

Aus dem Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Hauke Busch

Validierung von Inhibitoren der Signaltransduktion in Keratinozyten nach Bindung von Pemphigus-Antikörpern

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

- aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Clara-Sophie Thies

aus Kiel

Lübeck, 2020

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med. vet. Jennifer E. Hundt
2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. Ing. Antje Müller
Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.2021
Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 26.11.2021
Promotionskommission der Sektion Medizin

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Funktion der Haut	1
1.2 Aufbau der Haut und Hautanhangsgebilde	2
1.3 Pemphigus vulgaris	5
1.3.1 Definition, Prävalenz und Symptome von Pemphigus vulgaris	6
1.3.2 Pathomechanismen bei Pemphigus vulgaris.....	7
1.3.3 Diagnoseverfahren von Pemphigus vulgaris	10
1.3.4 Therapieansätze zur Behandlung von Pemphigus vulgaris	11
1.4 Keratinozyten.....	13
1.4.1 Aufbau und Funktion von Keratinozyten und Desmosomen	13
1.4.2 Signaltransduktion von Keratinozyten	14
1.4.2.1 Signalkaskade um die Proteinkinase C.....	14
1.4.2.2 Signalkaskade um die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase.....	15
1.4.2.3 Signalkaskade um den <i>epidermal growth factor receptor</i>	16
1.4.2.4 Signalkaskade um die Phosphoinositid-3-Kinase.....	16
1.4.2.5 Signalkaskade um das G-Protein <i>Ras homologue A</i>	17
1.5 Zielsetzung	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Material.....	20
2.1.1 Geräte.....	20
2.1.2 Zellen und Inhibitoren	21
2.1.3 Reagenzien.....	21
2.1.5 Verbrauchsmaterialien	23
2.1.6 Software	23
2.2 Methoden	24
2.2.1 Immunapheresematerial	24
2.2.2 Selleckchem <i>Target Selective Inhibitory Library</i>	25
2.2.3 Kultur von HaCaT-Zellen.....	27
2.2.4 Kultur von primären humanen Keratinozyten	27
2.2.5 Thiazolylblau-Tetrazoliumbromid-Nachweisverfahren	28
2.2.5.1 Prinzip	28
2.2.5.2 Durchführung.....	28
2.2.6 Nachweisverfahren zur Keratinozytendissoziation	30
2.2.6.1 Prinzip	30

2.2.6.2	Durchführung.....	30
2.2.7	Auswertung und Statistik.....	33
3	Ergebnisse	35
3.1	Zytotoxische Auswirkungen der Inhibitoren auf die Viabilität von HaCaT-Zellen	35
3.2	Einfluss der Inhibitoren auf die Autoantikörper-vermittelte Keratinozytendissoziation	38
3.2.1	Testung des Immunapheresematerials auf die Keratinozytendissoziation...38	
3.2.2	Induktion der Keratinozytendissoziation bei HaCaT-Zellen	39
3.2.3	Induktion der Keratinozytendissoziation bei NHEK-Zellen.....	45
4	Diskussion	47
4.1	Bedeutung der vielversprechenden Inhibitoren	48
4.2	Mögliche Effekte der nicht erwarteten Hyperfragmentierung.....	53
4.3	Methodische Diskussion	56
4.4	Ausblick	58
5	Zusammenfassung	61
	Literaturverzeichnis.....	VIII
	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	XXI
	Danksagung	XXII
	Anhang	XXIV

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABL	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homologue</i>
Akt	Serin-Threoninkinase Akt, Proteinkinase B
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	<i>Bcl-2-antagonist of cell death</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i> , Protein
BCR	<i>B-cell receptor</i> , B-Zell-Rezeptor
BP	Bullöses Pemphigoid
BP180	Bullöses-Pemphigoid-Antigen II
BP230	Bullöses-Pemphigoid-Antigen I
BSA	Bovines Serumalbumin
CAAR	<i>Chimeric autoantibody receptor</i>
CaCl₂	Calciumchlorid
CAR	<i>Chimeric antigen receptor</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i> , Zyklin-abhängige Kinase
c-Myc	<i>Cellular myelocytomatosis</i> , Protoonkogen
Cryo-SFM	<i>Cryo-serumfreies Medium</i>
DAG	Diacylglycerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
Dsc	Desmocollin
Dsg	Desmoglein
EBA	Epidermolysis bullosa acquisita
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FBS	Fetales bovines Serum
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FGFR	<i>Fibroblast growth factor receptor</i>
FoxO	<i>Forkhead box O</i> , Protein

HaCaT	<i>Human adult low calcium high temperature</i> , spontan immortalisierte humane Keratinozyten
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HCl	Salzsäure
Hrsg.	Herausgeber
Hsp27	Hitzeschockprotein 27
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IGF1R	<i>Insulin-like growth factor 1 receptor</i>
IP₃	Inositoltriphosphat
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
KGM 2	<i>Keratinocyte growth medium 2</i>
LRRK	<i>Leucine-rich repeat kinase 2</i>
MAP2K	MAP-Kinase-Kinase, MAPKK
MAP3K	MAP-Kinase-Kinase-Kinase, MAPKKK
MEK1/2	MAPK/ERK-Kinase 1/2, MAP2K 1/2
MK2	MAPK-aktivierte Proteinkinase 2, MAPKAPK2
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NFκB	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NHEK	<i>Normal human epidermal keratinocyte</i>
NSCLC	<i>Non-small-cell lung carcinoma</i>
p38-MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
PDK1	3-Phosphoinositid-abhängige Kinase 1
PF	<i>Pemphigus foliaceus</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP₂	Phosphatidylinositoldiphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLK	<i>Polo-like kinase</i>
PNP	Paraneoplastischer Pemphigus
PV	<i>Pemphigus vulgaris</i>
Raf	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i> , MAP3K

Ras	<i>Rat sarcoma</i> , G-Protein
RhoA	<i>Ras homologue A</i> , G-Protein
RT	Raumtemperatur
scFv	<i>Single-chain variable fragments</i> , Antikörperfragmente
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
Src	<i>Sarcoma</i> , Tyrosinkinase
Tab.	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TrkA	Tropomyosinrezeptorkinase A
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>

Gängige Abkürzungen der deutschen Sprache sind nicht aufgeführt.

1 Einleitung

1.1 Funktion der Haut

Die Haut ist flächenmäßig das größte Organ des menschlichen Körpers und nimmt damit zahlreiche lebenswichtige Funktionen ein. Zu diesen gehören Schutz vor Umwelteinflüssen, Immunabwehr, Austausch und Reizaufnahme [1,2].

Schutz vor mechanischen Einwirkungen bietet die Haut durch ihre hohe Elastizität, aber zugleich große Zugfestigkeit. Weiterhin schützt der spezielle Aufbau der Epidermis durch das Stratum corneum vor dem Eindringen von Substanzen und Pathogenen. Durch den sauren pH-Wert der Hautoberfläche (pH 5,7) besteht ein Säureschutzmantel mit hoher Pufferkapazität. Die Epidermis bildet eine Barriere gegen Austrocknung und Strahleneinwirkungen. Dieses geschieht zum einen durch Reflektion der eintreffenden Strahlen, aber auch durch Melaninsynthese, Reparatur von DNA-Schäden sowie Akanthose und Hyperkeratose der Epidermis [1,3].

Die wichtigste Austauschfunktion der Haut ist die Wärmeabgabe an die Umgebung. Sie dient der Aufrechterhaltung der Körpertemperatur und geschieht zum einen durch Verdunstung in Form von Schweißsekretion, aber auch durch Konvektion, Leitung und Strahlung. Fettlösliche Substanzen können über die Epidermis, Haarfollikel und Schweißdrüsen resorbiert werden, wasserlösliche Stoffe werden dagegen kaum aufgenommen [1].

Weiterhin werden durch die Haut Tastsinn, Temperaturwahrnehmung, Schmerz und Juckreiz vermittelt. Für den Tastsinn gibt es verschiedene spezialisierte Endkörperchen mit unterschiedlicher Lokalisation und Adaptation auf die wahrgenommenen Reize. Merkel-Zellen nehmen beispielsweise hauptsächlich Druck wahr und adaptieren langsam, während Meissner-Tastkörperchen feine Berührungen wahrnehmen und dafür eine schnelle Adaptation aufweisen [3]. Die Temperatur wird über freie Nervenendigungen für Wärme und Kälte vermittelt. Es werden sowohl die absolute Temperatur als auch Temperaturänderungen wahrgenommen. Der Schmerzsin wird über unterschiedliche Schmerzrezeptoren in der Haut übertragen. Man unterscheidet markhaltige Fasern, die hellen Schmerz weiterleiten, und marklose Fasern, die für den dumpfen Schmerz zuständig sind. Juckreiz wird schließlich über freie Nervenendigungen markloser C-Fasern im *Stratum papillare* und in der Epidermis oder durch sehr langsam leitende freie Endigungen, die nur auf histamininduziertes Jucken reagieren, übertragen [1].

1.2 Aufbau der Haut und Hautanhangsgebilde

Die Haut lässt sich in Epidermis, Dermis und Subkutis unterteilen. Die Epidermis bildet die oberste Schicht und besteht aus mehrschichtigem, verhorntem Plattenepithel mit einer Dicke von 30-300 Mikrometer (μm), welches einer dauerhaften Erneuerung unterliegt und durch Diffusion versorgt wird. Von innen nach außen besteht die Epidermis aus 4-5 Schichten (**Abb. 1.1**). Ganz innen befindet sich das *Stratum basale*, eine Schicht kubischer Keratinozyten mit großen Zellkernen und wenig Plasma. Hier befinden sich die Stammzellen und somit die mitotisch aktivsten Keratinozyten der Epidermis. Darüber liegt das *Stratum spinosum* mit größeren, polygonalen Keratinozyten in mehreren Schichten verbunden durch stachelförmige Desmosomen. Darauf folgt das *Stratum granulosum* mit abgeflachten, basophil granulierten Keratinozyten. Das *Stratum lucidum* ist palmoplantar besonders ausgeprägt und bildet die unterste Zellschicht des *Stratum corneum* mit seinen flachen, kernlosen Hornzellen. Dieses ist an verschiedenen Stellen des Körpers unterschiedlich stark ausgeprägt. Die *Turn-Over-Zeit* vom *Stratum basale* zum *Stratum granulosum* beträgt zwei bis drei Wochen und von dort zur Hornzelle nochmals zwei Wochen [1,4].

Keratinozyten bilden mehr als 90% der Zellen der Epidermis und dienen der Zellteilung und Verankerung der Epidermis. Ihr genauerer Aufbau und Funktion wird in **Kapitel 1.4.1** beschrieben.

Melanozyten sind große, helle dendritische Zellen, befinden sich im *Stratum basale* und synthetisieren Melanin, welches sie über Fortsätze an benachbarte Keratinozyten abgeben. Ein Melanozyt versorgt durchschnittlich 36 Keratinozyten [2,5].

Außerdem lassen sich Langerhans-Zellen suprabasal finden. Sie sind Immunzellen der myeloischen Reihe und dienen durch Antigenpräsentation der T-Helferzell-Aktivierung. Außerdem tragen sie wesentlich zur Entstehung von allergischen Typ-IV-Reaktionen bei [1].

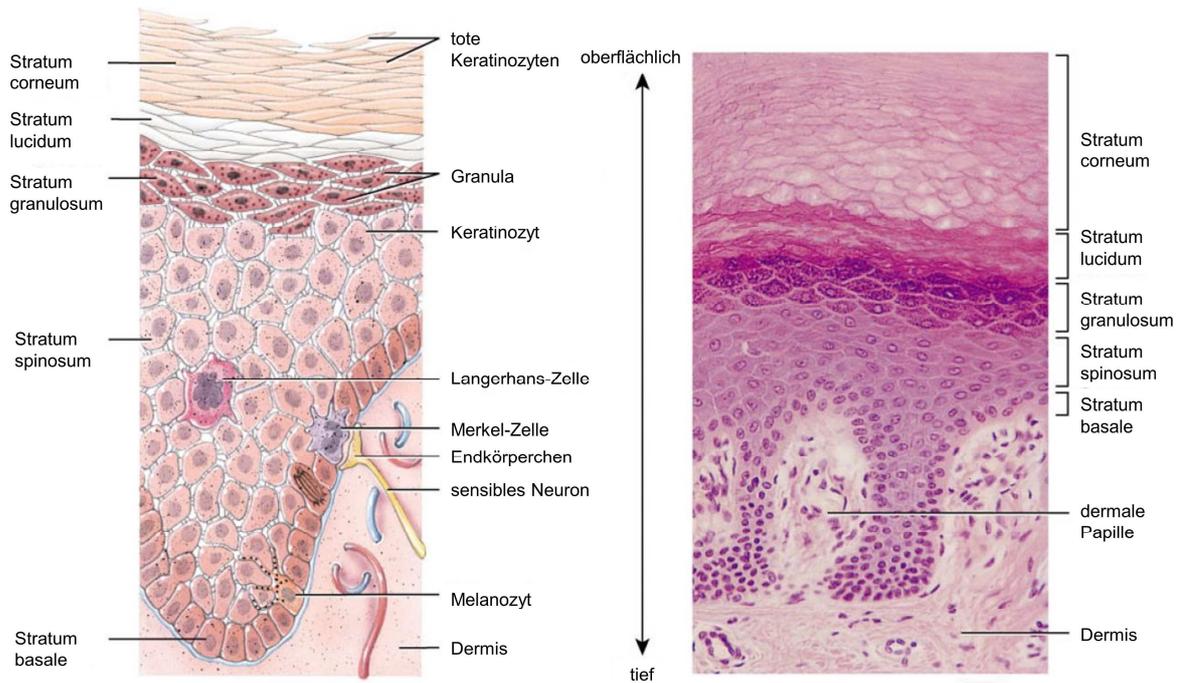


Abb. 1.1: Aufbau der Epidermis

Abbildung modifiziert nach [6].

An der dermoepidermalen Junctionszone sind die beiden oberen Schichten der Haut durch epidermale Reteleisten und dermale Papillen eng verzahnt. Die Basalmembran, die sich zwischen Epidermis und Dermis befindet, lässt sich in drei Schichten einteilen: Die *Lamina lucida* als superfizielle Schicht ist mit den Hemidesmosomen und damit mit der Plasmamembran der Basalzellen der Epidermis über Laminine und Integrine verbunden. Darunter liegt die *Lamina densa* und schließlich die *Sublamina densa*, in welcher der Kontakt zur Dermis über Kollagen Typ VII und die dermalen Kollagene erfolgt [1,7].

Die äußerste Schicht der Dermis, die der mechanischen Widerstandsfähigkeit der Haut dient, ist das gefäß- und zellreiche *Stratum papillare*, das sich in die Zwischenräume der epidermalen Reteleisten erstreckt (**Abb. 1.2**). Es besteht hauptsächlich aus Fibroblasten, Kapillaren und dermaler Matrix (Hyaluronsäure, Dermatansulfat). Auch Zellen des Immunsystems sowie Meissner-Tastkörperchen kommen hier vor [2]. Darunter befindet sich das *Stratum reticulare*, welches aus wenigen Zellen und einem dichten Fasergeflecht mit mechanischer Funktion besteht. Hier verlaufen die Haarfollikel und Schweißdrüsen und es lassen sich weitere Mechano- und Dehnungsrezeptoren finden [1,2,4].

