakoglobin-dependent disruption of the desmosomal plaque in pemphigus vulgaris. *Exp Dermatol.* 2007;16(6):468-475. doi:10.1111/j.1600-0625.2007.00557.x.
43. Rötzer V, Hartlieb E, Winkler J, et al. Desmoglein 3-Dependent Signaling Regulates Keratinocyte Migration and Wound Healing. *J Invest Dermatol.* 2016;136(1):301-310. doi:10.1038/JID.2015.380.
44. Stahley SN, Saito M, Faundez V, Koval M, Mattheyses AL, Kowalczyk AP. Desmosome assembly and disassembly are membrane raft-dependent. *PLoS One.* 2014;9(1). doi:10.1371/journal.pone.0087809.
45. Jolly PS, Berkowitz P, Bektas M, et al. p38MAPK signaling and desmoglein-3 internalization are linked events in pemphigus acantholysis. *J Biol Chem.*

- 2010;285(12):8936-8941. doi:10.1074/jbc.M109.087999.
46. Spindler V, Dehner C, Hübner S, Waschke J. Plakoglobin but not desmoplakin regulates keratinocyte cohesion via modulation of p38MAPK signaling. *J Invest Dermatol.* 2014;134(6):1655-1664. doi:10.1038/jid.2014.21.
 47. Spindler V, Schmidt E, Waschke J, et al. prevents pemphigus vulgaris autoantibody- induced skin blistering Find the latest version: crosslinking prevents pemphigus vulgaris autoantibody-induced skin blistering. 2013;123(2):800-811. doi:10.1172/JCI60139.800.
 48. Caldelari R, De Bruin A, Baumann D, et al. A central role for the armadillo protein plakoglobin in the autoimmune disease pemphigus vulgaris. *J Cell Biol.* 2001;153(4):823-834. doi:10.1083/jcb.153.4.823.
 49. Berkowitz P, Hu P, Liu Z, et al. Desmosome signaling: Inhibition of p38MAPK prevents pemphigus vulgaris IgG-induced cytoskeleton reorganization. *J Biol Chem.* 2005;280(25):23778-23784. doi:10.1074/jbc.M501365200.
 50. Williamson L, Raess NA, Caldelari R, et al. Pemphigus vulgaris identifies plakoglobin as key suppressor of c-Myc in the skin. *EMBO J.* 2006;25(14):3298-3309. doi:10.1038/sj.emboj.7601224.
 51. Chernyavsky AI, Arredondo J, Kitajima Y, Sato-Nagai M, Grando SA. Desmoglein versus non-desmoglein signaling in pemphigus acantholysis: Characterization of novel signaling pathways downstream of pemphigus vulgaris antigens. *J Biol Chem.* 2007;282(18):13804-13812. doi:10.1074/jbc.M611365200.
 52. Bektas M, Jolly P, Rubenstein DS. Apoptotic pathways in pemphigus. *Dermatol Res Pract.* 2010;2010(1). doi:10.1155/2010/456841.
 53. Luyet C, Schulze K, Sayar BS, Howald D, Müller EJ, Galichet A. Preclinical studies identify non-apoptotic low-level caspase-3 as therapeutic target in pemphigus vulgaris. *PLoS One.* 2015;10(3):1-21. doi:10.1371/journal.pone.0119809.
 54. Lee HE, Berkowitz P, Jolly PS, Diaz LA, Chua MP, Rubenstein DS. Biphasic activation of p38MAPK suggests that apoptosis is a downstream event in pemphigus acantholysis. *J Biol Chem.* 2009;284(18):12524-12532. doi:10.1074/jbc.M808204200.

55. Arredondo J, Chernyavsky AI, Karaouni A, Grando SA. Novel Mechanisms of Target Cell Death and Survival and of Therapeutic Action of IVIg in Pemphigus. 2005;167(6):1531-1544.
56. Janse IC, van der Wier G, Jonkman MF, Pas HH, Diercks GFH. No Evidence of Apoptotic Cells in Pemphigus Acantholysis. *J Invest Dermatol*. 2014;134(7):2039-2041. doi:10.1038/jid.2014.60.
57. Van Der Wier G, Pas HH, Jonkman MF. Experimental human cell and tissue models of pemphigus. *Dermatol Res Pract*. 2010;2010(1). doi:10.1155/2010/143871.
58. Kasperkiewicz M, Ellebrecht CT, Takahasi H, et al. Pemphigus. 2017;48(10):1119-1130. doi:10.1038/ng.3641.
59. Seishima M, Esaki C, Osada K, Mori S, Hashimoto T, Kitajima Y. 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*. 1995;104(1):33-37. doi:10.1111/1523-1747.ep12613469.
60. Esaki C, Seishima M, Yamada T, Osada K, Kitajima Y. 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*. 1995;105(3):329-333. doi:10.1111/1523-1747.ep12319948.
61. Chernyavsky AI, Arredondo J, Piser T, Karlsson E, Grando SA. Differential coupling of M1 muscarinic and $\alpha 7$ nicotinic receptors to inhibition of pemphigus acantholysis. *J Biol Chem*. 2008;283(6):3401-3408. doi:10.1074/jbc.M704956200.
62. Aoyama Y, Owada MK, Kitajima Y. A pathogenic autoantibody, pemphigus vulgaris-IgG, induces phosphorylation of desmoglein 3, and its dissociation from plakoglobin in cultured keratinocytes. *Eur J Immunol*. 1999;29(7):2233-2240. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199907)29:07
63. Berkowitz P, Hu P, Warren S, Liu Z, Diaz LA, Rubenstein DS. p38MAPK inhibition prevents disease in pemphigus vulgaris mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(34):12855-12860. doi:10.1073/pnas.0602973103.
64. Galichet A, Borradori L, Müller EJ. A new light on an old disease: adhesion