Fibroblasten bilden den Hauptteil der Zellen in der Dermis. Weiterhin lassen sich Makrophagen, Mastzellen und vereinzelt Melanozyten und T-Lymphozyten finden. Der vorherrschende Kollagentyp der Dermis ist Kollagen Typ I.

Die Subkutis besteht schließlich aus lockerem Bindegewebe und subkutanem, weißen Fettgewebe und dient der Isolation, Energiespeicherung und Druckpolsterung. Ihre Ausprägung unterscheidet sich an verschiedenen Stellen des Körpers stark und ist abhängig von Geschlecht, Alter und Ernährung [1,2].

Die zu den Hautanhangsgebilden gehörenden Haare bestehen aus dem äußerlich sichtbaren Haarschaft und einer Haarwurzel als Einstülpung der Epidermis, welche je nach Haarzyklusstand bis in die Subkutis reichen kann. Den Ursprung eines Haares bildet der Haarbulbus mit der bindegewebigen Haarpapille, in welcher sich die mitotisch aktiven Matrixzellen sowie Melanozyten befinden. Als Haarfollikel bezeichnet man die epitheliale und bindegewebige Wurzelscheide eines Haares. Die Haarbalgmuskeln setzen an der bindegewebigen Wurzelscheide an und können die Haarfollikel aufrichten sowie die assoziierten Talgdrüsen entleeren [2,4].

Weiterhin lassen sich ekkrine Schweißdrüsen mit Ursprung in der tiefen Dermis bis Subkutis und im Bereich von z. B. Axilla auch apokrine Schweißdrüsen mit Mündung in die Haartrichter finden. Talgdrüsen enden meist im Haartrichter, können aber auch ohne Bezug zu Haaren auftreten und werden durch Androgene stimuliert [2].

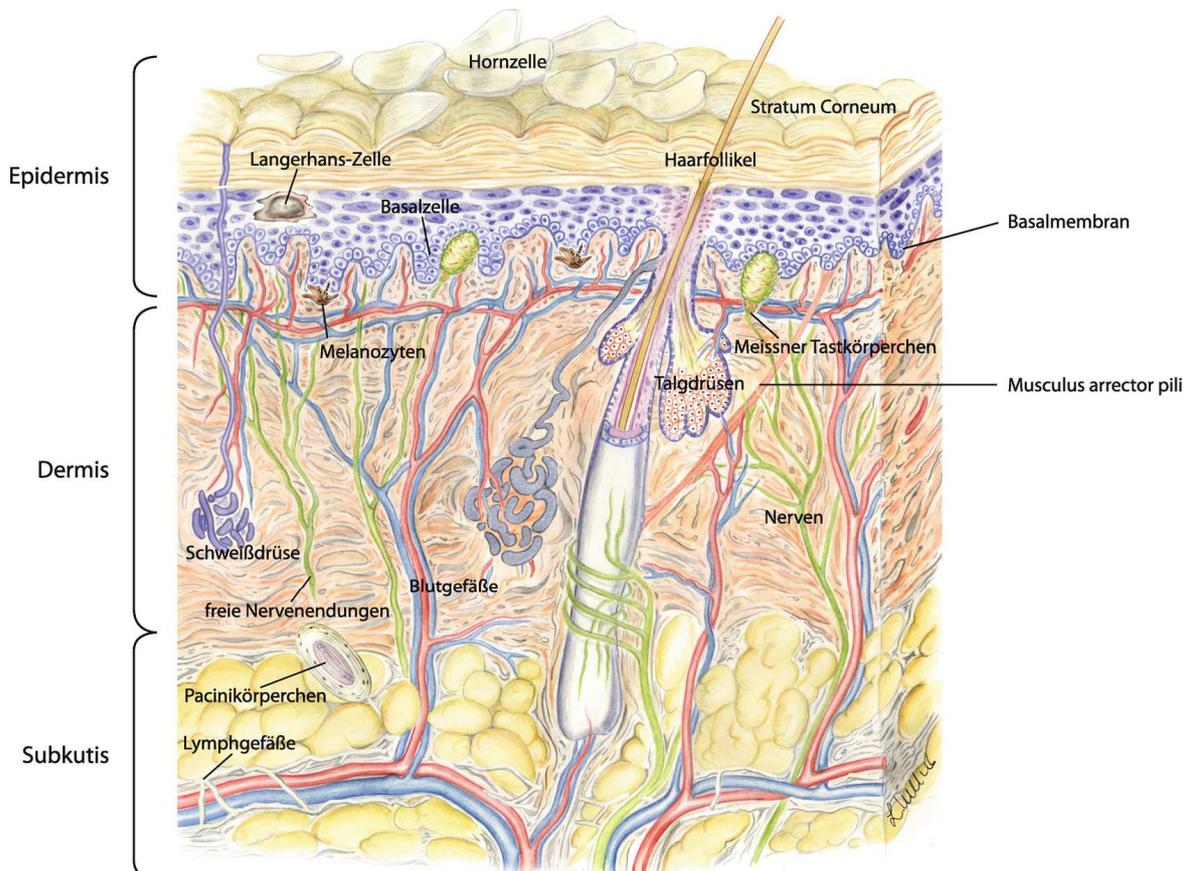


Abb. 1.2: Aufbau der Haut, Hautanhangsgebilde und Subkutis

Abbildung aus [3].

1.3 Pemphigus vulgaris

Die blasenbildenden Autoimmundermatosen zeichnen sich durch eine Spalt- und Blasenbildung der Haut und Schleimhaut bedingt durch Autoantikörper aus. Dabei lassen sie sich in die Pemphigus- und Pemphigoid-Gruppe unterteilen.

Zur Pemphigoid-Gruppe mit einer Spaltbildung in der dermoepidermalen Junctionszone (**Abb. 1.3**) und Autoantikörpern gegen das Bullöse-Pemphigoid-Antigen I (BP230) und II (BP180) gehören das bullöse Pemphigoid (BP), Pemphigoid gestationis, Schleimhautpemphigoid, vernarbendes Pemphigoid, lineare IgA-Dermatose, Anti-p200-Pemphigoid und Lichen planus pemphigoides. Weiterhin gibt es noch die Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) mit Autoantikörpern gegen Kollagen Typ VII.

Bei der Pemphigus-Gruppe findet die Spaltbildung dagegen innerhalb der Epidermis statt und es lassen sich Pemphigus vulgaris (PV), Pemphigus foliaceus (PF), IgA-Pemphigus und der paraneoplastische Pemphigus (PNP) abgrenzen. Autoantigene sind u. a. die desmosomalen Transmembranproteine Desmoglein (Dsg) 1 und 3. Die Autoantikörper können mit direkter oder indirekter Immunfluoreszenz sowie im *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) nachgewiesen werden.

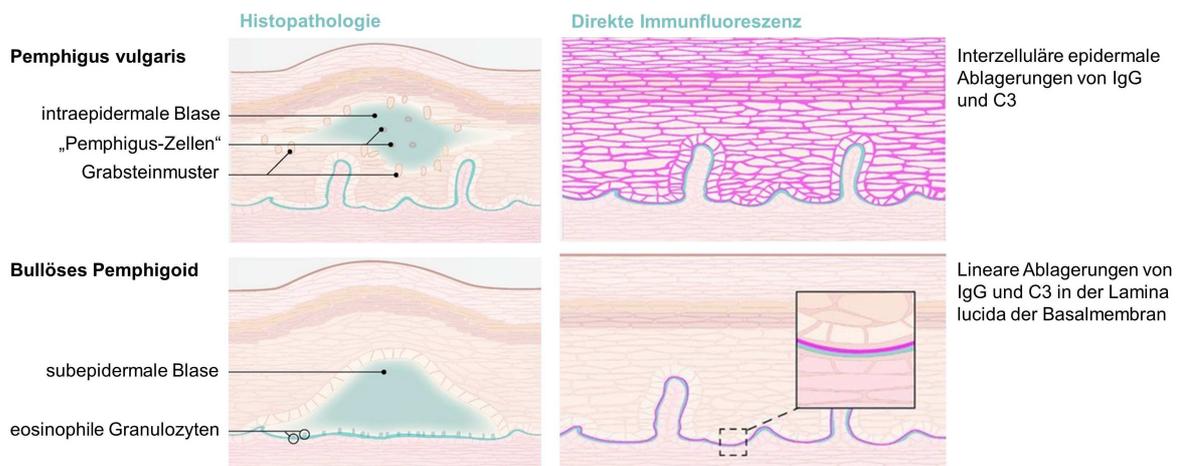


Abb. 1.3: Vergleich von Pemphigus vulgaris und bullösem Pemphigoid

Beim bullösen Pemphigoid (BP) kommt es im Gegensatz zu der intraepidermalen Blasenbildung bei Pemphigus vulgaris (PV) zu subepidermalen Blasen. In der direkten Immunfluoreszenz des BP sieht man lineare Ablagerungen von Immunglobulin (Ig) G und Komplementfaktor C3 in der *Lamina lucida* der Basalmembran, während sich IgG und C3 bei PV intraepidermal zwischen den Keratinozyten ablagern.

Abbildung modifiziert nach [8].

1.3.1 Definition, Prävalenz und Symptome von Pemphigus vulgaris

Im Gegensatz zu PF betrifft die Blasenbildung bei PV alle Schichten der Epidermis, es werden Antikörper gegen Dsg1 und 3 gebildet und die orale Mukosa ist beteiligt. Bei PF dagegen lassen sich fast ausschließlich Antikörper gegen Dsg1 finden [9–11].

PV ist in Europa, den USA und Japan der häufigste Pemphigus-Subtyp und lässt sich in einen mukosalen, mukokutanen und kutanen Typ einteilen [12,13]. Dabei findet die Blasenbildung beim mukosalen Typ in den tiefen Schichten der oralen Mukosa statt und ist durch Dsg3-Antikörper bedingt. Beim mukokutanen Typ entstehen dagegen Blasen in der Epidermis und oralen Mukosa unter zusätzlicher Anwesenheit von Dsg1-Antikörpern, während beim kutanen Typ die Dsg1-Antikörper überwiegen und hauptsächlich epidermale Blasenbildung zu finden ist. Die Krankheit betrifft bei Krankheitsbeginn überwiegend Frauen im Alter von 50-60 Jahren, die Inzidenz in Europa variiert von 0,5 Fällen pro Million Einwohner in Deutschland bis zu acht Fällen in Griechenland [14,15].

Klassischerweise manifestiert sich die Krankheit zunächst an der oralen Mukosa und breitet sich dann auf die Haut, typischerweise an Kopf, Oberkörper und Leistengegend sowie mechanisch belasteten Arealen, aus. Die entstehenden Blasen sind schlaff und verschieblich mit klarem Inhalt, platzen leicht und hinterlassen schmerzhafte Erosionen mit Krustenbildung, die ohne Narbenbildung wieder verheilen (**Abb. 1.4**). Der Verlust der Zelladhäsion zeigt sich in einer Auslösbarkeit von Blasen durch seitlichen Verschiebedruck, das sogenannte Nikolski-Zeichen. Bei großflächigem Befall kommt es zu allgemeinem Krankheitsgefühl und Fieber sowie erhöhter Gefahr von Superinfektionen und Flüssigkeitsverlust [1,16].



Abb. 1.4: Histopathologie von Pemphigus vulgaris links und klinisches Erscheinungsbild rechts
Abbildung links aus [17] und rechts aus [1].

1.3.2 Pathomechanismen bei Pemphigus vulgaris

PV wird durch Autoantikörper gegen verschiedene Oberflächenantigene auf Keratinozyten ausgelöst. Die bisher als am wichtigsten bekannten Autoantigene sind Dsg1 und 3, die zusammen mit Desmocollin (Dsc) und Plakoglobin wichtige Bestandteile der Desmosomen bilden [18,19] (**Kapitel 1.4.1**). Diese vermitteln den Zell-Zell-Kontakt und damit den Zusammenhalt der Keratinozyten in der Epidermis. Nach der Desmoglein-Kompensationstheorie (**Abb. 1.5**) korreliert dabei das Verteilungsmuster von Dsg1 und 3 in der Haut und den Schleimhäuten mit der Krankheitsausprägung und erklärt damit die Entstehung der Subtypen des PV sowie die Unterscheidung zu PF [20–22]. Dsg1 wird in der Haut überwiegend in den oberflächlichen Schichten der Epidermis exprimiert (PF, kutaner PV), während Dsg3 eher in den basalen Schichten zu finden ist (mukokutaner PV). In den Schleimhäuten dagegen wird Dsg1 zwar exprimiert, aber in deutlich geringerer Ausprägung als Dsg3 (mukosaler PV) [16].

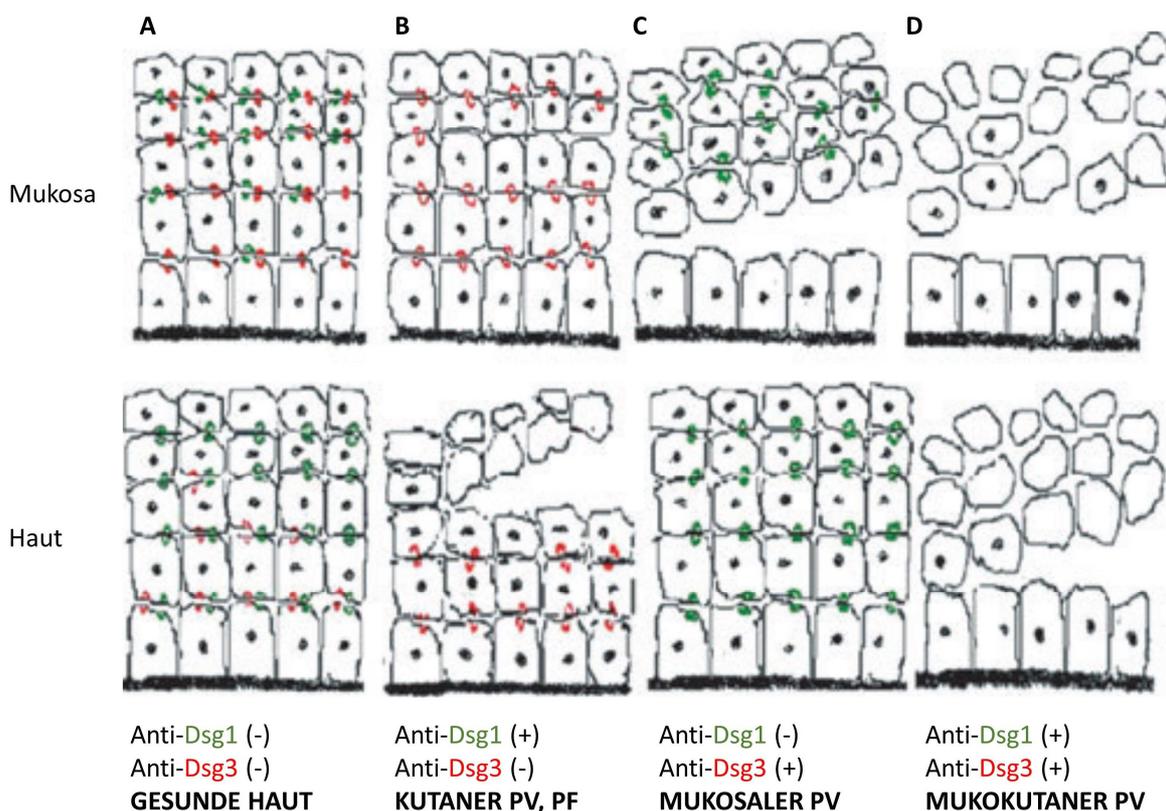


Abb. 1.5: Desmoglein-Kompensationstheorie

Legendertext s. nächste Seite.

Abb. 1.5: Desmoglein-Kompensationstheorie

Die Desmoglein(Dsg)-Kompensationstheorie geht von einer unterschiedlichen Verteilung der Antigene in Mukosa und Haut aus. **(A)** Dsg3 befindet sich in den basalen und suprabasalen Schichten der Epidermis und auf der gesamten Mukosa, während Dsg1 in allen Schichten der Epidermis, aber kaum in den tiefen Schichten der Mukosa zu finden ist. **(B)** Bei Autoantikörpern gegen Dsg1 kommt es zu oberflächlichen, epidermalen Blasen, während der Zell-Zell-Kontakt in der Mukosa durch Dsg3 kompensiert werden kann. Dies findet sich beim Pemphigus foliaceus (PF) und beim kutanen Pemphigus vulgaris (PV). **(C)** Bei Vorhandensein von Antikörpern gegen Dsg3 entstehen dagegen tiefe, mukosale Blasen. Die Epidermis bleibt intakt. **(D)** Beim mukokutanen Typ des PV mit Antikörpern gegen Dsg1 und 3 treten folglich sowohl in Mukosa als auch Epidermis Blasen auf. Abbildung modifiziert nach [23].

Im Gegensatz zu den blasenbildenden Autoimmundermatosen der Pemphigoid-Gruppe sind beim Pemphigus die Autoantikörper allein ausreichend für die Blasenbildung. Es kommt zu keiner Komplementaktivierung und es werden keine Zellen des Immunsystems benötigt, um den Pathomechanismus in Gang zu setzen. Passend dazu ist bekannt, dass die Autoantikörper hauptsächlich der Subklasse IgG4 angehören, welche das Komplementsystem nicht und Effektorzellen des Immunsystems kaum aktivieren [24–26].

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass die Bindung der pathogenen Dsg-Autoantikörper lediglich zu einer sterischen Hinderung des Kontaktes der Desmosomen führt und dadurch zu der resultierenden epidermalen Spaltbildung [27,28]. Dies wurde gestützt durch die Desmoglein-Kompensationstheorie, die Dsg-Verteilung innerhalb der Epidermis und Entstehungsort der Blasen in Einklang bringt [22,23].

Neuere Theorien gehen dagegen davon aus, dass die Bindung der Autoantikörper an ihre Zielstrukturen auf der Zelloberfläche der Keratinozyten zusätzlich in diesen Zellen komplexe intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert [29–31]. Auch wenn die Dsg-Antikörper notwendig für das spezifische Krankheitsbild von PV sind und alleine für die Blasenbildung ausreichen, wurden weitere extra-desmosomale Autoantikörper gefunden. Ihre genaue Rolle ist oftmals zwar noch unklar, sie unterstützen aber vermutlich die Krankheitsentstehung. Dazu gehören u. a. Antikörper gegen Dsc [32], Pemphaxin [33], Acetylcholinrezeptoren [34,35] und antimitochondriale Antikörper [16,36].

Die Bindung dieser pathogenen Antikörper führt *downstream* u. a. über die Aktivierung des *epidermal growth factor receptor* (EGFR), der Tyrosinkinase *sarcoma* (Src), des *mechanistic target of rapamycin* (mTOR), der c-Jun-N-terminalen Kinase (JNK), der p38-mitogenaktivierten Proteinkinase (p38-MAPK) und anderen Signalmolekülen (**Kapitel 1.4.2**) sowie einer Erhöhung des intrazellulären Calciums (Ca^{2+}) zur Einleitung des programmierten Zelltodes, vor allem in den basalen und suprabasalen Schichten der Epidermis [37–39]. Intrazelluläre Keratinfilamente kollabieren und werden durch Kaspasen

abgebaut, wodurch sie sich zusammenziehen. Es kommt zu einer Dissoziation interdesmosomaler Adhäsionskomplexe durch Phosphorylierung und Kaspasen. Die Induktion dieser Kaspasen durch Immunglobulin (Ig) G von PV-Patienten und die Aktivierung des Fas-Rezeptor-Signalweges [40,41] sowie auch die Beteiligung von Serin- und Threoninkinasen bei der Phosphorylierung der interdesmosomalen Strukturproteine und ihrer anschließenden Internalisierung ist bekannt [42,43]. Zunächst wird nur extradesmosomales Dsg und Dsc internalisiert, während bestehende Desmosomen intakt bleiben.

Im fortgeschrittenen Prozess dieser sogenannten Akantholyse kollabieren auch bestehende Desmosomen und es kommt zur Internalisierung ihrer Strukturproteine und zur vollständigen Auflösung der Zelladhäsion unter den Keratinozyten. Im letzten Schritt folgt die Abrundung und Apoptose der akantholytischen Zellen im basalen und suprabasalen Bereich der Epidermis, die ihnen ihr charakteristisches, grabsteinartiges Aussehen und den Namen „Pemphigus-Zellen“ verleiht. Es zeigte sich, dass Apoptose dem Prozess der Akantholyse nicht zwingend vorausgeht und diese auch ohne Apoptose stattfinden kann. Dies führte zur Einführung des Begriffes Apoptolyse [37,44] (**Abb. 1.6**).

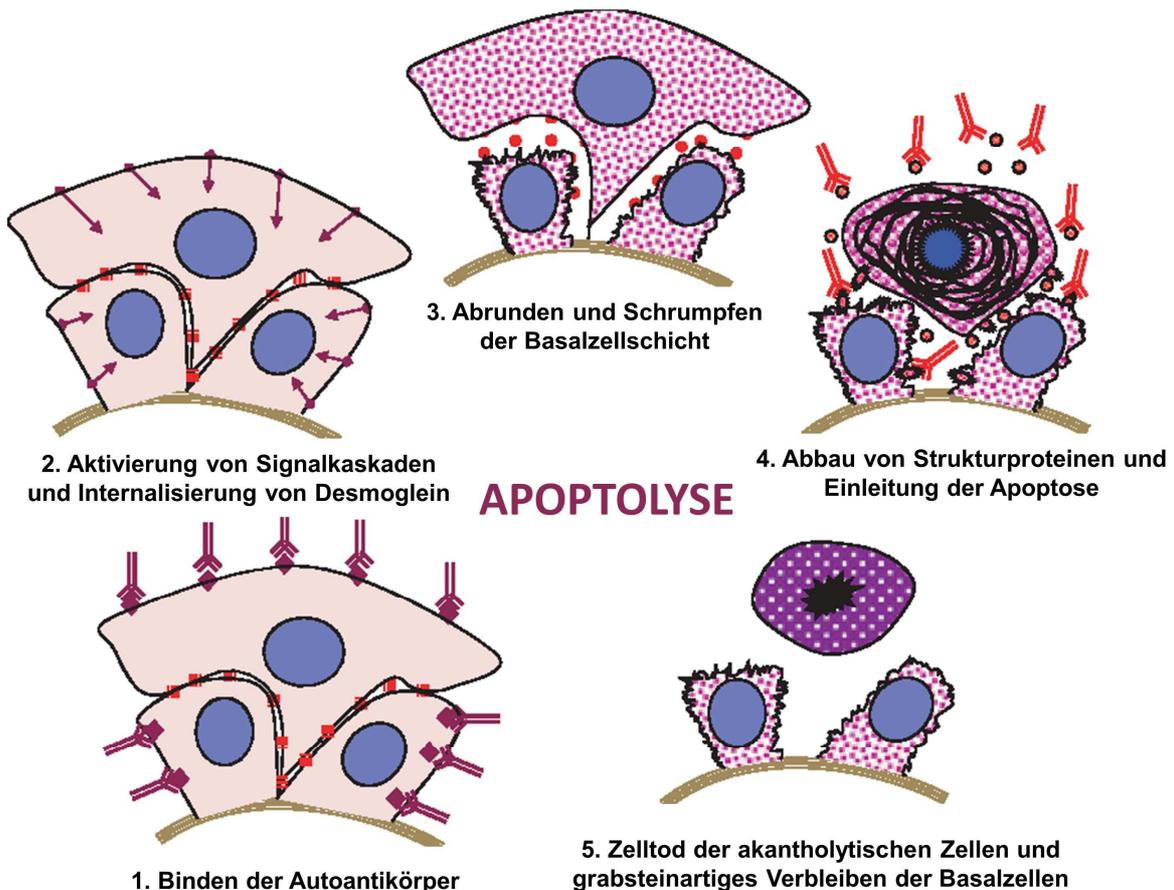


Abb. 1.6: Theorie der Apoptolyse

Legendentext s. nächste Seite.

Abb. 1.6: Theorie der Apoptolyse

Desmoglein(Dsg)-Autoantikörper und weitere Antikörper, die die Krankheitsentstehung unterstützen, binden an Dsg in den Desmosomen der Epidermis (1). Dies führt zu einer Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden und nachfolgend zu einer Internalisierung des Dsg (2). Durch die Signalweiterleitung kommt es zu einer Abrundung und Schrumpfung der Keratinozyten der basalen und suprabasalen Schicht (3) und damit zu einem verstärkten Verlust der Zelladhäsion. Dieser Prozess der Akantholyse bedingt eine weitere Internalisierung und Abbau von Strukturproteinen und letztendlich die Einleitung des programmierten Zelltodes suprabasaler Zellen (4). Die Keratinozyten der Basalzellschicht verbleiben im typischen grabsteinartigen Aussehen (5).

Abbildung modifiziert nach [37].

Der genaue Pathomechanismus bleibt dabei aber weiterhin unklar, sodass nach aktuellem Stand der Forschung eine Kombination aus der Theorie der sterischen Hinderung durch Dsg-Antikörper und derjenigen der Apoptolyse durch intrazelluläre Signalkaskaden und zusätzlich weitere Autoantikörper vermutet wird. Eine genauere Beschreibung der beteiligten Signalkaskaden erfolgt in **Kapitel 1.4.2**.

1.3.3 Diagnoseverfahren von Pemphigus vulgaris

Die Diagnose des PV gelingt mittels Histopathologie, Immunfluoreszenzfärbung und Serologie.

Eine Biopsie aus läsionaler Haut zeigt die Akantholyse sowie die intraepitheliale Blasenbildung. Die basale Reihe der Keratinozyten bleibt aufgrund noch intakter Hemidesmosomen auf der Basalmembran verankert und zeigt ein charakteristisches, grabstein-artiges Bild. Auch wenn die Blasenbildung bei PV klassischerweise nicht inflammatorisch ist, kann eine leichte eosinophile und neutrophile Infiltration in der oberen Dermis und Epidermis gefunden werden. Der Tzanck-Test kann durch Eröffnung einer frischen Blase und Ausstreichen und Färbung des Blasengrundes zum Nachweis von akantholytischen Zellen und Leukozyten zur Abgrenzung gegenüber subepidermal blasenbildenden Erkrankungen dienen, hat aber an Bedeutung verloren [11].

In der direkten Immunfluoreszenz periläsionaler Biopsien zeigen sich interzelluläre Ablagerungen von IgG, vor allem IgG4 (**Abb. 1.7**). Es lassen sich auch geringe Mengen von Komplementfaktor C3, IgM und IgA finden. Bei fast allen Patienten lassen sich im aktiven Stadium durch indirekte Immunfluoreszenz mit Affenösophagus zirkulierende Serum-Autoantikörper nachweisen. Der Antikörpertiter korreliert dabei oftmals mit der Krankheitsaktivität und kann als Verlaufsparemeter genutzt werden. Weiterhin existiert ein sensitiver und spezifischer ELISA zum Nachweis der Dsg1- und Dsg3-Antikörper [1,11].

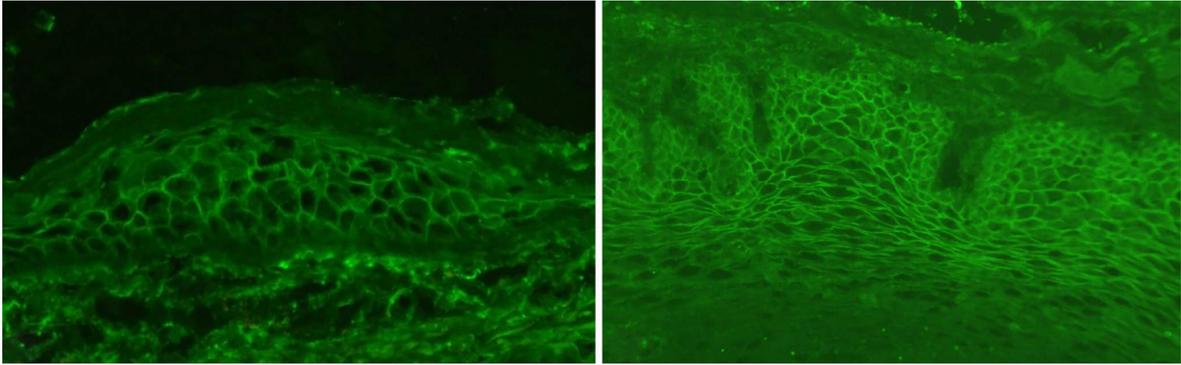


Abb. 1.7: Direkte und indirekte Immunfluoreszenz bei Pemphigus vulgaris

Die direkte Immunfluoreszenz perilesionaler Haut (links) bei Pemphigus vulgaris zeigt eine interzelluläre Ablagerung von Immunglobulin G in der Epidermis. Bei der indirekten Immunfluoreszenz auf Affenösophagus (rechts) lassen sich die zirkulierenden Antikörper aus Patientenserum nachweisen. Abbildung aus [45].

1.3.4 Therapieansätze zur Behandlung von Pemphigus vulgaris

Aktuell besteht kein kausaler Ansatz zu Behandlung von PV. Der Großteil der derzeitigen Therapieansätze beruht auf einer Reduzierung der Serum-Autoantikörper, entweder direkt oder durch generalisierte Immunsuppression [46].

Mittel der Wahl zur Therapie von PV in der Initialphase sind systemische und lokal wirksame Glukokortikoide, die bei Therapiedosen oberhalb der Cushing-Schwelle und schwerem Krankheitsverlauf zusätzlich mit weiteren Immunsuppressiva kombiniert werden. Der schnelle Wirkeintritt der Glukokortikoide kann durch eine vermehrte Transkription von Desmogleinen und anderen Zelladhäsionsmolekülen erklärt werden [47–49].