- signaling in pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol.* 2014;134:8-10. doi:10.1038/jid.2013.439.
65. Hartlieb E, Rötzer V, Radeva M, Spindler V, Waschke J. 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.* 2014;289(24):17043-17053. doi:10.1074/jbc.M113.489336.
 66. Sayar BS, Rüegg S, Schmidt E, et al. EGFR inhibitors erlotinib and lapatinib ameliorate epidermal blistering in pemphigus vulgaris in a non-linear, V-shaped relationship. *Exp Dermatol.* 2014;23(1):33-38. doi:10.1111/exd.12290.
 67. Mao X, Li H, Sano Y, Gaestel M, Park JM, Payne AS. MAPKAP kinase 2 (MK2)- dependent and independent moels of blister formation in pemphigus vulgaris. 2014;343(6175):1-19. doi:10.1126/science.1246980.Common.
 68. Waschke J, Spindler V, Bruggeman P, Zillikens D, Schmidt G, Drenckhahn D. Inhibition of Rho A activity causes pemphigus skin blistering. *J Cell Biol.* 2006;175(5):721-727. doi:10.1083/jcb.200605125.
 69. Kridin K. Emerging treatment options for the management of pemphigus vulgaris. *Ther Clin Risk Manag.* 2018:757-778. doi:http://dx.doi.org/10.2147/TCRM.S142471.
 70. Feldman RJ, Ahmed AR. Relevance of rituximab therapy in pemphigus vulgaris: analysis of current data and the immunologic basis for its observed responses. *Expert Rev Clin Immunol.* 2011;7(4):529-541. doi:10.1586/eci.11.22.
 71. Wang HH, Liu CW, Li YC, Huang YC. Efficacy of rituximab for pemphigus: A systematic review and meta-analysis of different regimens. *Acta Derm Venereol.* 2015;95(8):928-932. doi:10.2340/00015555-2116.
 72. Fusenig NE. Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized. 1988;106(March):761-771.
 73. Selleckchem. No Title. :www.selleckchem.com. www.selleckchem.com: http://www.selleckchem.com/screening/selective-library.html. (Tag des Zugriffs 07.04.2016)
 74. Mccubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, et al. Roles Of The RAS/MEK/ERK pathway in Cell Growth, Malignant Transformation and Drug Resistance. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2007;1773(8):1263-1284.

- doi:10.1016/j.bbamcr.2006.10.001.ROLES.
75. Hanson K, Robinson SR, Al-Yousuf K, et al. The anti-rheumatic drug, leflunomide, synergizes with MEK inhibition to suppress melanoma growth. *Oncotarget*. 2018;9(3):3815-3829. doi:10.18632/oncotarget.23378.
 76. Yeh TC, Marsh V, Bernat BA, et al. Biological characterization of ARRY-142886 (AZD6244), a potent, highly selective mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor. *Clin Cancer Res*. 2007;13(5):1576-1583. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1150.
 77. Balmanno K, Chell SD, Gillings AS, Hayat S, Cook SJ. Intrinsic resistance to the MEK1/2 inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) is associated with weak ERK1/2 signalling and/or strong PI3K signalling in colorectal cancer cell lines. *Int J Cancer*. 2009. doi:10.1002/ijc.24604.
 78. Bektas M, Jolly PS, Berkowitz P, Amagai M, Rubenstein DS. A pathophysiologic role for epidermal growth factor receptor in pemphigus acantholysis. *J Biol Chem*. 2013;288(13):9447-9456. doi:10.1074/jbc.M112.438010.
 79. Williamson L, Suter MM, Olivry T, Wyder M, Müller EJ. Upregulation of c-Myc may contribute to the pathogenesis of canine pemphigus vulgaris. *Vet Dermatol*. 2007. doi:10.1111/j.1365-3164.2007.00561.x.
 80. Williamson L, Hunziker T, Suter MM, Müller EJ. Nuclear c-Myc: a molecular marker for early stage pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol*. 2007;127(6):1549-1555. doi:10.1038/sj.jid.5700735.
 81. Amagai M, Stanley JR. Desmoglein as a target in skin disease and beyond. *J Invest Dermatol*. 2012;132:776-784. doi:10.1038/jid.2011.390.
 82. Walter E, Vielmuth F, Rotkopf L, et al. Different signaling patterns contribute to loss of keratinocyte cohesion dependent on autoantibody profile in pemphigus. 2017;1-11. doi:10.1038/s41598-017-03697-7.
 83. Spindler V, Endlich A, Hartlieb E, Vielmuth F, Schmidt E, Waschke J. 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*. 2011;179(4):1905-1916. doi:10.1016/j.ajpath.2011.06.043.
 84. Sánchez-Carpintero I, España A, Pelacho B, et al. In vivo blockade of pemphigus vulgaris acantholysis by inhibition of intracellular signal transduction cascades. *Br J Dermatol*. 2004;151:565-570.

- doi:10.1111/j.1365-2133.2004.06147.x.
85. Rötzer V, Hartlieb E, Vielmuth F, Gliem M, Spindler V, Waschke J. E-cadherin and Src associate with extradesmosomal Dsg3 and modulate desmosome assembly and adhesion. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(24):4885-4897. doi:10.1007/s00018-015-1977-0.
 86. Chappell WH, Steelman LS, Long JM, et al. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR Inhibitors: Rationale and Importance to Inhibiting These Pathways in Human Health. *Oncotarget.* 2011;2(3):135-164.
 87. Asati V, Mahapatra DK, Bharti SK. PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives. *Eur J Med Chem.* 2016;109:314-341. doi:https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.01.012.
 88. Pretel, Maider & España, Agustín & Marquina, Miren & Pelacho, Beatriz & María López-Picazo, Jose & López Zabalza M (2009). An imbalance in Akt/mTOR is involved in the apoptotic and acantholytic processes in a mouse model of Pemphigus vulgaris. *Exp Dermatol.* 2009;18:771-780. doi:10.1111/j.1600-0625.2009.00893.x.
 89. España A, Mòdol T, Gil MP, López-Zabalza MJ. Neural nitric oxide synthase participates in pemphigus vulgaris acantholysis through upregulation of Rous sarcoma, mammalian target of rapamycin and focal adhesion kinase. *Exp Dermatol.* 2013;22(2):125-130. doi:10.1111/exd.12088.
 90. Zhang Y, Zhang Z, Liu Y, et al. Requirement of G α i1 / 3 – Gab1 Signaling Complex for Keratinocyte Growth Factor – Induced PI3K – AKT – mTORC1 Activation. 2015. doi:10.1038/jid.2014.326.
 91. Gil MP, Modol T, España A, López-Zabalza MJ. Inhibition of FAK prevents blister formation in the neonatal mouse model of pemphigus vulgaris. *Exp Dermatol.* 2012;21(4):254-259. doi:10.1111/j.1600-0625.2012.01441.x.
 92. Grando SA. Pemphigus autoimmunity: Hypotheses and realities. *Autoimmunity.* 2012;45(1):7-35. doi:10.3109/08916934.2011.606444.
 93. Grando SA, Laquer VT, Le HM. Sirolimus for acute pemphigus vulgaris: a case report and discussion of dualistic action providing for both immunosuppression and keratinocyte protection. *J Am Acad Dermatol.* 2011;65(3):684-686. doi:10.1016/j.jaad.2011.01.029.
 94. Saggari S, Zeichner JA, Brown TT, Phelps RG, Cohen SR. Kaposi's

- sarcoma resolves after sirolimus therapy in a patient with pemphigus vulgaris. *Arch Dermatol.* 2008;144(5):654-657. doi:10.1001/archderm.144.5.654.
95. Ciardiello F, Caputo R, Damiano V, et al. Antitumor effects of ZD6474, a small molecule vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, with additional activity against epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Clin Cancer Res.* 2003;9(4):1546-1556. www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12684431.
 96. Le Roy C, Wrana JL. Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6:112-126. doi:10.1038/nrm1571.
 97. Bendas G. Wachstumsfaktor-Rezeptoren ausschalten. 2016. <https://www.deutsche-apotheker-zeitung.de/daz-az/2016/daz-33-2016/wachstumsfaktor-rezeptoren-ausschalten>. Tag des Zugriffs April 9, 2019.
 98. Boissel J-P, Ohly D, Bros M, Gödtel-Armbrust U, Förstermann U, Frank S. The neuronal nitric oxide synthase is upregulated in mouse skin repair and in response to epidermal growth factor in human HaCaT keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2004;123(1):132-139. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.22731.x.
 99. Criscitiello C, Esposito A, Curigliano G. Targeting FGFR pathway in breast cancer. *Breast Cancer Innov Res Manag.* 2017;37:819-822. doi:10.1007/978-3-319-48848-6_70.
 100. Kelly CM, Shoushtari AN, Qin L-X, et al. A phase Ib study of BGJ398, a pan-FGFR kinase inhibitor in combination with imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumor. *Invest New Drugs.* 2019;37(2):282-290. doi:10.1007/s10637-018-0648-z.
 101. Roblin D, Yosipovitch G, Boyce B, et al. Topical TrkA kinase inhibitor CT327 is an effective, novel therapy for the treatment of pruritus due to psoriasis: Results from experimental studies, and efficacy and safety of CT327 in a phase 2b clinical trial in patients with psoriasis. *Acta Derm Venereol.* 2015;95(5):542-548. doi:10.2340/00015555-2047.
 102. Howe CL, Valletta JS, Rusnak AS, Mobley WC. NGF Signaling from Clathrin-Coated Vesicles: Evidence that Signaling Endosomes Serve as a

- Platform for the Ras-MAPK Pathway and others (Ehlers et al have tested the third model, i.e. *Neuron*. 2001;32:801-814. <https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0896-6273%2801%2900526-8>.
103. Cirillo N, Gombos F, Ruocco V, Lanza A. Searching for experimental models of Pemphigus vulgaris. *Arch Dermatol Res*. 2007;299(1):9-12. doi:10.1007/s00403-007-0733-1.
 104. Mao X, Choi EJ, Payne AS. Disruption of desmosome assembly by monovalent human pemphigus vulgaris monoclonal antibodies. *J Invest Dermatol*. 2009;129:908-918. doi:10.1038/jid.2008.339.
 105. Aoyama Y, Nagai M, Kitajima Y. Binding of pemphigus vulgaris IgG to antigens in desmosome core domains excludes immune complexes rather than directly splitting desmosomes. *Br J Dermatol*. 2010;162:1049-1055. doi:10.1111/j.1365-2133.2010.09672.x.
 106. Tsunoda K, Ota T, Saito M, et al. Pathogenic relevance of IgG and IgM antibodies against desmoglein 3 in blister formation in pemphigus vulgaris. *Am J Pathol*. 2011;179(2):795-806. doi:10.1016/j.ajpath.2011.04.015.
 107. Burmester IAK, Emtenani S, Johns J-G, Ludwig RJ, Hammers CM, Hundt JE. Translational Use of a Standardized Full Human Skin Organ Culture Model in Autoimmune Blistering Diseases. *Curr Protoc Pharmacol*. 2019:e56. doi:10.1002/cpph.56.
 108. Pollmann R, Eming R. Research Techniques Made Simple: Mouse Models of Autoimmune Blistering Diseases. *J Invest Dermatol*. 2017;137(1):e1-e6. doi:10.1016/j.jid.2016.11.003.
 109. Amagai M, Tsunoda K, Suzuki H, Nishifuji K, Koyasu S, Nishikawa T. Use of autoantigen-knockout mice in developing an active autoimmune disease model for pemphigus. *J Clin Invest*. 2000;105(5):625-631. doi:10.1172/JCI8748.

8 Danksagung

Zum Abschluss dieser Arbeit möchte ich ganz besonders meiner Doktormutter Prof. Dr. Jennifer Hundt für die zuverlässige und herzliche Betreuung danken. Sie hat mir mit ihrer fachlichen Kompetenz, ihrem strukturierten Arbeiten, aber vor allem mit ihrer guten Laune, sowie netten und effizienten Abenden immer wieder zur Seite gestanden, die Motivation hochgehalten und den Glauben an das Projekt und mich nicht aufgegeben.

Ebenso möchte ich dem Leiter der Forschungsgruppe Prof. Dr. Ralf Ludwig für die Koordination, das Bereitstellen der Dissertation, einen immer optimistischen Spruch und den regen Austausch danken.

Der Dank gilt natürlich Prof. Dr. Dr. Enno Schmidt, als Leiter des LIED, Prof. Dr. Detlef Zillikens, als Chefarzt der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie und dem Vorstand des Graduiertenkollegs 1727, ohne dessen Unterstützung die Umsetzung dieses Projektes nicht möglich gewesen wäre.

Für die nette Zusammenarbeit und fachliche Unterstützung im Labor, für ein immer offenes Ohr und gemeinsame Stunden an der Zellkulturbank möchte ich meinem Betreuer Dr. Hiroshi Koga danken, sowie Fanny Weiß, Sören Dräger, Mikko Armbrust, Vanessa Krull und Claudia Kauderer.

Für eine nette und sehr bereichernde Zeit möchte ich ebenfalls Dr. Henri Pas und seinen Mitarbeitern der Dermatologie des *University Medical Center* Groningen danken.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Patienten bedanken, die durch das Zustimmen zum Spenden des Immunapheresematerials einen entscheidenden Beitrag zur Verbesserung und Weiterentwicklung der Therapie des Pemphigus vulgaris geleistet haben und für deren Verbesserung der Lebensqualität sich die Forschungsarbeit lohnt.

Meinen Freunden möchte ich danken für die geopferten Urlaubsstunden, den Solarstrom, die Geduld, die Unterstützung, den Ansporn, die Anerkennung und viele wunderbare Kaffeeunterbrechungen und Weinabende.

Nicht zuletzt gilt mein Dank natürlich meinem Ehemann Julius Dehoust, der mich moralisch stets unterstützt, nicht aufhört an mich zu glauben und mich angespornt hat, wenn es an Motivation mangelte.