Zu den weiterhin verwendeten Immunsuppressiva zählen unter anderem Azathioprin, Mycophenolat mofetil und Rituximab bei therapierefraktärem PV. Diese werden vor allem in der Konsolidierungsphase zur kortikoidsparenden Therapie verwendet. Es zeigte sich für den monoklonalen, *cluster-of-differentiation*(CD)20-spezifischen Antikörper Rituximab aber auch eine hohe Evidenz für die *first-line*-Kombinationstherapie mit Prednison bei neu diagnostiziertem PV. Aktuell erreicht der Großteil der PV-Patienten unter einer Kombinationstherapie mit hochdosierten Glukokortikoiden und Rituximab eine vollständige Remission nach 120-180 Tagen, 20% erreichen allerdings keine komplette Remission [50–53]. Ergänzend wird mit intravenösen Immunglobulinen und bei schweren und refraktären Verläufen zusätzlich mit Plasmapherese und Immunadsorption behandelt [54–56].

Da systemische Immunsuppressiva aber starke Nebenwirkungen auf den gesamten Körper haben, wird an Medikamenten geforscht, die direkt die Internalisierung des Dsg3 und damit die Akantholyse der Keratinozyten verhindern können.

Gute Ergebnisse wurden bereits mit Cholinergika wie Pyridostigmin und Pilocarpin erzielt, da sich gezeigt hat, dass die Aktivierung von sowohl nikotinischen als auch muskarinergen Acetylcholinrezeptoren u. a. zu einer Reversion der Akantholyse durch Hochregulation von Cadherin-Genen in Keratinozyten, einer Stimulation der Epithelisierung und günstigen immunmodulatorischen Effekten führt [18,57,58].

Auch Sirolimus (Rapamycin), ein mTOR-Inhibitor, ist in der Lage, eine Exazerbation von PV zu verhindern, indem es die Einleitung der Akantholyse verhindert [18,38]. Allerdings konnte keines dieser Medikamente bisher einen alleinigen Therapieerfolg erlangen, sondern erzielte lediglich eine leicht verbesserte Therapie zur Monotherapie mit Glukokortikoiden.

1.4 Keratinozyten

1.4.1 Aufbau und Funktion von Keratinozyten und Desmosomen

Keratinozyten stellen den Großteil der Zellen der Epidermis, dienen der Zellteilung und Verankerung der Epidermis und haben weiterhin eine wichtige Barrierefunktion. Sie bestehen aus einem Zytoskelett aus Keratinfilamenten, die radiär von perinukleär in die Randbezirke der Zelle ausstrahlen und deren Expressionsmuster sich in den einzelnen Schichten der Epidermis unterscheidet. Die Keratinfilamente sind an den Desmosomen und Hemidesmosomen verankert, welche die wichtigsten interzellulären Adhärenzkontakte bilden. Durch diesen Aufbau entsteht ein zugfestes Netz, welches die mechanische Stabilität der Epidermis garantiert [4,19].

Ein Desmosom ist eine fleckförmige Kontaktstelle zwischen zwei Zellen und besteht aus intrazellulären Plaques zur Verankerung der Keratinfilamente und transmembranösen Proteinen, die eine Verbindung zur Nachbarzelle herstellen. Zu den Plaqueproteinen gehören Desmoplakin I und II, welche an die intrazellulären Keratinfilamente binden, sowie Plakophilin und Plakoglobin, die die Verbindung zu den Transmembranproteinen herstellen (**Abb. 1.8**). Zur Cadherin-Familie der Transmembranproteine gehören die Desmogleine mit u. a. Dsg1 und 3 sowie Desmocolline. Diese bilden mit den Cadherinen der Nachbarzelle einen stabilen, aber dennoch flexiblen Kontakt [1,4,19].

Keratinozyten können weiterhin antibakterielle Stoffe wie β -Defensine und Dermcidin freisetzen sowie auf diverse Noxen mit einer Zytokin- und Chemokinausschüttung reagieren. Die Zellen des *Stratum granulosum* und *spinosum* sezernieren polare Lipide, die sich zwischen den Hornzellen ablagern und so den Lipidverschluss bilden [4].

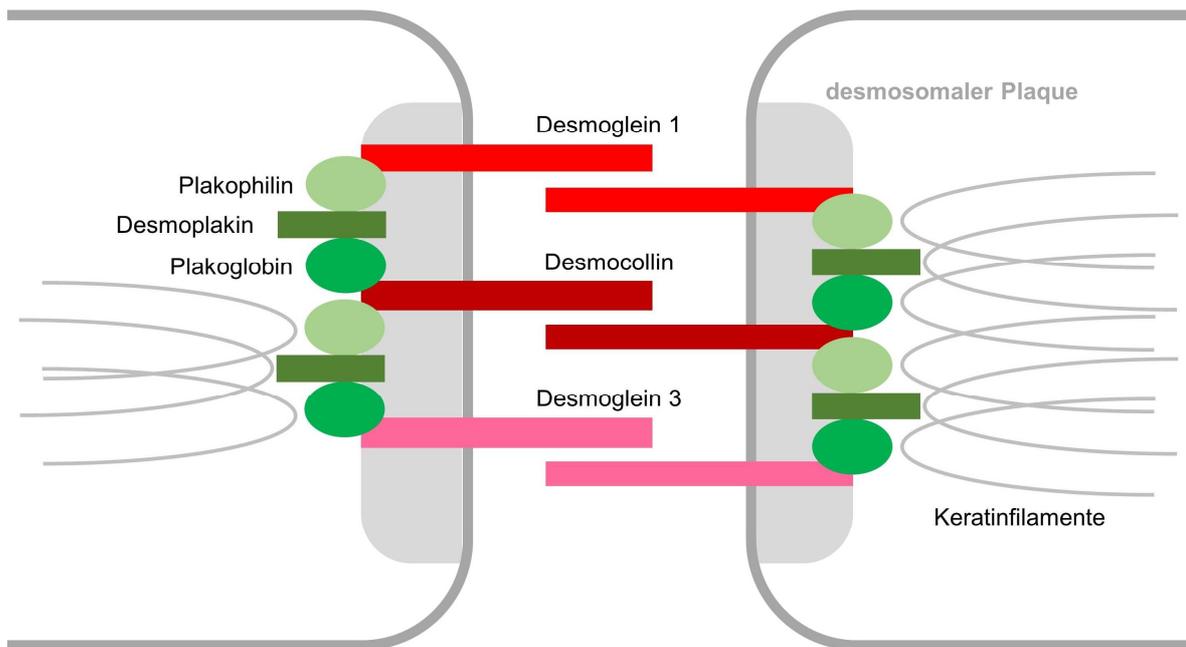


Abb. 1.8: Schematischer Aufbau eines Desmosoms

Die Keratinfilamente, die das Zytoskelett der Keratinozyten bilden, binden an die intrazellulären Plaqueproteine Plakophilin, Desmoplakin und Plakoglobin. Über diese wird eine Verbindung zu den Cadherinen, u. a. den Transmembranproteinen Desmoglein 1 und 3 sowie den Desmocollinen, hergestellt, welche wiederum eine zugfeste Verbindung zu den Cadherinen der Nachbarzelle ausbilden.

1.4.2 Signaltransduktion von Keratinozyten

Da für die Blasenbildung des PV keine zellulären Komponenten des Immunsystems benötigt werden, liegt der Schwerpunkt der Forschung auf den Keratinozyten und der in ihnen stattfindenden Signaltransduktion. Im Folgenden werden daher die wichtigsten Signalkaskaden beschrieben, von denen bisher eine Beteiligung bei der Pathogenese des PV bekannt ist.

1.4.2.1 Signalkaskade um die Proteinkinase C

Eine wichtige Rolle bei der Ausbildung des Zell-Zell-Kontaktes und der Keratinozytendifferenzierung spielt Ca^{2+} in Verbindung mit der Proteinkinase C (PKC) und Phospholipase C (PLC) [59]. Durch Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration in Keratinozytenzellkultur-Medium kann die Bildung von Adhärenz-Kontakten und Desmosomen stimuliert werden [60–62].

Die PLC, welche Phosphatidylinositoldiphosphat (PIP_2) in Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) spaltet, ist signifikant bei der Ca^{2+} -induzierten Keratinozytendifferenzierung beteiligt und aktiviert wiederum die PKC über DAG und Ca^{2+} [63,64]. Es konnte ein schneller, PLC-abhängiger Anstieg von IP_3 und Ca^{2+} durch PV-IgG gezeigt werden [65]. PKC- α , einer der fünf in Keratinozyten exprimierten Subtypen der PKC,

ist außerdem entscheidend an der Differenzierung und Proliferation der Epidermis beteiligt [66,67]. Weiterhin ist bekannt, dass eine PKC-Aktivierung zu geschwächter Zell-Zell-Adhäsion führt und die PKC beim Auf- und Abbau von Desmosomen beteiligt ist sowie Keratinmoleküle phosphoryliert, was zu einem erhöhten Umsatz von Keratinfilamenten und einer Instabilität der Desmosomen führt [68–70]. Die PKC aktiviert wiederum die p38-MAPK über MAP3-Kinasen (MAP3K, MAPKKK) und inhibiert das G-Protein *Ras homologue* (Rho) A wie in den nächsten Kapiteln weiter beschrieben [59,71].

1.4.2.2 Signalkaskade um die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase

Ein weiterer wichtiger Signalweg beinhaltet die p38-MAPK. Diese wird generell durch Umwelteinflüsse wie UV-Strahlung, oxidativen Stress und Zytokine aktiviert und reguliert die Transkription inflammatorischer Zytokine. Für Keratinozyten ist die Expression von nur drei der vier p38-MAPK-Subtypen (α , β und δ) bekannt [72]. Die Aktivierung erfolgt über MAPK-Kinasen (MAP2K, MAPKK) und deren Kinasen (MAP3K), aber auch weitere andere Moleküle sind beteiligt [73]. *Downstream* finden sich u. a. die MAPK-aktivierte Proteinkinase 2 (MK2, MAPKAPK2), Hitzeschock-Protein (Hsp) 27, p53-Protein, der *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF κ B) und RhoA mit ihren jeweiligen Effektorfunktionen der Zellproliferation und -differenzierung oder Regulation der Apoptose [74].

Es zeigte sich, dass PV-IgG zu einer signifikanten Erhöhung der Phosphorylierung von p38-MAPK und den Molekülen MK2 und Hsp27 *downstream* führt und eine p38-MAPK-Inhibition dies verhindern kann [75]. Die Phosphorylierung von MK2 und Hsp27 reguliert das Aktin- und Keratin-Zytoskelett und trägt somit zur verminderten Zelladhäsion bei PV bei [59,76,77]. Durch Aktivierung der p38-MAPK kommt es wiederum zu einer Dsg-Internalisierung *in vivo*, welche durch Inhibition der p38-MAPK verhindert werden kann [78]. Die p38-MAPK wirkt außerdem im EGFR-Signalweg mit und aktiviert verschiedene Apoptose-Wege sowie RhoA [79–81] (**Kapitel 1.4.2.5**). Die Inhibition der p38-MAPK bei PV wurde bereits in einer kleinen klinischen Studie mit einem allosterischen Inhibitor (KC-706) ausprobiert, welche wegen starker Nebenwirkungen leider frühzeitig abgebrochen werden musste, aber in etwa 50% der Fälle zumindest eine partielle Remission zeigen konnte [59]. Auch zeigte sich eine verminderte Blasenbildung im humanen Vollhautmodell nach Inkubation mit einem p38-MAPK-Inhibitor und anschließender Injektion von PV-IgG [82].

1.4.2.3 Signalkaskade um den *epidermal growth factor receptor*

Auch der EGFR ist bei einer Vielzahl von zellulären Prozessen in Keratinozyten beteiligt [59,83]. Seine Aktivierung bewirkt den Ablauf der PI3K/Akt-Signalkaskade (**Kapitel 1.4.2.4**) sowie über das G-Protein *Rat sarcoma* (Ras), die MAP3K *Rapidly accelerated fibrosarcoma* (Raf) und die MAP2K 1/2 (MEK1/2) eine Aktivierung der *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) 1/2, welche wiederum wichtig für die epidermale Differenzierung sind [74,84].

Gaudry *et al.* zeigten, dass Plakoglobin durch EGFR-Aktivierung phosphoryliert wird und zu einer verminderten Assoziation und damit Destabilisierung der Desmosomen führt [85]. Sowohl durch PV-IgG als auch nur durch anti-Dsg3-Antikörper konnte eine Aktivierung von EGFR ausgelöst werden [79,86,87]. Diese Aktivierung fand dabei aber *downstream* einer gleichzeitigen Aktivierung der p38-MAPK statt [39,86]. p38-MAPK-unabhängig kommt es durch PV-IgG zur Sekretion von *epidermal growth factor* (EGF) und anderen Mediatoren, die wiederum Src, die fokale Adhäsionskinase und mTOR über EGFR aktivieren und schließlich zur Aktivierung von Kaspase 3 und 9 führen, deren Einfluss auf die Blasenbildung bei PV diskutiert wird [38]. Eine Inhibition des EGFR konnte weiterhin schon die Blasenbildung *in vivo* und in humanen Hauttransplantaten verhindern [79,88]. Auch die Aktivierung von ERK1/2 u. a. über Src durch PV-IgG sowie eine gesteigerte Zelladhäsion bei ERK1/2-Inhibition ist zumindest für den mukokutanen PV und PF *in vitro* bekannt [89,90]. Die EGFR-Inhibitoren Erlotinib und Lapatinib konnten *in vivo* im neonatalen Mausmodell die Blasenbildung signifikant reduzieren. Dabei zeigte sich keine lineare, sondern V-förmige Dosis-Wirkungs-Kurve [91] (**Kapitel 4.2**).

1.4.2.4 Signalkaskade um die Phosphoinositid-3-Kinase

Aus der Phosphoinositid-3-Kinase(PI3K)-Familie lassen sich vor allem die Subtypen p110 α und p110 β in Epithelien finden [92]. Sie vermitteln Zellüberleben und Mitose über Rezeptortyrosinkinasen und Ereignisse der Zelladhäsion Ca²⁺-abhängig über Cadherine wie Dsg und E-Cadherin [93–95]. Die Aktivierung der PI3K erfolgt u. a. über EGFR, andere Rezeptortyrosinkinasen oder Zytokine. Das bei der Zelladhäsion beteiligte Transmembranprotein E-Cadherin zeigte sich als wichtiger EGFR-unabhängiger Aktivator der PI3K [96].

Es kommt zu einer Aktivierung der Serin-Threoninkinase Akt *downstream* der PI3K. Akt-abhängig werden das *Forkhead-Box*-Protein (Fox) O sowie der *Bcl-2-antagonist of cell death* (BAD) phosphoryliert und damit inhibiert und indirekt das Zellüberleben über den Tumorsuppressor p53 gefördert [97]. Von der PI3K abhängig ist auch die Phosphoinositid-

abhängige Kinase (PDK) 1, welche wiederum Akt und PKC-Isoenzyme als Substrate hat und eine wichtige Rolle bei der Schichtung und Differenzierung von Epithelien spielt [98].

1.4.2.5 Signalkaskade um das G-Protein *Ras homologue A*

Für die kleinen GTPasen der Rho-Familie ist eine Beteiligung bei der Reorganisation des Zytoskeletts, der Zellpolarität, der Morphogenese und Zellmigration bekannt [99]. Rho und Rac werden für den Aufbau von Desmosomen benötigt [100]. Die p38-MAPK befindet sich *downstream* von RhoA, ihre Aktivierung bewirkt wiederum eine Inhibierung von RhoA.