Abschließend möchte ich meiner Familie danken, die bei allem was ich anstrebe immer hinter mir steht, mir den Rückhalt gibt für alles, was ich mir vornehme und ohne die die Verwirklichung dieses Projektes nicht möglich gewesen wäre.

9 Curriculum vitae



Persönliche Daten

Name: Sarah Dehoust geb. Flaswinkel
Adresse: Emilienstraße 36, 20259 Hamburg
Geburtsdatum und –ort: 19.05.1992, Münster (Westfalen)
Staatsangehörigkeit: deutsch

Beruflicher Werdegang

10/2018 - 04/2020 Assistenzärztin für Gynäkologie
und Geburtshilfe an der
Asklepios Klinik Standort Barmbek
und Heidberg, Hamburg

seit 04/2020 Assistenzärztin für Gynäkologie
und Geburtshilfe an der
Paracelsusklinik Henstedt-Ulzburg

Ausbildung

2002 – 07/2011 Bischöfliches Mädchengymnasium
Marienschule Münster

Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife mit
zweisprachig deutsch-englischem
Abiturvermerk

10/2011 – 06/2018 Medizinstudium an der Universität zu
Lübeck

10/2013	1. Staatsexamen (Physikum) an der Universität zu Lübeck
04/2017	2. Staatsexamen an der Universität zu Lübeck
06/2018	3. Staatsexamen an der Universität zu Lübeck

Wissenschaftliche Projekte

10/2014 – 03/2015	Forschungssemester als Stipendiatin der deutschen Forschungsgesellschaft des Graduiertenkollegs 1727 „Modulation von Autoimmunität“ der Dermatologie Uniklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
10/2014 – 11/2021	Promotion am Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie (LIED) zum umfassenden Verständnis der Signaltransduktion bei Pemphigus vulgaris
06/2015	Posterpräsentation bei „Uni im Dialog“ dem Lübecker Doktorandentag
08/2015	Forschungsaufenthalt in dem dermatologischen Labor von Dr. H.H. Pas am <i>University Medical Center</i> Groningen, Niederlande
08/2020	Publikation: <i>"Identification of novel therapeutic targets for blocking acantholysis in pemphigus"</i> im <i>British Journal of Pharmacology</i> als geteilte Erstautorin

Praktisches Jahr

05/2017 – 09/2017	1. Terial des Praktischen Jahres in der Gynäkologie und Geburtshilfe der Regio Klinik Pinneberg
09/2017 – 10/2017	1. Hälfte des 2. Terials des Praktischen Jahres in der Inneren Medizin am Westküstenklinikum Heide

11/2017 – 12/2017

2. Hälfte des 2. Tertials des Praktischen Jahres in der Inneren Medizin am *Taranaki Base Hospital* New Plymouth, Neuseeland

01/2018 – 04/2018

3. Tertial des Praktischen Jahres in der Unfallchirurgie und septischen Chirurgie am Berufgenossenschaftlichen Klinikum Boberg, Hamburg

Studentisches Engagement

11/2012 – 07/2013

Tutorin für Anatomie im Rahmen des Präparierkurses am Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck

07/2013 – 04/2014

Studentische Hilfskraft in der Poliklinik für Rheumatologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

04/2015 – 10/2015

Studentische Hilfskraft am Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie (LIED)

Nebenjobs

05/2014 – 04/2015

Nachtwache im Schlafmedizinzentrum Lübeck

12/2016 – 05/2017

Studentische Hilfskraft in der kardiologischen Praxis Dr. Markworth, Hamburg

Fremdsprachen

Deutsch

Muttersprache

Englisch

Fließend

Spanisch

Erweiterte Grundkenntnisse

10 Anhang

Tabelle 4 Details zur *Target Selective Inhibitory Library* von Selleckchem

Target Selective Inhibitory Library von Selleckchem			
Substanz	Nr.	Zielstruktur	Beschreibung
AZD6244 (Selumetinib)	A1	MEK1	AZD6244 (Selumetinib, ARRY-142886) is highly potent to inhibit MEK1 with IC50 of 14 nM.
Bortezomib (Velcade)	A2	20S proteasome	Bortezomib is a potent 20S proteasome inhibitor with Ki of 0.6 nM.
Lenalidomide (Revlimid)	A3	TNF- α	Lenalidomide (Revlimid, CC-5013) is a TNF- α secretion inhibitor with IC50 of 13 nM.
Nilotinib (AMN-107)	A4	Bcr-Abl	Nilotinib (AMN-107, Tasisign) is a Bcr-Abl inhibitor with IC50 less than 30 nM.
Rapamycin (Sirolimus)	A5	mTOR	Rapamycin (Sirolimus, AY-22989, WY-090217) is a specific mTOR inhibitor with IC50 of ~0.1 nM.
Vandetanib (Zactima)	A6	VEGFR2	Vandetanib (Zactima, ZD6474) is a potent inhibitor of VEGFR2 with IC50 of 40 nM.
Y-27632 2HCl	A7	ROCK1	Y-27632 2HCl is a selective ROCK1 (p160ROCK) inhibitor with Ki of 140 nM.
Enzastaurin (LY317615)	A8	PKC β	Enzastaurin (LY317615) is a potent PKC inhibitor for PKC β , PKC α , PKC γ and PKC ϵ with IC50 of 6 nM, 39 nM, 83 nM and 110 nM, respectively.
Nutlin-3	A9	MDM2	Nutlin-3 is a potent and selective Mdm2 (RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53) antagonist with IC50 of 90 nM.
PHA-665752	A10	c-Met	PHA-665752 is a potent, selective and ATP-competitive c-Met inhibitor with IC50 of 9 nM.
SB 216763	A11	GSK-3 α	SB 216763 is a potent and selective GSK-3 α inhibitor with IC50 of 34.3 nM.
MK-2206 2HCl	B1	Akt	MK-2206 2HCl is a highly selective inhibitor of Akt1, Akt2 and Akt3 with IC50 of 8 nM, 12 nM and 65 nM,

			respectively.
PD153035 HCl	B2	EGFR	PD153035 is a potent and specific inhibitor of EGFR with K_i and IC_{50} of 5.2 pM and 29 pM, respectively.
Vismodegib (GDC-0449)	B3	hedgehog	GDC-0449 (Vismodegib, HhAntag691) is a potent, novel and specific hedgehog inhibitor with IC_{50} of 3 nM and also inhibits P-gp with IC_{50} of 3.0 μ M.
Iniparib (BSI-201)	B4	PARP1	BSI-201 (Iniparib, SAR240550) is a PARP1 inhibitor.
Linsitinib (OSI-906)	B5	IGF-1R	OSI-906 (Linsitinib) is a selective inhibitor of IGF-1R and IR with IC_{50} of 35 nM and 75 nM, respectively.
Varespladib (LY315920)	B6	PLA	LY315920 (Varespladib) is a potent and selective secretory phospholipase A2 (sPLA) inhibitor with IC_{50} of 7 nM.
Odanacatib (MK 0822)	B7	Cathepsin K	Odanacatib (MK 0822) is a potent, selective, and neutral inhibitor of human and rabbit cathepsin K with IC_{50} of 0.2 nM and 1 nM, respectively.
Abiraterone (CB-7598)	B8	CYP17	Abiraterone (CB-7598) is a potent CYP17 inhibitor with IC_{50} of 2 nM.
YM155	B9	Survivin	YM155 is a potent IAP (inhibitor of apoptosis protein via E3 ubiquitin ligase) inhibitor for survivin with IC_{50} of 0.54 nM.
MLN8237 (Alisertib)	B10	Aurora A	MLN8237 (Alisertib) is a selective Aurora A inhibitor with IC_{50} of 1.2 nM.
ADL5859 HCl	B11	δ -opioid receptor	ADL5859 HCl is a δ -opioid receptor agonist with K_i of 0.8 nM.
17-AAG (Tanespimycin)	C1	HSP 90	17-AAG (Tanespimycin) is a potent HSP90 inhibitor with IC_{50} of 5 nM.
Barasertib (AZD1152-HQPA)	C2	Aurora B	AZD1152-HQPA (Barasertib) is a highly selective Aurora B inhibitor with IC_{50} of 0.37 nM.
MK-8245	C3	SCD	MK-8245 is an inhibitor of stearoyl-CoA desaturase (SCD) which targets the liver with IC_{50} of 1 nM for human SCD1 and 3 nM for both rat SCD1 and mouse SCD1.

ABT-751	C4	β -tubulin	ABT-751 (E7010) binds to the colchicine site on β -tubulin and inhibits polymerization of microtubules.
TGX-221	C5	p110 β	TGX-221 is a potent, selective PI3K inhibitor for p110 β with IC50 of 8.5 nM.
XAV-939	C6	Wnt/ β -catenin	XAV-939 is a selective Wnt β -catenin-mediated transcription inhibitor for TNKS1 and TNKS2 with IC50 of 11 nM and 4 nM, respectively.
BIBR 1532	C7	Telomerase	BIBR 1532 is a potent and selective telomerase inhibitor with IC50 of 100 nM.
Fulvestrant (Faslodex)	C8	ER	Fulvestrant is an estrogen receptor (ER) antagonist with IC50 of 0.094 nM.
Decitabine	C9	DNA Methyltransferase	Decitabine is a potent inhibitor of DNA methylation with IC50 of 438 nM and 4.38 nM in HL-60 and KG1a cells, respectively.
Dutasteride	C10	5-alpha Reductase	Dutasteride is a 5-alpha-reductase inhibitor
Doxorubicin (Adriamycin)	C11	Topo II	Doxorubicin (Adriamycin) is an antibiotic agent that inhibits DNA topoisomerase II and induces DNA damage and apoptosis.
PFI-1	D1	BRD4	PFI-1 is a selective BET (bromodomain-containing protein) inhibitor for BRD4 with IC50 of 0.22 μ M.
Topotecan HCl	D2	Topo I	Topotecan (Hycamtin, NSC 609699) is a topoisomerase I inhibitor for MCF-7 Luc cells and DU-145 Luc cells with IC50 of 13 nM and 2 nM, respectively.
2-Methoxyestradiol	D3	HIF-1 α	2-Methoxyestradiol is a tubulin polymerization inhibitor and also decreases HIF-1 activity.
Letrozole	D4	Aromatase	Letrozole is a third generation inhibitor of aromatase with IC50 of 0.07-20 nM.
MDV3100	D5	AR	MDV3100 is an androgen-receptor

(Enzalutamide)			(AR) antagonist with IC50 of 36 nM.
Ramelteon (TAK-375)	D6	MT Receptor	Ramelteon (TAK-375) is a novel melatonin receptor agonist for human MT1 and MT2 receptors and chick forebrain melatonin receptors with Ki of 14 pM, 112 pM and 23.1 pM, respectively.
Celecoxib	D7	COX-2	Celecoxib is a selective COX-2 inhibitor with IC50 of 40 nM.
IC-87114	D8	p110δ	IC-87114 is a selective inhibitor of PI3Kδ with IC50 of 0.5 μM.
BX-795	D9	PDK-1	BX795 is a potent and specific TBK1, IKKε and PDK-1 inhibitor with IC50 of 6 nM, 41 nM and 111 nM, respectively.
Doxazosin mesylate	D10	α1	Doxazosin mesylate is an alpha-1 adrenergic receptor blocker.
Etomidate	D11	GABAA receptor	Etomidate is a GABAA receptors agonist at GABAA receptors.
Rigosertib (ON-01910)	E1	PLK-1	Rigosertib (Estybon, Novonex, ON-01910) is a non-ATP-competitive inhibitor of PLK1 (Polo-like kinase 1) with IC50 of 9 nM.
AS-605240	E2	p110γ	AS-605240 is a novel, potent and selective PI3Kγ inhibitor with IC50 of 8 nM.
Tipifarnib (Zarnestra)	E3	FTase	Tipifarnib (Zarnestra, R115777) is a potent and specific farnesyltransferase (FTase) inhibitor with IC50 of 0.6 nM.
Zibotentan (ZD4054)	E4	ETA	Zibotentan (ZD4054) is a specific Endothelin A (ETA) antagonist with IC50 of 21 nM.
SP600125	E5	JNK	SP600125 is a broad-spectrum JNK inhibitor for JNK1, JNK2 and JNK3 with IC50 of 40 nM, 40 nM and 90 nM, respectively.
SB 525334	E6	ALK5	SB 525334 is a potent and selective inhibitor of TGF-β1 (ALK5) with IC50 of 14.3 nM.
Fludarabine (Fludara)	E7	STAT1	Fludarabine (Fludara, F-ara-A, NSC 118218) is a STAT1 activation inhibitor and a DNA synthesis inhibitor.