Die Aktivierung von RhoA kann das PV-IgG-induzierte Zusammenziehen von Keratinfilamenten sowie die konsekutiv verminderte Zelladhäsion verhindern [101,102]. Die PV-induzierte Reduktion von RhoA kann durch p38-MAPK-Inhibitoren verhindert werden [81].

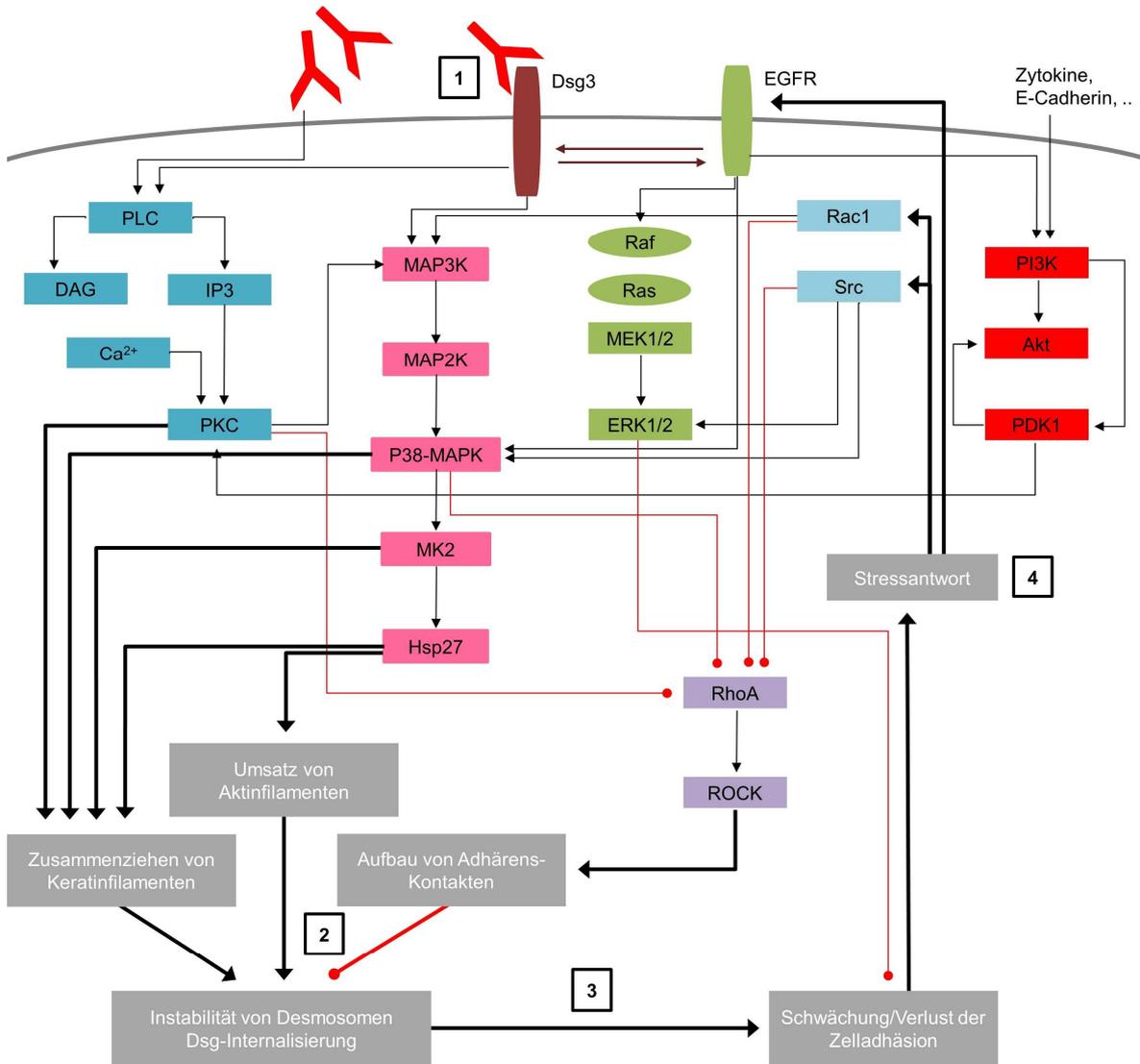


Abb. 1.9: Mögliche Signalkaskaden der Blasenbildung bei Pemphigus vulgaris

Die Bindung desmosomaler und nicht-desmosomaler Autoantikörper (1) führt zu einer Aktivierung von diversen intrazellulären Signalkaskaden. Hierbei kommt es u. a. zur Aktivierung der Signalwege um die Proteinkinase C (PKC), die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38-MAPK), den *epidermal growth factor receptor* (EGFR), das G-Protein RhoA und die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) wie in Kapitel 1.4.2 ausführlich beschrieben. Diese aktivieren sich wiederum untereinander. Letztendlich wird dadurch ein Zusammenziehen von Keratinfilamenten, ein erhöhter Umsatz von Aktinfilamenten und eine Inhibition des Aufbaus von neuen Adhärenz-Kontakten innerhalb der Keratinozyten bewirkt (2). Dies führt zu einer Instabilität der Desmosomen mit konsekutiver Internalisierung von Desmoglein (Dsg) 3 und dem Verlust der Zelladhäsion (3). Die hierdurch in der Zelle hervorgerufene Stressantwort führt zu einer positiven Rückkopplung und verstärkten Aktivierung der beteiligten Signalkaskaden (4). Schwarze Pfeile zeigen eine Aktivierung an, rote Pfeile eine Inhibierung. Akt: Serin-Threoninkinase, Ca²⁺: Calcium, DAG: Diacylglycerin, ERK1/2: *Extracellular signal-regulated kinase*, Hsp27: Hitzeschockprotein 27, IP₃: Inositoltriphosphat, MAP2K: MAP-Kinase-Kinase, MAP3K: MAP-Kinase-Kinase-Kinase, MEK1/2: MAPK/ERK-Kinase 1/2, MK2: MAPK-aktivierte Proteinkinase 2, PDK1: Phosphoinositid-abhängige Kinase 1, PLC: Phospholipase C, Rac: G-Protein der Rho-Familie, Raf: *Rapidly accelerated fibrosarcoma*, Ras: *Rat sarcoma*, ROCK: Rho-Kinase, Src: *Sarcoma*.

Abbildung modifiziert nach [59].

1.5 Zielsetzung

Mit den bisherigen Therapieoptionen ist PV, welcher mit einer Blasenbildung in der basalen Schicht der Epidermis einhergeht, unzureichend zu behandeln. Die notwendige systemische Immunsuppression ist mit vielen Nebenwirkungen und einer stark herabgesetzten Lebensqualität für die Betroffenen verbunden. Daher werden dringend neue Ansätze gesucht, die direkt an der Pathophysiologie von PV ansetzen und den Verlust des Zell-Zell-Kontaktes durch u. a. Dsg3-Internalisierung verhindern.

In einer vorangegangenen Arbeit wurde die Selleckchem *Target Selective Inhibitory Library* durch Sarah Flaswinkel auf ihren Einfluss auf die Dsg3-Internalisierung gescreent. Dabei ergaben sich 20 Substanzen, die die Internalisierung in Anwesenheit von IgG von PV-Patienten hemmten. Bei den gefundenen Substanzen handelt es sich um selektive Inhibitoren diverser Signalmoleküle.

Die durch Sarah Flaswinkel an spontan immortalisierten humanen Keratinozyten (*human adult low calcium high temperature*, HaCaT) begonnenen Experimente sollten in dieser Arbeit fortgesetzt werden. Da bei PV Autoantikörper allein ausreichend für die Blasenbildung sind und keine weiteren Zellen des Immunsystems benötigt werden, ist es sinnvoll, den genaueren Pathomechanismus und die beteiligten Signalkaskaden in Keratinozyten genauer zu untersuchen, um in Zukunft spezifische Therapieoptionen entwickeln zu können. Deshalb konzentrieren sich die Versuche dieser Arbeit auf Keratinozyten.

Hierbei haben sich folgende Fragestellungen ergeben:

1. Haben die Substanzen einen zytotoxischen Effekt auf Keratinozyten?
2. Können die Substanzen die Autoantikörper-vermittelte Keratinozytendissoziation bei Anwesenheit von PV-IgG *in vitro* inhibieren?
3. Lassen sich die bei HaCaT-Zellen generierten Ergebnisse auf primäre Keratinozyten übertragen?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
CO ₂ -Inkubator Heracell240i	Thermo Fisher Scientific, Pinneberg, Deutschland
Feinwaage Analytical Plus	OHAUS, Parsippany, USA
Gefrierbehälter Nalgene Mr. Frosty	Thermo Fisher Scientific, Pinneberg, Deutschland
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr-International S.A., Bulle, Schweiz
Gefrierschrank (-80°C)	Sanyo Component Europe GmbH, München, Deutschland
Geldokumentationssystem	Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell, Deutschland
Kühlschrank (4°C)	Liebherr-International S.A., Bulle, Schweiz
Megafuge Heraeus 1.0 R	Thermo Fisher Scientific, Pinneberg, Deutschland
Mikroplattenleser Victor 3	Perkin Elmer, Waltham, USA
Mikroskop Wilovert S	Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikrozentrifuge Sigma 1-14	Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz, Deutschland
NanoPhotometer NP80	Implen GmbH, München, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf, Deutschland
Pipetten Eppendorf Research® Plus (0,5-10 µL, 2-20 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL)	Eppendorf GmbH, Eppendorf, Deutschland
Präzisionswaage Standard	OHAUS, Parsippany, USA

Sicherheitswerkbank Kojair Biowizard	Kojair Tech Oy, Vilppula, Finnland
Sicherheitswerkbank LaminAir	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Vortex Genie-2	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Wasserbad	Köttermann-Labortechnik, Uetze, Deutschland
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf GmbH, Eppendorf, Deutschland

2.1.2 Zellen und Inhibitoren

Zellen	Hersteller
<i>Human adult low calcium high temperature</i> (HaCaT), spontan immortalisierte humane Keratinozyten	Cell Lines Services, Eppelheim, Deutschland
<i>Normal human epidermal keratinocytes</i> (NHEK), adult, Einzelspender <u>Spender 1</u> : 52 Jahre, männlich, Kaukasier, Abdomen <u>Spender 2</u> : 60 Jahre, weiblich, Kaukasier, Brust	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
<i>Target Selective Inhibitory Library</i> (je 10 mM)	Selleckchem, München, Deutschland

2.1.3 Reagenzien

Reagenzien/Chemikalien	Hersteller
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Albumin Fraktion V (BSA), biotinfrei	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
<i>Cryo</i> -serumfreies Medium (<i>Cryo</i> -SFM)	PromoCell, Heidelberg, Deutschland

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Dispase (5 U/mL)	STEMCELL Technologies, Köln, Deutschland
<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> (DPBS), ohne Magnesium, Calcium und Phenolrot	Thermo Fisher Scientific, Pinneberg, Deutschland
Ethanol 70% (vergällt)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fetales bovines Serum (FBS)	Biowest, Nuaille, Frankreich
<i>Hank's balanced salt solution</i> (HBSS), mit Calcium, Magnesium, Glucose und Natriumbicarbonat, ohne Phenolrot	Thermo Fisher Scientific, Pinneberg, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Keratinocyte Growth Medium 2</i> (KGM 2)	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
<i>Keratinocyte Growth Medium 2 Supplement Mix</i>	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Kristallviolett-Lösung	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/10 mg/mL)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Roti®-Histofix 4%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (2 N)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Trypsin/EDTA (0,04%/0,03%)	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (0,05%/0,02%)	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
CELLSTAR® Zellkultur-Multiwellplatte, 12 Wells	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
CELLSTAR® Zellkultur-Multiwellplatte, 96 Wells	Thermo Fisher Scientific, Pinneberg, Deutschland
CryoPure-Röhrchen	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
Pasteur-Glaspipette	Karl-Hecht GmbH, Sondheim, Deutschland
Pipettenspitzen (Biosphere® Filter Tips)	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
Reagenzgefäße (15 mL, 50 mL)	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 mL, 2,0 mL)	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL)	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen T25, T75, T175	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
Zentrifugen-Filtereinheit Ultrafree-MC, 0,22 µm	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland

2.1.6 Software

Software	Hersteller
GraphPad Prism 8	GraphPad Software, La Jolla, USA
ImageJ	NIH, USA
Microsoft Office	Microsoft, Redmond, USA
VISIONCapt	Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Immunapheresematerial

Für diese Studie liegt ein positives Gutachten der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck vor (Antragsnummer 12-178, siehe Anhang).

Das verwendete Immunapheresematerial stammte von PV-Patienten, die in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins in Lübeck behandelt wurden. Nach dem Auftauen wurde zunächst mit 0,22- μ m-Zentrifugen-Filtereinheiten steril filtriert [12.000 x Gravitationsfeldstärke (g), 10 Minuten (min), Raumtemperatur (RT)] und anschließend die IgG-Konzentration im NanoPhotometer bestimmt. Die dadurch ermittelten Konzentrationen im steril filtrierten Material wurden als Ausgangswert für die Berechnung der jeweils benötigten Menge im Nachweisverfahren für Keratinozytendissoziation verwendet. Zur Lagerung wurde das Material anschließend aliquotiert und dann bis zur Verwendung bei -20 Grad Celsius ($^{\circ}$ C) gelagert.

Die Seren zeichneten sich, wie in **Tab. 2.1** zu erkennen, alle durch einen hohen Dsg3-Titer und einen vorhandenen Dsg1-Titer im ELISA aus.

Tab. 2.1: Spender des Immunapheresematerials

Daten von Vanessa Krull, modifiziert. PV: Pemphigus vulgaris, Alter: Alter des Patienten bei Materialentnahme, Dsg1: Desmoglein1-Titer im *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), Dsg3: Desmoglein3-Titer im ELISA, m: männlich, w: weiblich.

Tab. 2.1: Spender des Immunapheresematerials

PV-Spender	Geschlecht	Alter	Dsg1 (U/mL)	Dsg3 (U/mL)
4.1	w	51 Jahre	191	436
3.2	w	63 Jahre	3096	1945
5.2	m	69 Jahre	7513	21050
10.1	w	39 Jahre	33	33
11.2	m	51 Jahre	1140	9197
16.2	m	64 Jahre	175	1918
24.3	m	85 Jahre	1226	1806
29.2	m	33 Jahre	113	15537
32.2	w	43 Jahre	159	1239
34.1	m	64 Jahre	487	1946
35.1	m	35 Jahre	377	3676
36.2	w	35 Jahre	78	3164
38.1	w	69 Jahre	10	3108

2.2.2 Selleckchem *Target Selective Inhibitory Library*

Die *Target Selective Inhibitory Library* von Selleckchem enthält 141 verschiedene Substanzen, die verschiedene Zielmoleküle intrazellulärer Signalkaskaden inhibieren. Die Firma Selleckchem verspricht dabei eine minimale Nebenaktivität gegenüber anderen möglichen Zielen intrazellulärer Signalwege, also eine hohe Spezifität. Struktur, mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) und spezifischer Wirkort der Inhibitoren sind bekannt. Alle Substanzen sind in 100% Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und werden bei -80°C bis zur Verwendung gelagert. Zielstrukturen der Substanzen sind u. a. mTOR, MAP-Kinasen, *vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR) und weitere.

In dieser Arbeit wurden 20 zuvor selektierte Substanzen aus dieser Library verwendet (**Tab. 2.2**).

Tab. 2.2: Verwendete Inhibitoren der Selleckchem *Target Selective Inhibitory Library*

Akt: Serin-Threoninkinase, BCR-ABL: Fusionsgen aus *Breakpoint cluster region* und *Abelson murine leukemia viral oncogene homologue*, CDK: Cyclin-abhängige Kinase, CETP: Cholesterinester-Transferprotein, DNA-PK: DNA-abhängige Proteinkinase, EGFR: *Epidermal growth factor receptor*, ERK: *Extracellular signal-regulated kinase*, FGFR: *Fibroblast growth factor receptor*, FLT: *Fms-related receptor tyrosine kinase*, Fyn: Tyrosinkinase, GPR40: *G-protein-coupled receptor 40*, GSK3: Glykogensynthase-Kinase 3, HDAC8: *Histone deacetylase 8*, IGF-1R: *Insulin-like growth factor 1 receptor*, IKK: I κ B α -Kinase-Komplex, JNK: c-Jun-N-terminale Kinase, LRRK2: *Leucine-rich repeat kinase 2*, MEK: MAPK/ERK-Kinase, mTOR: *Mechanistic target of rapamycin*, p38-MAPK: p38-mitogenaktivierte Proteinkinase, PARP: Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase 1, PDGFR: *Platelet-derived growth factor receptor*, PDK: 3-Phosphoinositid-abhängige Kinase, PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase, PI4K: Phosphoinositid-4-Kinase, PKC: Proteinkinase C, PLK: *Polo-like kinase*, Raf: *Rapidly accelerated fibrosarcoma*, sPLA2: sezernierte Phospholipase A2, Src: *Sarcoma*, TBK1: *TANK-binding kinase*, TrkA: Tropomyosinrezeptorkinase A, VEGFR: *Vascular endothelial growth factor receptor*.

Inhibitor	Hauptzielstruktur	Weitere Zielstrukturen
A66	PI3K (p110- α)	PI3K-C2 β , PI4K β
Aliskiren hemifumarate	Renin	-
BGJ398 (Infigratinib)	FGFR	-
BIRB796 (Doramapimod)	p38-MAPK	C-Raf, JNK2 α 2, BCR-ABL
BX-795	PDK1	TBK1/IKK ϵ
Enzastaurin (LY317615)	PKC β	GSK3 β ^{ser9} , S6S240/244, AktThr308
Evacetrapib (LY2484595)	CETP	-
Fasiglifam (TAK-875)	GPR40	-
GW441756	TrkA	C-Raf, CDK2, LRRK2
Iniparib (BSI-201)	PARP1	-
Linsitinib (OSI-906)	IGF-1R	Insulinrezeptor
MK2206	Akt1/2/3	-
NU7441 (KU-57788)	DNA-PK	PI3K
PCI-34051	HDAC8	-
Rapamycin (Sirolimus)	mTOR	-
Rigosertib (ON-01910)	PLK1	PLK2, PDGFR, FLT1, BCR-ABL, Fyn, Src, CDK1

Selumetinib (AZD6244)	MEK1	MEK2, ERK1/2
TGX-221	PI3K (p110- β)	PI3K (p110- δ)
Vandetanib (ZD6474)	VEGFR2	VEGFR3, EGFR
Varespladib (LY315920)	sPLA2 (IIa, V und X)	-

2.2.3 Kultur von HaCaT-Zellen

Als Modell für die Epidermis wurde zunächst eine spontan immortalisierte, humane Keratinozytenzelllinie (HaCaT-Zellen) in Kultur verwendet. Diese wurden in T175-Zellkulturflaschen bei 37°C, 5% Kohlenstoffdioxid (CO₂) mit dem Zellkulturmedium *Keratinocyte Growth Medium 2* (KGM 2) mit dem dazugehörigen *Supplement Mix* und 0,06 Millimolar (mM) Calciumchlorid (CaCl₂) sowie 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Diese Mischung wird nachfolgend als KGM 2 bezeichnet.

Zum Passagieren der HaCaT-Zellen wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen mit vorgewärmtem Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (0,05%/0,02%) bei 37°C vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Die Trypsinaktivität wurde daraufhin mit fetalem bovines Serum (FBS) abgestoppt und die entstandene Zellsuspension in ein Reagenzgefäß gegeben und zentrifugiert (6 min, 1200 U/min, RT). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in vorgewärmten KGM 2 erneut aufgenommen und bei obigen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde danach verworfen und die Zellen in KGM 2 aufgenommen.

Zum erneuten Kultivieren wurden die Zellen in einer Konzentration von etwa 5x10⁴ Zellen/mL in den T175-Zellkulturflaschen ausgesät.

2.2.4 Kultur von primären humanen Keratinozyten

Als primäre humane Keratinozyten wurden *normal human epidermal keratinocytes* (NHEK-Zellen) verwendet. Diese befanden sich beim Auftauen in Passage 2 und wurden bis zur Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert. Als Zellkulturmedium wurde erneut KGM 2 verwendet, allerdings ohne den Zusatz von 1% Penicillin/Streptomycin während der Kultivierung.

Die Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad für 2 min aufgetaut. Direkt danach wurden die verwendeten Zellen (500.000 Zellen/1 mL) mit KGM 2 verdünnt und jeweils in bereits im Brutschrank vorgewärmte T25-Zellkulturflaschen mit KGM 2 gegeben, sodass sich bei der Aussaat eine Dichte von etwa 5000 Zellen/cm² ergab. Danach wurden die Zellen bei 37°C,

5% CO₂ inkubiert und nach spätestens 24 Stunden (h) der erste Mediumwechsel mit frischem KGM 2 durchgeführt. Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 80% mit regelmäßigem Mediumwechsel (alle 2 Tage) inkubiert und daraufhin passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen durch kurzes Schwenken mit *Dulbecco's phosphate buffered saline* (DPBS) gewaschen. Nach erneutem Absaugen wurde Trypsin/EDTA (0,04%/0,03%) hinzugegeben und das Ablösen der Zellen bei RT unter dem Mikroskop beobachtet. Nach dem Ablösen nahezu aller Zellen wurden die restlichen Zellen mit DPBS vom Boden gespült, die Zellsuspension in ein Reagenzgefäß gegeben und zentrifugiert (3 min, 220 x g, RT). Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in KGM 2 resuspendiert. Daraufhin wurden sie in der Neubauer-Zählkammer gezählt und zum erneuten Aussäen und Kultivieren auf eine Dichte von 3500-5000 Zellen/cm² eingestellt.

Zur Lagerung der Zellen (Passage 4) in flüssigem Stickstoff wurden diese wie oben beschrieben gewaschen, abgelöst und der Vorgang mit DPBS gestoppt. Nach dem Zentrifugieren wurden die Zellen in *Cryo-serumfreiem Medium* (*Cryo-SFM*) aufgenommen und ausgezählt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit *Cryo-SFM* auf eine Zellkonzentration von 1x10⁶ bzw. 5x10⁵ Zellen/mL verdünnt und in CryoPure-Röhrchen gegeben. Diese wurden direkt in den Gefrierbehälter ohne Schwamm gestellt und ca. 40 h bei -80°C gelagert. Anschließend wurden die Zellen bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.5 Thiazolylblau-Tetrazoliumbromid-Nachweisverfahren

2.2.5.1 Prinzip

Mit dem Thiazolylblau-Tetrazoliumbromid-Nachweisverfahren kann die metabolische Aktivität von Zellen und somit ihre Viabilität gemessen werden. Dabei wird gelbes, wasserlösliches 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT) zu blau-violett, wasserunlöslichen Formazan umgesetzt. Dies geschieht durch mitochondriale Reduktasen und ist abhängig von Nikotinamidadenindinukleotid (NADH) und Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) und korreliert somit mit der Glykolyserate der Zellen, also der Zellaktivität. Mit dem MTT-Nachweisverfahren sollte die Toxizität der 20 Inhibitoren überprüft werden, indem nach Inkubation mit den Inhibitoren die Zellviabilität mit der Negativkontrolle verglichen wurde.

2.2.5.2 Durchführung

Für das MTT-Nachweisverfahren wurde eine 96-Well-Multiwellplatte mit HaCaT-Zellen in der Konzentration von 10-15x10⁴ Zellen/mL, suspendiert in KGM 2, versehen. Die Zellsuspension wurde hergestellt wie in **Kapitel 2.2.3** beschrieben. Es wurden jeweils 100

Mikroliter (μL) der Zellsuspension in jedes Well pipettiert und für 24 h bei 37°C , 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert.

Nach Ablauf der 24 h wurden die Inhibitoren in Dreifachbelegung und den Konzentrationen $10\ \mu\text{M}$, $1\ \mu\text{M}$ und $0,1\ \mu\text{M}$ getestet. Die Verdünnungen wurden dabei mit KGM 2 hergestellt. Als Negativkontrolle diente 0,1% Dimethylsulfoxid (DMSO) in KGM 2, als Positivkontrolle 1% Triton-X-100 in KGM 2, beides ebenfalls in Dreifachbelegung. Zum Vergleich wurden weiterhin Wells mit KGM 2 ohne Zellen sowie mit Zellen angesetzt. Das Medium des Vortages wurde hierfür abgesaugt und die Platte mit je $100\ \mu\text{L}$ der jeweiligen Substanz für 24 h bei 37°C , 5% CO_2 inkubiert.

Am Folgetag wurden die Überstände erneut verworfen und die Platte mit jeweils $100\ \mu\text{L}$ MTT-Lösung für 2 h bei 37°C , 5% CO_2 inkubiert. Die MTT-Lösung wurde hierfür 1:10 mit KGM 2 verdünnt. Nach Ablauf der 2 h wurde die Reaktion mit jeweils $100\ \mu\text{L}$ 0,04 N Salzsäure/Isopropanol-Lösung pro Well gestoppt und die entstandenen Formazankristalle durch Pipettieren zerstört. Dabei waren nun die Wells der Negativkontrollen mit zu erwartender hoher Zellviabilität blau-violett gefärbt, während die der Positivkontrollen bei toxischen Bedingungen gelb blieben. Die Platte wurde anschließend im gelben Farbspektrum bei 570 Nanometer (nm) im Mikroplattenleser gemessen (**Abb. 2.1**). Die Wells der Negativkontrollen ergaben hohe Absorptionswerte und die der Positivkontrollen niedrige Werte.

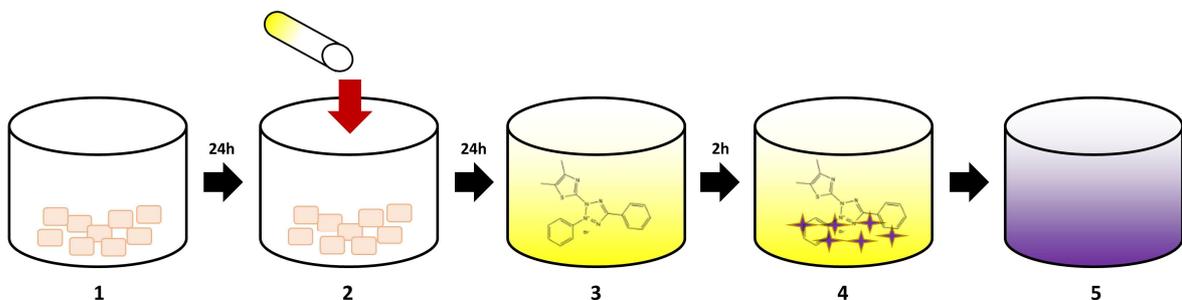


Abb. 2.1: Ablauf des Thiazolylblau-Tetrazoliumbromid-Testverfahrens

(1) Kultivierung von spontan immortalisierten humanen Keratinozyten (*human adult low calcium high temperature*, HaCaT) für 24 Stunden (h), (2) Zugabe der Inhibitoren für 24 h, (3) Inkubation mit Thiazolylblau-Tetrazoliumbromid-Lösung für 2 h, (4) Ausfällung von Formazankristallen, (5) Abstoppen der Reaktion, Lösen der Kristalle und Messung bei 570 nm.

2.2.6 Nachweisverfahren zur Keratinozytendissoziation

2.2.6.1 Prinzip

Mit dem Nachweisverfahren zur Keratinozytendissoziation soll der Pathomechanismus von PV *in vitro* nachempfunden werden. Hierbei dienen HaCaT-Zellen und NHEK-Zellen als Einzelzellschicht von Keratinozyten als Modell für die Epidermis. Durch die Zugabe von IgG von PV-Patienten kommt es zur Dsg3-Internalisierung und Dissoziation der Keratinozyten, deren Ausmaß durch Ablösen des Zellteppichs vom Untergrund mit dem Enzym Dispase und einem anschließenden mechanischen Reiz beurteilt werden soll. Getreu der *in-vivo*-Situation soll dabei die Zellschicht ohne Zugabe pathogenen Serums intakt bleiben, während es bei Dsg3-Internalisierung durch PV-IgG zu einer Fragmentierung kommt. Durch Zugabe der verwendeten Inhibitoren von Selleckchem soll die Wirksamkeit dieser Inhibitoren auf die Anzahl der entstehenden Fragmente validiert werden. Die Keratinozytendissoziation wird durch anschließende Blaufärbung der Zellfragmente (**Abb. 2.2**) verdeutlicht.

2.2.6.2 Durchführung

Für das Nachweisverfahren zur Keratinozytendissoziation wurden $5-10 \times 10^4$ Zellen pro Well auf einer 12-Well-Multiwellplatte in 1 mL KGM 2 ausgesät. Für die HaCaT- und NHEK-Zellen wurde KGM 2 mit 1% Penicillin/Streptomycin verwendet. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz der Platte bei 37°C, 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Alle 2 Tage wurde frisches Medium auf die Zellen gegeben. Sobald eine zufriedenstellende Konfluenz (95-100%) erreicht war, wurde das alte Medium abgesaugt und durch 500 µL frisches Medium mit hoher Calcium-Konzentration (*HighCa²⁺*-Medium) ausgetauscht, um eine Zelldifferenzierung und die Bildung von Desmosomen zu induzieren [19]. Dieses Medium setzte sich aus KGM 2, dem zugehörigen *Supplement Mix* sowie 1,5 mM CaCl₂ zusammen.

Die Zellen wurden nun für genau 22 h mit *HighCa²⁺*-Medium im Brutschrank bei 37°C inkubiert und anschließend für 2 h mit 10 µM, 1 µM und 0,1 µM der Inhibitoren in 0,1% DMSO/*HighCa²⁺*-Medium inkubiert.

Anschließend wurde das Immunapheresematerial eines PV-Patienten mit *HighCa²⁺*-Medium auf 2 mg/mL verdünnt. Dabei musste bei der Berechnung der Flüssigkeitsmenge auf die zusätzliche Zugabe der Inhibitoren geachtet werden. Die Verdünnungen wurden nach Ablauf der 2 h Inkubation und Absaugen des alten Mediums auf die Zellen pipettiert und erneut die Inhibitoren in der zuvor verwendeten Konzentration dazugegeben. Als Positivkontrolle diente dabei jeweils das auf der Platte verwendete Patientenmaterial mit

0,1% DMSO, als Negativkontrolle *HighCa*²⁺-Medium. Die Platte wurde nun erneut für 24 h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert.