NVP-BEP800	E8	HSP90 β	NVP-BEP800 is a novel, fully synthetic HSP90 β inhibitor with IC50 of 58 nM.
Tadalafil (Cialis)	E9	PDE5	Tadalafil is a PDE-5 inhibitor with IC50 of 1.8 nM.
MK-1775	E10	Wee1	MK-1775 is a potent and selective Wee1 inhibitor with IC50 of 5.2 nM.
Quizartinib (AC220)	E11	FLT3	AC220 (Quizartinib) is a potent and selective inhibitor of Flt3ITD and Fltwt with IC50 of 1.1 nM and 4.2 nM, respectively.
BIX 02189	F1	MEK5	BIX02189 is a selective inhibitor of MEK5 with IC50 of 1.5 nM.
CP 673451	F2	PDGFR	CP 673451 is a potent PDGFR- β inhibitor with an IC50 of 1 nM.
EX 527	F3	SIRT1	EX 527 is a potent and selective SIRT1 inhibitor with IC50 of 38 nM.
AM-1241	F4	CB2	AM-1241 is a selective CB2 agonist with Ki of 3.4 nM.
Dapagliflozin	F5	hSGLT2	Dapagliflozin is a potent and selective hSGLT2 inhibitor with EC50 of 1.1 nM.
Nebivolol (Bystolic)	F6	β 1	Nebivolol selectively inhibits β 1-adrenoceptor with IC50 of 0.8 nM.
Pimobendan (Vetmedin)	F7	PDE3	Pimobendan is a selective inhibitor of PDE3 with IC50 of 0.32 μ M.
KU-60019	F8	ATM	KU-60019 is a potent and specific ATM inhibitor with IC50 of 6.3 nM.
BS-181 HCl	F9	CDK5	BS-181 is a highly selective CDK inhibitor for CDK7 with IC50 of 21 nM.
BIRB 796 (Doramapimod)	F10	p38 α MAPK	BIRB 796 (Doramapimod) is a highly selective p38 α MAPK inhibitor with Kd of 0.1 nM.
Tie2 kinase inhibitor	F11	Tie-2	Tie2 kinase inhibitor is a potent and selective Tie2 inhibitor with IC50 of 0.25 μ M.
Candesartan (Atacand)	G1	angiotensin II receptor	Candesartan is an angiotensin II receptor antagonist with IC50 of 0.26 nM.

H 89 2HCl	G2	PKA	H 89 2HCl is a mutiple-targeted inhibitor for S6K1, MSK1, PKA, ROCKII, PKB α and MAPKAP-K1b with IC50 of 80 nM, 120 nM, 135 nM, 270 nM, 2600 nM and 2800 nM, respectively.
Allopurinol (Zyloprim)	G3	xanthine oxidase	Allopurinol (Zyloprim) is a xanthine oxidase inhibitor with an IC50 of 7.82 \pm 0.12 μ M.
Enalaprilat dihydrate	G4	ACE	Enalaprilat is an angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor with IC50 of 1.94 nM.
Ranitidine (Zantac)	G5	Histamine H2-receptor	Ranitidine (Zantac) is a histamine H2-receptor antagonist with IC50 of 3.3 \pm 1.4 μ M.
Clemastine Fumarate	G6	Histamine H1-receptor	Clemastine Fumarate (Clemastine) is a selective histamine H1 receptor antagonist with IC50 of 3 nM.
PCI-34051	G7	HDAC8	PCI-34051 is a potent and specific HDAC8 inhibitor with IC50 of 10 nM.
PF 573228	G8	FAK	PF 573228 is a inhibitor of FAK with IC50 of 4 nM.
Roflumilast (Daxas)	G9	PDE4	Roflumilast (Daxas) is a selective inhibitor of PDE4 with IC50 of 0.2-4.3 nM.
GSK1292263	G10	GPR119	GSK-1292263 is a novel GPR119 agonist.
PF-4708671	G11	S6K1	PF-4708671 is a cell-permeable inhibitor of p70 ribosomal S6 kinase (S6K1 isoform) with Ki of 20 nM and IC50 of 160 nM.
Rosuvastatin calcium (Crestor)	H1	HMG-CoA reductase	Rosuvastatin calcium is an competitive inhibitor of HMG-CoA reductase with IC50 of 11 nM.
SB 743921	H2	kinesin spindle protein	SB 743921 is a KSP inhibitor with IC50 of 0.2 nM, 0.07 nM, 1.7 nM, 0.06 nM and 14.4 nM in SKOV3, Colo205, MV522, MX1 and P388 cell lines, respectively.
BGJ398 (NVP-BGJ398)	H3	FGFR	BGJ398 (NVP-BGJ398) is a potent and selective inhibitor of FGFR1, FGFR2 and FGFR3 with IC50 of 0.9 nM, 1.4 nM and 1 nM,

			respectively.
Aliskiren hemifumarate	H4	renin	Aliskiren hemifumarate is a direct renin inhibitor with IC ₅₀ of 1.5 nM.
DAPT (GSI-IX)	H5	γ-secretase	DAPT (GSI-IX) is a novel γ-secretase inhibitor, which inhibits Aβ production with IC ₅₀ of 20 nM in HEK 293 cells.
Mubritinib (TAK 165)	H6	Her2	Mubritinib (TAK 165) is a potent inhibitor of ErbB2 with IC ₅₀ of 6 nM.
SB590885	H7	b-Raf	SB590885 is a potent B-Raf inhibitor with Ki of 0.16 nM.
PF 3716556	H8	P-CAB	PF 3716556 is a potent and selective P-CAB (potassium-competitive acid blocker), with pIC ₅₀ of 6.026 and 7.095 for the inhibition of porcine H ⁺ /K ⁺ , ATPase activity in ion-leaky and ion-tight assay, respectively, inhibits gastric acid secretion, displays no activity at Na ⁺ /K ⁺ -ATPase.
TAME	H9	APC	Tosyl-L-Arginine Methyl Ester (TAME) is an APC inhibitor and also inhibits an E3 ubiquitin ligase called "anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C)".
Ketanserin (Vulketan Gel)	H10	HTR2	Ketanserin (Vulketan Gel) is specific 5-HT _{2A} serotonin receptor antagonist with a Ki of 2.5 nM for rat and human 5-HT _{2A} .
Clozapine (Clozaril)	H11	HTR1	Clozapine (Clozaril) is a potent 5-HT _{1C} receptor antagonist with an IC ₅₀ of 110 nM for 5-HT-stimulated phosphoinositide hydrolysis.
Donepezil HCl (Aricept)	I1	AChE	Donepezil is a specific and potent AChE inhibitor for bAChE and hAChE with IC ₅₀ of 8.12 nM and 11.6 nM, respectively.
Pancuronium (Pavulon)	I2	nAChR	Pancuronium (Pavulon) is a competitive acetylcholine antagonist with an IC ₅₀ of 5.5 μM to 0.5 nM
Salbutamol sulfate	I3	β ₂	Salbutamol (Albuterol) is a short-acting β ₂ -adrenergic receptor