Nach Beendigung der 24 h wurden die Wells zweimal mit HBSS gewaschen und anschließend für 15-30 min mit 1,25 U/Well Dispase-Lösung bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Die verwendete Dispase-Lösung wurde dafür mit *Hank's balanced salt solution* (HBSS) verdünnt. Die Dauer der Inkubation war vom Ablösen der Zellschicht abhängig und wurde engmaschig kontrolliert. Sobald sich eine der Zellschichten vom Boden der Platte gelöst hatte, wurde diese erneut zweimal vorsichtig mit HBSS gewaschen und das Well dann mit jeweils 1 mL HBSS aufgefüllt. Nach dem Ablösen und Waschen aller Zellschichten wurden diese mit einer 1-mL-Pipette fünfmal vorsichtig auf und ab pipettiert und damit mechanischem Stress ausgesetzt. Die dafür verwendeten Pipettenspitzen wurden zuvor 10-15 min in 1% bovinem Serumalbumin (BSA) in HBSS beschichtet, um ein Anheften der Zellen in der Pipettenspitze zu vermeiden. Anschließend wurden jeweils 100 µL 4% Roti®-Histofix zur Fixation und 1 µL 1% Kristallviolett zur Färbung hinzugegeben.



Abb. 2.2: Beispiel des Nachweisverfahrens zur Keratinozytendissoziation

Dargestellt ist das Beispiel einer Platte mit ihrer entsprechenden Plattenbelegung (NK: Negativkontrolle, PK: Positivkontrolle). Zu sehen sind die abgelösten Zellteppiche nach mechanischem Stressreiz und Blaufärbung wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben. Ein einzelner Zellteppich sollte bei der NK entstehen, während bei der PK mit pathogenem Immunapheresematerial von Patienten mit Pemphigus vulgaris (PV) multiple Fragmente entstehen. Damit lässt sich dann die Fragmentierung der mit Inhibitor inkubierten Wells vergleichen, wobei eine verminderte Fragmentenzahl (siehe Selumetinib) für eine Inhibierung der pathogenen Wirkung des PV-Immunglobulin G spricht.

Die Wells wurden anschließend nach 1-2 Tagen mit dem Geldokumentationssystem fotografiert und die entstandenen Zellfragmente manuell mit ImageJ ausgezählt (**Abb. 2.3**). Dabei blieb die Negativkontrolle optimalerweise ein einziges Fragment, während sich bei der Positivkontrolle mit pathogenem Immunapheresematerial multiple Fragmente zählen ließen. Die Fragmentzahl der Wells mit den Inhibitoren wurde zur Positivkontrolle normalisiert und sollte bei positiver Wirkung verringert sein.

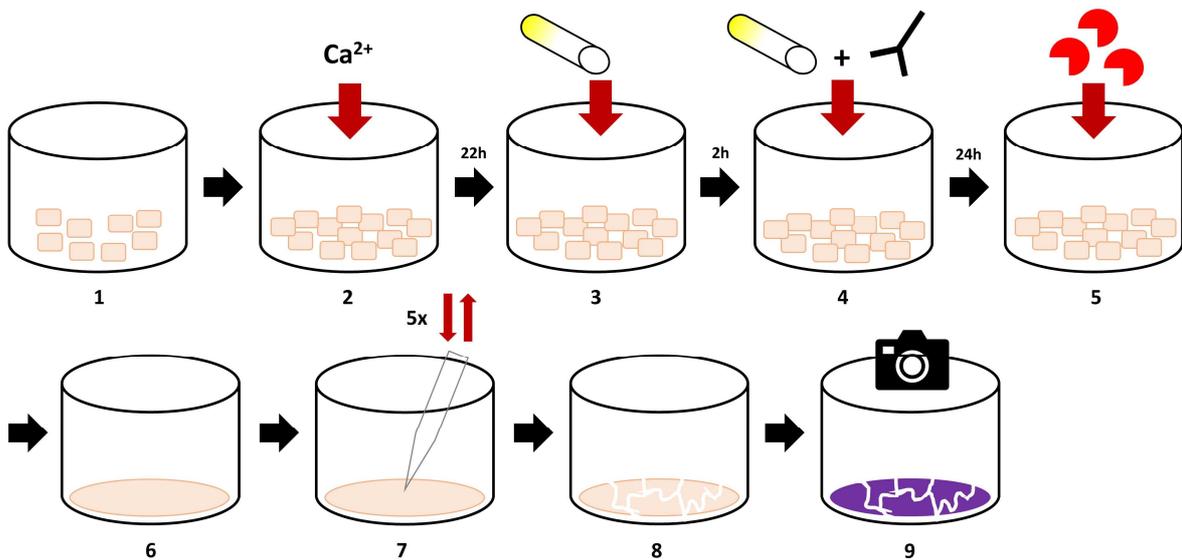


Abb. 2.3: Ablauf des Nachweisverfahrens zur Keratinozytendissoziation

(1) Kultivierung von spontan immortalisierten humanen Keratinozyten (*human adult low calcium high temperature*, HaCaT) bzw. NHEK-Zellen (*normal human epidermal keratinocytes*), (2) Inkubation mit 1,5 mM Calcium bei 95-100% Konfluenz für 22 Stunden (h), (3) Zugabe der Inhibitoren für 2 h, (4) Zugabe von Pemphigus-vulgaris-Immunglobulin G und Inhibitoren für 24 h, (5) Inkubation mit Dispase, (6) Ablösen der Zellschicht vom Boden der Petrischale, (7) mechanischer Stress durch Auf- und Abpipettieren, (8) Fragmentierung der Zellschicht und (9) Färbung mit Kristallviolett sowie Fotodokumentation wie in Kapitel 2.2.6 genauer beschrieben.

2.2.7 Auswertung und Statistik

Die Dateneingabe und Normalisierung gegen die Positivkontrolle erfolgte in Microsoft Office Excel. Für die anschließende graphische Darstellung und statistische Auswertung wurde GraphPad Prism 8 verwendet.

Bei der Auswertung des Nachweisverfahrens zur Keratinozytendissoziation wurden die fünf unabhängigen Gruppen (NK, PK, Substanz in Konzentration 0,1 μ M, 1 μ M und 10 μ M) jeweils mit dem nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test verglichen und anschließend der Dunn's Post-Hoc-Test für multiple Vergleiche verwendet. Als Signifikanzniveau wurde $p \leq 0,05$ festgelegt. Die Darstellung erfolgte als Streudiagramm mit Mittelwert.

Die Auswertung des MTT-Nachweisverfahrens erfolgte nach Messung bei 570 nm im Mikroplattenleser ebenfalls in Microsoft Office Excel und GraphPad Prism 8. Es wurde jeweils 100% Zellviabilität der Negativkontrolle angenommen und die restlichen Werte dazu normalisiert. Da die Stichprobengröße mit $n=3$ keine statistische Auswertung zuließ, erfolgte lediglich eine graphische Darstellung als Streudiagramm mit Mittelwert.

Die ermittelten p-Werte wurden bei Signifikanz folgendermaßen gekennzeichnet:

- * $p \leq 0,05$
- ** $p \leq 0,01$
- *** $p \leq 0,001$
- **** $p \leq 0,0001$

3 Ergebnisse

3.1 Zytotoxische Auswirkungen der Inhibitoren auf die Viabilität von HaCaT-Zellen

Für die verwendeten 20 Inhibitoren der Selleckchem *Target Selective Inhibitory Library* wurde zuvor bereits eine Verminderung der Dsg3-Internalisierung sowie der Fragmentzahl im Nachweisverfahren zur Keratinozytendissoziation herausgearbeitet.

Es sollten nun vor einer weiteren funktionalen Validierung zunächst die zytotoxischen Eigenschaften gegenüber HaCaT-Zellen untersucht werden. Dazu wurde das MTT-Nachweisverfahren verwendet, bei dem die Zellviabilität durch den Farbumschlag von MTT zu Formazan bei verbliebener metabolischer Aktivität der Zellen gemessen werden kann. Die gemessenen Absorptionen wurden für jede Platte zur Negativkontrolle normalisiert und die relative Zellviabilität graphisch zusammengefasst.

Aufgrund der geringen Stichprobengröße zeigte die statistische Auswertung keine signifikanten Unterschiede, die graphische Darstellung und das makroskopische Aussehen ließen aber dennoch deutliche Aussagen zur Toxizität zu.

Wie in **Abb. 3.1** dargestellt, zeigten 17 der 20 untersuchten Inhibitoren keinen zytotoxischen Effekt auf die HaCaT-Zellen. Die Zellviabilität blieb in allen drei getesteten Konzentrationen ausreichend erhalten.

Ergebnisse

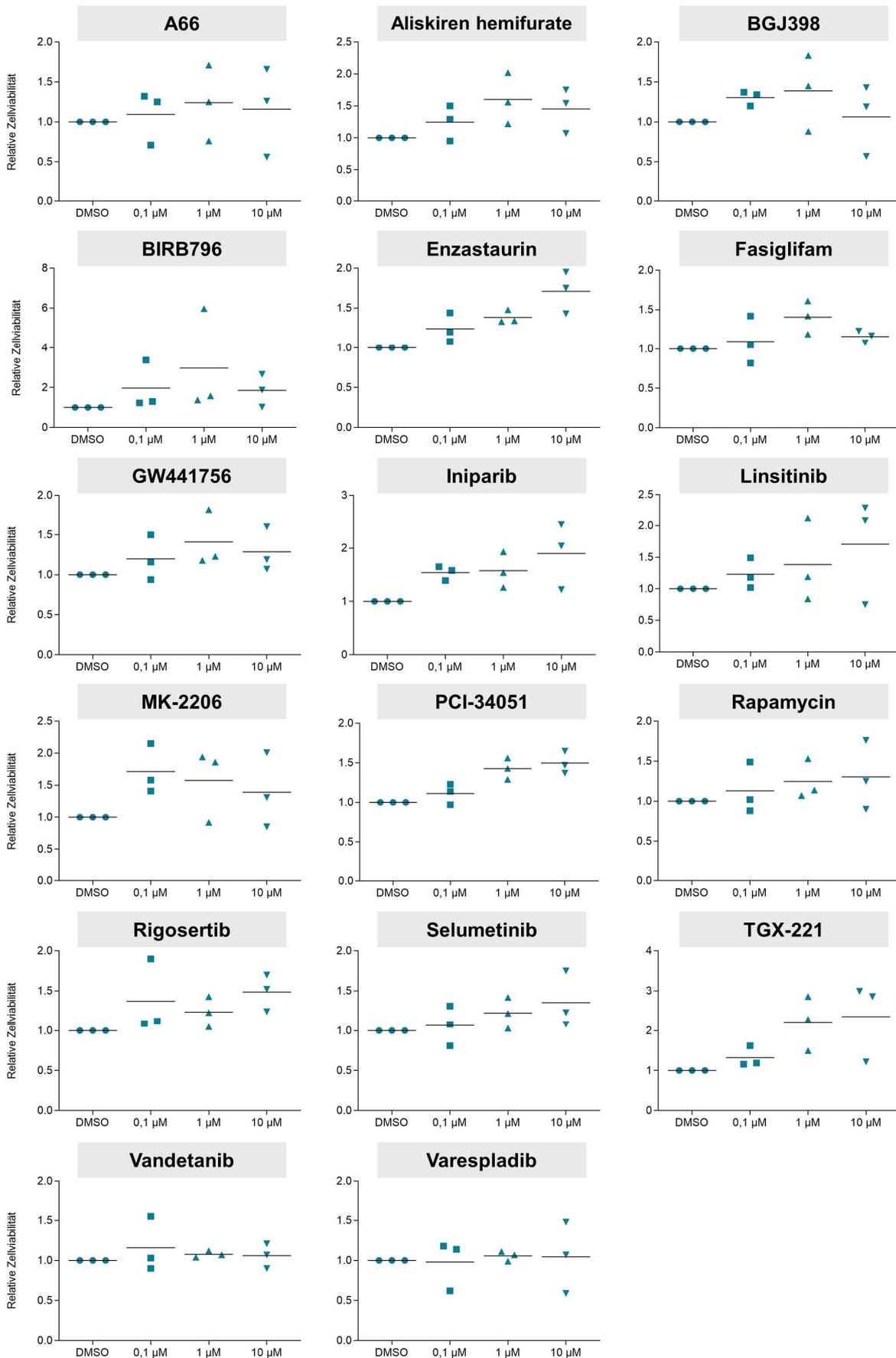


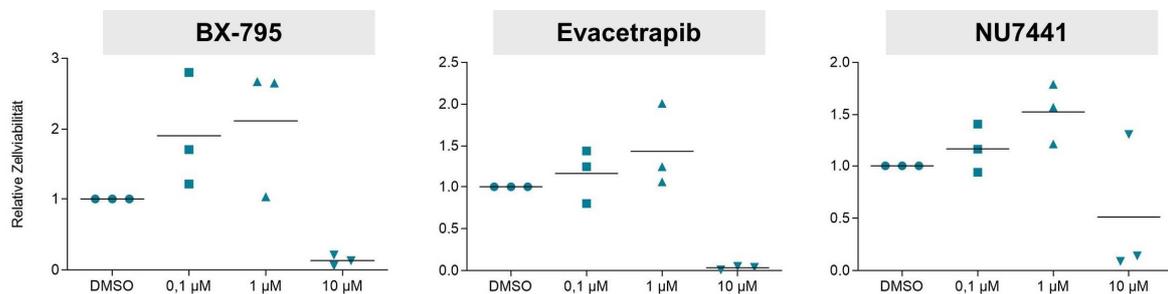
Abb. 3.1: Gute Viabilität der HaCaT-Zellen nach Inkubation mit den Inhibitoren

Legendertext s. nächste Seite.

Abb. 3.1: Gute Viabilität der HaCaT-Zellen nach Inkubation mit den Inhibitoren

Die Inhibitoren wurden auf spontan immortalisierten humanen Keratinozyten (*human adult low calcium high temperature*, HaCaT) inkubiert und anschließend der Farbumschlag von Thiazolylblau-Tetrazoliumbromid (MTT) zu Formazan gemessen wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben. Die Absorptionen wurden zur Negativkontrolle [0,1% Dimethylsulfoxid (DMSO)] normalisiert. 17 der 20 Inhibitoren zeigten keine Reduktion der relativen Zellviabilität. n=3, Streudiagramm mit Mittelwert.

Im Gegensatz dazu zeigten 3 der 20 Inhibitoren, BX-795, Evacetrapib und NU7441, eine dosisabhängige Zytotoxizität gegenüber den HaCaT-Zellen (**Abb. 3.2**). Diese war bereits makroskopisch durch die fehlende Umsetzung zum blau-violetten Formazan in der höchsten Inhibitorkonzentration sichtbar.

**Abb. 3.2: Toxische Effekte auf die HaCaT-Zellen nach Inkubation mit den Inhibitoren**

Nach Inkubation der spontan immortalisierten humanen Keratinozyten (*human adult low calcium high temperature*, HaCaT) mit den Inhibitoren wie in Kapitel 2.2.5 erfolgte die Behandlung mit Thiazolylblau-Tetrazoliumbromid (MTT) und anschließende Messung des Farbumschlags zu Formazan. Diese drei Inhibitoren zeigten eine deutliche Reduktion der relativen Zellviabilität, normalisiert zur Negativkontrolle [0,1% Dimethylsulfoxid (DMSO)], in der Konzentration von 10 µM. n=3, Streudiagramm mit Mittelwert.