(Albuterol)			agonist with an IC ₅₀ of 8.93 μM.
Xylazine HCl	I4	α ₂	Xylazine HCl is α ₂ class of adrenergic receptor agonist.
Tolterodine tartrate (Detrol LA)	I5	mAChR	Tolterodine tartrate (Detrol LA) is a tartrate salt of tolterodine that is a competitive muscarinic receptor antagonist.
Tolvaptan (OPC-41061)	I6	vasopressin receptor 2	Tolvaptan (OPC-41061) is a selective, competitive arginine vasopressin receptor 2 antagonist with an IC ₅₀ of 1.28 μM for the inhibition of AVP-induced platelet aggregation.
URB597	I7	FAAH	URB597 (KDS-4103) is a potent FAAH inhibitor with IC ₅₀ of 4.6 nM.
BMS-806 (BMS 378806)	I8	gp120	BMS-806 (BMS 378806) selectively inhibits the binding of HIV-1 gp120 to the CD4 receptor with EC ₅₀ of 0.85-26.5 nM in virus.
A66	I9	p110α	A66 is a potent and specific p110α inhibitor with IC ₅₀ of 32 nM.
TAK-875	I10	GPR40	TAK-875 is a selective GPR40 agonist with EC ₅₀ of 14 nM.
NU7441 (KU-57788)	I11	DNA-PK	NU7441 is a highly potent and selective DNA-PK inhibitor with IC ₅₀ of 14 nM and also inhibits PI3K with IC ₅₀ of 5 μM.
CHIR-124	J1	Chk1	CHIR-124 is a novel and potent Chk1 inhibitor with IC ₅₀ of 0.3 nM.
ADX-47273	J2	mGlu5	ADX47273 is a potent and specific mGlu5 antagonist with IC ₅₀ of 0.17 μM.
KX2-391	J3	Src	KX2-391 (KX01) is a highly selective non ATP-competitive Src inhibitor with GI ₅₀ of 9-60 nM in cancer cell lines.
ZM 336372	J4	c-Raf	ZM 336372 is a potent and selective c-Raf inhibitor with IC ₅₀ of 70 nM.
JTC-801	J5	ORL1	JTC-801 is a selective opioid receptor-like1 (ORL1) receptor antagonist with IC ₅₀ of 94 nM.
AZ 3146	J6	Mps1	AZ3146 is a selective Mps1 inhibitor with IC ₅₀ of ~35 nM.

PAC-1	J7	Caspase-3	PAC-1 is a potent procaspase-3 activator with EC50 of 0.22 μ M.
CH5424802	J8	ALK	CH5424802 is a potent and selective ALK inhibitor with IC50 of 1.9 nM.
Tofacitinib (CP-690550, Tasocitinib)	J9	JAK3	CP-690550 is a novel inhibitor of JAK3 with IC50 of 1 nM.
APO866 (FK866)	J10	NMPRTase	APO866 effectively inhibits NAMPT with IC50 of 0.09 nM.
CEP33779	J11	JAK2	CEP33779 is a selective JAK2 inhibitor with IC50 of 1.8 nM.
CI994 (Tacedinaline)	K1	HDAC1	CI994 (Tacedinaline) is an anti-cancer drug which inhibits HDAC1 with IC50 of 0.57 μ M.
Tideglusib	K2	GSK-3 β	Tideglusib (NP031112, NP-12) is a potent non ATP-competitive inhibitor of GSK3 with IC50 of 60 nM.
TPCA-1	K3	IKK2	TPCA-1 is an inhibitor of IKK-2 with IC50 of 17.9 nM.
Dizocilpine (MK 801)	K4	NMDA	Dizocilpine is a potent N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist with Ki of 30.5 nM.
ML130	K5	NOD1	ML130 is a potent and selective inhibitor of NOD1 with IC50 of 0.56 μ M.
GW441756	K6	TrkA	GW 441756 is a potent, selective inhibitor of TrkA with IC50 of 2 nM.
WZ 811	K7	CXCR4	WZ811 is a highly potent competitive CXCR4 antagonist with EC50 of 0.3 nM.
GW9662	K8	PPAR γ	GW9662 is a selective PPAR antagonist, inhibiting PPAR γ , PPAR α and PPAR δ with IC50 of 3.3 nM, 32 nM and 2 μ M, respectively.
Evacetrapib (LY2484595)	K9	CETP	LY2484595 is a potent and selective inhibitor of CETP with IC50 of 5.5 nM.
Pifithrin-α	K10	p53	Pifithrin- α is an inhibitor of p53, inhibiting p53-dependent transactivation of p53-responsive genes.

Rimonabant (SR141716)	K11	CB1	Rimonabant is a selective antagonist of CB1 with IC50 of 13.6 nM and EC50 of 17.3 nM in hCB1 transfected HEK 293 membrane.
Entacapone	L1	COMT	Entacapone inhibits catechol-O-methyltransferase(COMT) with IC50 of 151 nM.
Sitagliptin phosphate monohydrate	L2	DPP-4	Sitagliptin phosphate (MK-0431) is a potent inhibitor of DPP-IV with IC50 of 19 nM in Caco-2 cell extracts.
Mirabegron (YM178)	L3	β 3	Mirabegron is a selective β 3-adrenoceptor agonist with EC50 of 22.4 nM.
Sodium 4-Aminosalicylate	L4	NF- κ B	Sodium 4-Aminosalicylate is an antibiotic used to treat tuberculosis via NF- κ B inhibition and free radical scavenging.
PTC124 (Ataluren)	L5	CFTR	PTC124 (Ataluren) is a potent nonsense mutation inhibitor with EC50 of \sim 0.1 μ M.
Birinapant (TL32711)	L6	clAP1	Birinapant (TL32711) is a SMAC mimetic antagonist, mostly to clAP1 with Kd of <1 nM, less potent to XIAP. Phase 1/2.
Stattic	L7	STAT3	Stattic inhibits STAT3 with IC50 of 5.1 μ M.
SANT-1	L8	Smoothened	SANT-1 directly binds to Smoothened (Smo) receptor with Kd of 1.2 nM and inhibits Smo agonist effects with IC50 of 20 nM.
IPA-3	L9	Pak1	IPA-3 is a selective non-ATP competitive Pak1 inhibitor with IC50 of 2.5 μ M, no inhibition to group II PAKs (PAKs 4-6).
NLG919	L10	IDO	NLG919 is a potent IDO (indoleamine-(2,3)-dioxygenase) pathway inhibitor with Ki/EC50 of 7 nM/75 nM.
TCID	L11	DUB	TCID is a DUB inhibitor for ubiquitin C-terminal hydrolase L3 with IC50 of 0.6 μ M, 125-fold selective to L1.
10058-F4	M1	c-Myc	10058-F4 is a c-Myc inhibitor that specifically inhibits the c-Myc-Max

			interaction and prevents transactivation of c-Myc target gene expression.
SMI-4a	M2	Pim1	SMI-4a is a potent inhibitor of Pim1 with IC50 of 17 nM.
RGD (Arg-Gly-Asp) Peptides	M3	Integrin	RGD (Arg-Gly-Asp) Peptides is a cell adhesion motif which can mimic cell adhesion proteins and bind to integrins.
Tariquidar	M4	P-gp	Tariquidar (XR9576) is a potent and selective noncompetitive inhibitor of P-glycoprotein with Kd of 5.1 nM.
NSC 23766	M5	Rac	NSC 23766 is an inhibitor of Rac GTPase targeting Rac activation by guanine nucleotide exchange factors (GEFs) with IC50 of about 50 μ M.
PRT062607 (P505-15, PRT2607, BIIB057) HCl	M6	Syk	Syk
UPF 1069	M7	PARP2	UPF 1069 is a selective PARP2 inhibitor with IC50 of 0.3 μ M.
GW2580	M8	CSF-1R	GW2580 is a selective inhibitor of human c-FMS with IC50 of 30 nM.
ABT-199 (GDC-0199)	M9	Bcl-2	ABT-199 is a Bcl-2-selective inhibitor with Ki of < 0.010 nM.

Tabelle 5 Details zu dem verwendeten Pemphigus vulgaris Immunapharesematerial. Abkürzungen: Antikörper (Ak), Desmoglein (Dsg), Geburtsdatum (Geb. Datum), Nummer (Nr.), Pemphigus vulgaris (PV)

PV Nr.	PV Nr. Vorat	Geschlecht	Geb. Datum	Dsg-1 Ak Titer	Dsg-3 Ak Titer	Entnahmedatum	Alter
PV-1	PV 19.2	männlich	11.07.70	164	17180	13.03.13	44
PV-2	PV 16.3	männlich	18.12.48	684	9245	05.03.13	66
PV-3	PV 23.3	weiblich	07.02.42	1307	7550	11.07.14	72
PV-4	PV 29.2	männlich	10.08.81	113	15537	04.11.14	33
PV-5	PV 30.1	männlich	12.02.58	80	11561	25.11.14	56
PV-6	PV 31.1	weiblich	15.09.67	34	2803	09.12.14	47
PV-7	PV 10.1	weiblich	01.08.71	33	33	11.05.10	43

Tabelle 6 Subjektiver Grad der Internalisierung, verglichen mit der Intensität der Fluoreszenz
 0= keine Desmoglein-3 (Dsg-3) Internalisierung, 1= geringe Dsg-3 Internalisierung, 2= mäßige Dsg-3 Internalisierung, 3= starke Dsg-3 Internalisierung; Abkürzungen: Normales humanes Serum (NHS), nicht angewendet (n.a.), Pemphigus vulgaris Serum (PV)

Substanz	Substanz + PV-1	PV-1 ohne Substanz	Substanz + PV-2	PV-2 ohne Substanz	NHS
A1 10 µM	2	3	1	1	0
A1 0,1 µM	2	3	1	1	0
A5 10 µM	2	3	2	1	0
A5 0,1 µM	2	3	1	1	0
A6 10 µM	1	3	0	1	0
A6 0,1 µM	2	3	1	1	0
A8 10 µM	3	3	2	1	0
A8 0,1 µM	3	3	1	1	0
A10 10 µM	3	3	0	1	0
A10 0,1 µM	3	3	1	1	0
A11 10 µM	2	3	1	2	0
A11 0,1 µM	2	3	1	2	0
B4 10 µM	2	3	2	2	0-1
B4 0,1 µM	1	3	1	2	0-1
B5 10 µM	2	3	1	2	0-1
B5 0,1 µM	2	3	2	2	0-1
B6 10 µM	2	3	2	2	0-1
B6 0,1 µM	2	3	2	2	0-1
C5 10 µM	3	3	1	1	0
C5 0,1 µM	3	3	1	1	0
D9 10 µM	1	3	1	3	0
D9 0,1 µM	2	3	2	3	0
E1 10 µM	2	3	3	3	0

E1 0,1 µM	3	3	3	3	0
E6 10 µM	3	3	3	3	0
E6 0,1 µM	2	3	3	3	0
E11 10 µM	n.a.	3	1	1	0
E11 0,1 µM	n.a.	3	1	1	0
F10 10 µM	n.a.	3	2	1	0
F10 0,1 µM	n.a.	3	0	1	0
G3 10 µM	n.a.	3	1	1	0
G3 0,1 µM	n.a.	3	1	1	0
G7 10 µM	2	3	1	2	0
G7 0,1 µM	3	3	2	2	0
H3 10 µM	3	3	0	2	0
H3 0,1 µM	3	3	0	2	0
H4 10 µM	2	3	2	2	0
H4 0,1 µM	2	3	2	2	0
I9 10 µM	1	2	1	2	0
I9 0,1 µM	2	2	1	2	0
I10 10 µM	1	2	1	2	0
I10 0,1 µM	2	2	1	2	0
I11 10 µM	2	2	1	2	0
I11 0,1 µM	2	2	1	2	0
J5 0,1 µM	2	2	2	2	0
K6 10 µM	3	3	0	1	0
K6 0,1 µM	3	3	0	1	0
K9 10 µM	1	3	1	1	0
K9 0,1 µM	2	3	1	1	0

Tabelle 7 Ergänzende Materialliste. Alle Materialien und Geräte, die im **Abschnitt 2** Material und Methoden zum besseren Textverständnis nicht erwähnt wurden, werden hier ergänzend aufgeführt.

Bio-Vortex V1	<i>Hassa-Laborbedarf GmbH, Lübeck, Deutschland</i>
Vortex-Genie 2	<i>Scientific Industries, Bohemia, New York, USA</i>
Reac 2000 Vortex	<i>Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland</i>
Wasserbad	<i>Köttermann-Labortechnik, Uetze, Deutschland</i>
Heracell240i CO2-Inkubator	<i>Thermo-Fisher scientific, Waltham, Vereinigte Staaten</i>
Wilovert S Mikroskop	<i>Helmut Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland</i>
LaminAir HB 2448	<i>Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland</i>
Biowizard	<i>Kojair, Mänttä-Vilppula, Finnland</i>
Vortex	<i>Snijders Scientific, Tilburg, Niederlande</i>
Captair chem	<i>Erlab, Val de Reuil, Frankreich</i>
Feinwaage Analytical Plus	<i>OHAUS, Parsippany, New Jersey, Vereinigte Staaten</i>
Waage Precision Standard	<i>OHAUS, Parsippany, New Jersey, Vereinigte Staaten</i>