Dieses Ergebnis ließ eine weitere Validierung aller 20 Substanzen zu, BX-795, Evacetrapib und NU7441 wurden aber nur noch in den beiden geringeren, nicht-zytotoxischen Konzentrationen (0,1 µM und 1 µM) mitgeführt.

3.2 Einfluss der Inhibitoren auf die Autoantikörpervermittelte Keratinozytendissoziation

Nach Ausschluss von drei Inhibitoren in der Konzentration von 10 µM erfolgte die weitere Validierung der Inhibitoren, deren positiver Einfluss auf die Dsg3-Internalisierung bereits in Vorversuchen getestet worden war, hinsichtlich des Einflusses auf die Auflösung des Zell-Zell-Verbandes von Keratinozyten im Nachweisverfahren zur Keratinozytendissoziation.

3.2.1 Testung des Immunapheresematerials auf die Keratinozytendissoziation

Vor der Validierung der 20 Inhibitoren wurde das PV-Immunapheresematerial auf seine Wirkung auf die Keratinozytendissoziation bei HaCaT-Zellen getestet. Dabei wurden 4 von 13 PV-Patienten aufgrund geringer resultierender Fragmentzahl im verwendeten Nachweisverfahren vom weiteren Versuchsablauf ausgeschlossen (**Tab. 3.1**). Das Material der anderen 9 PV-Patienten wurde in der Konzentration 2 mg/mL in den weiteren Versuchen verwendet.

Tab. 3.1: Testung des Immunapheresematerials

Die Immunglobulin(Ig)G-Konzentration des Immunapheresematerials wurde mit dem NanoPhotometer bestimmt (Kapitel 2.2.1). Anschließend wurden die Seren in allen Versuchen in einer Konzentration von 2 mg/mL verwendet und die absolute Fragmentzahl aller Positivkontrollen im Nachweisverfahren zur Keratinozytendissoziation bei spontan immortalisierten humanen Keratinozyten (*human adult low calcium high temperature*, HaCaT) gemittelt. Die grau hinterlegten PV-Spender wurden aufgrund geringer Fragmentzahl von den darauf folgenden Versuchen ausgeschlossen.

Tab. 3.1: Testung des Immunapherese-materials

PV-Spender	IgG-Konzentration	Fragmentzahl (σ)
3.2	67,56 mg/mL	1,5
4.1	81,99 mg/mL	2,5
5.2	39,41 mg/mL	58,5
10.1	96,83 mg/mL	27,4
11.2	96,68 mg/mL	31,6
16.2	55,34 mg/mL	14,5
24.3	61,35 mg/mL	32,8
29.2	78,72 mg/mL	36,1
32.2	99,24 mg/mL	21,1
34.1	67,49 mg/mL	1
35.1	128,09 mg/mL	3,5
36.2	69,26 mg/mL	66,2
38.1	66,28 mg/mL	62,2

3.2.2 Induktion der Keratinozytendissoziation bei HaCaT-Zellen

Die Validierung der 20 Inhibitoren erfolgte in den drei Konzentrationen 0,1 μ M, 1 μ M und 10 μ M mit jeweils 8-9 PV-Spendern pro Substanz. Die Fragmentierung der einzelnen Wells wurde zur Positivkontrolle der jeweiligen Platte normalisiert. Als Positivkontrolle wurde das PV-Immunapherese-material des jeweiligen Spenders mit 0,1% DMSO verwendet, als Negativkontrolle *HighCa²⁺*-Medium.

Anhand der Fragmentierung ließen sich die Inhibitoren in drei Gruppen unterteilen. Gruppe 1 (**Abb. 3.3**) umfasste die 7 Inhibitoren, die keine signifikante Verringerung der Fragmentzahl erreichen konnten: Aliskiren hemifurate, Evacetrapib, Iniparib, NU7441, PCI-34051, TGX-221 und Varespladib.

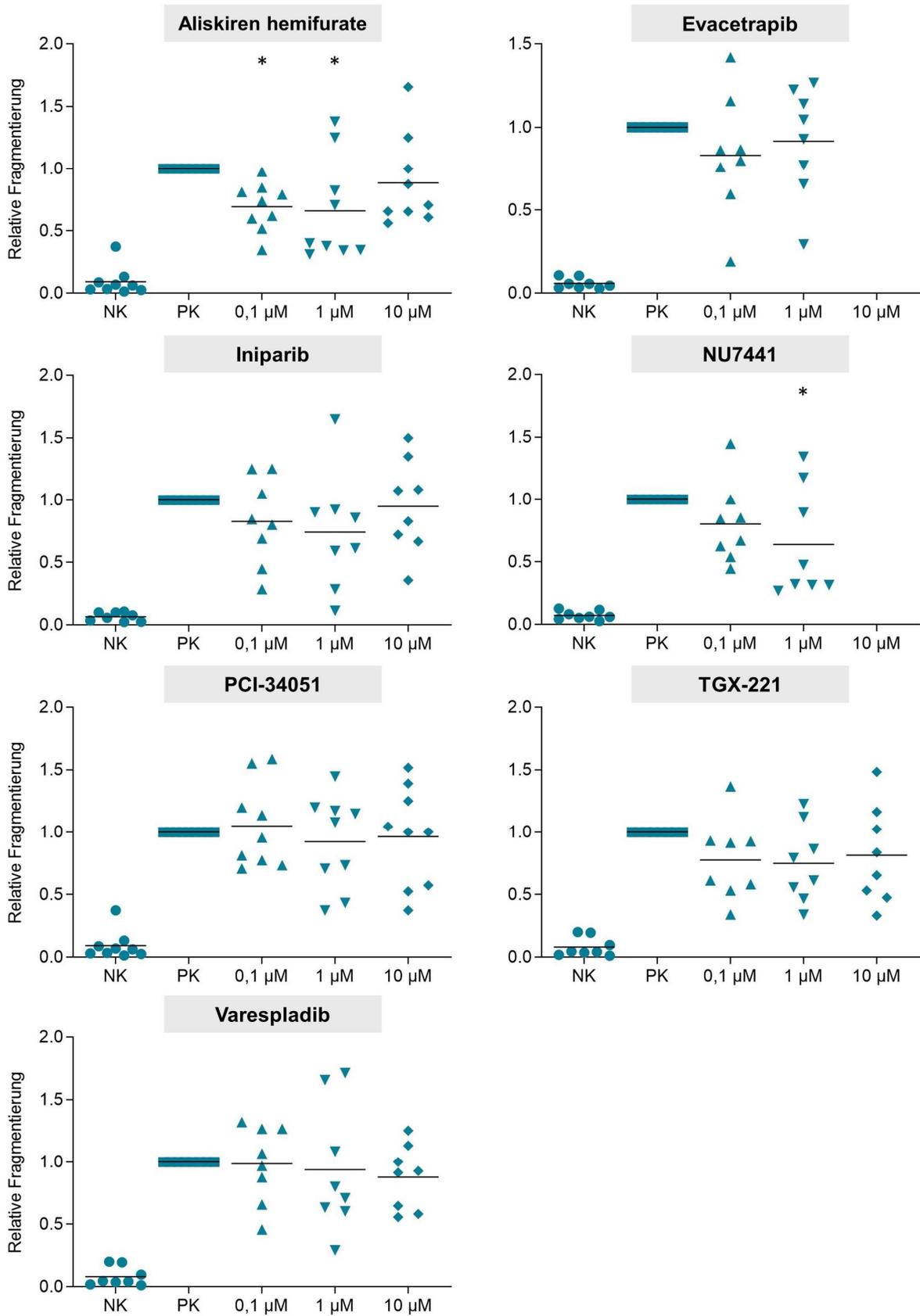


Abb. 3.3: Inhibitoren der Keratinozytendissoziation ohne Reduzierung der Fragmentzahl
 Legendentext s. nächste Seite.

Abb. 3.3: Inhibitoren der Keratinozytendissoziation ohne Reduzierung der Fragmentzahl

Die Inhibitoren wurden jeweils in den drei Konzentrationen mit 8-9 Pemphigus-vulgaris-Spendern auf ihre Wirkung auf die Keratinozytendissoziation getestet. Dazu wurde nach Inkubation mit den Substanzen und dem PV-Immunglobulin(Ig)G mechanischer Stress auf die abgelösten Zellschichten ausgeübt wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben. Als Negativkontrolle (NK) diente *Keratinocyte Growth Medium 2* mit hoher Calcium-Konzentration, als Positivkontrolle (PK) PV-IgG mit 0,1% Dimethylsulfoxid (DMSO), zu welcher anschließend normalisiert wurde. Die Fragmentzahl der NK unterschied sich jeweils signifikant von der PK. Die 7 hier dargestellten Inhibitoren konnten die Fragmentierung nicht signifikant verringern. Lediglich Aliskiren hemifurate und NU7441 zeigten eine leichte Reduktion der Fragmentzahl. n=8-9, Streudiagramm mit Mittelwert, Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Post-Hoc-Test (*, $p \leq 0,05$; Signifikanz zur PK).

Davon unterschied sich Gruppe 2 (**Abb. 3.4**) mit nicht eindeutigen Ergebnissen wie einer Erhöhung der Fragmentzahl durch bisher unbekannte Mechanismen: BGJ398, Enzastaurin, Fasiglifam, MK-2206, Linsitinib, Rapamycin und Rigosertib.

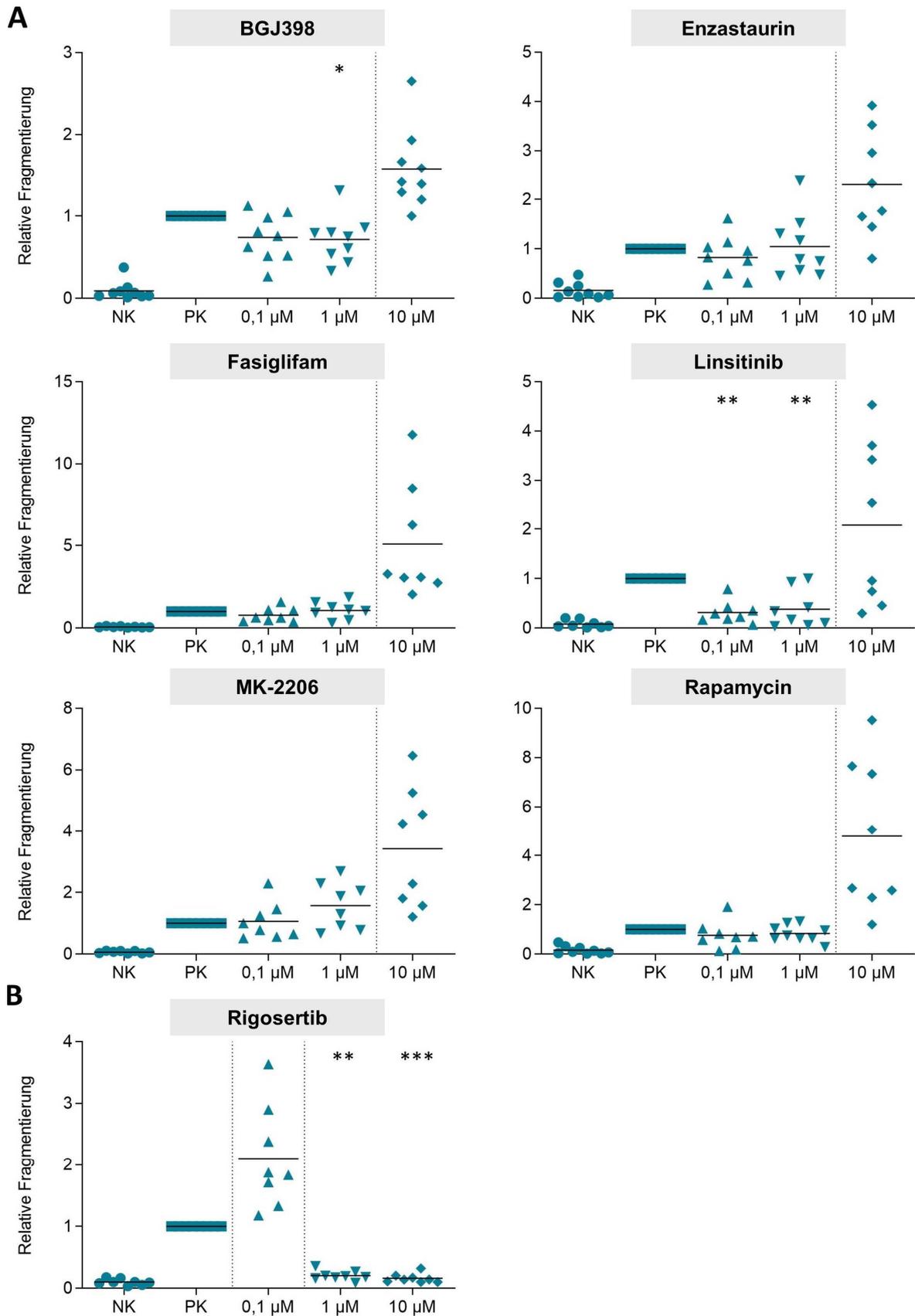


Abb. 3.4: Inhibitoren der Keratinozytendissoziation mit unklarem Effekt

Legendertext s. nächste Seite.

Abb. 3.4: Inhibitoren der Keratinozytendissoziation mit unklarem Effekt

Abgebildet ist erneut die relative Fragmentierung im Nachweisverfahren zur Keratinozytendissoziation. Die Durchführung und Darstellung erfolgte analog zum Legendentext der Abb. 3.3. Die Inhibitoren in dieser Gruppe hatten Effekte auf die Keratinozytendissoziation, die unklar blieben. Zum einen zeigten sie beispielsweise zwar eine teils signifikante Verringerung der Fragmentzahl in den beiden niedrigeren Konzentrationen, dann aber eine starke Erhöhung der Fragmentzahl im Vergleich zur Positivkontrolle (PK) in der höchsten Konzentration (BGJ398, Linsitinib). Enzastaurin, Fasiglifam, MK-2206 und Rapamycin zeigten dagegen nur eine Erhöhung der Fragmentzahl in der Konzentration von 10 μM (**A**). Rigosertib dagegen zeigte eine deutlich verstärkte Fragmentierung in der niedrigsten Konzentration, dann aber eine signifikante Reduktion in den beiden anderen Konzentrationen (**B**). Zur graphischen Verdeutlichung wurde das auffällige Ergebnis jeweils durch einen Balken von den anderen Ergebnissen getrennt. Die Fragmentzahl der Negativkontrolle (NK) unterschied sich jeweils signifikant von der PK. $n=8-9$, Streudiagramm mit Mittelwert, Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Post-Hoc-Test (*, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$; Signifikanz zur PK).

Gruppe 3 (**Abb. 3.5**) enthielt schließlich die 6 Substanzen, die eine signifikante Reduktion der Fragmentierung hervorgerufen haben und damit als vielversprechend weiter untersucht werden sollen: A66, BIRB796, BX-795, GW441756, Selumetinib und Vandetanib.

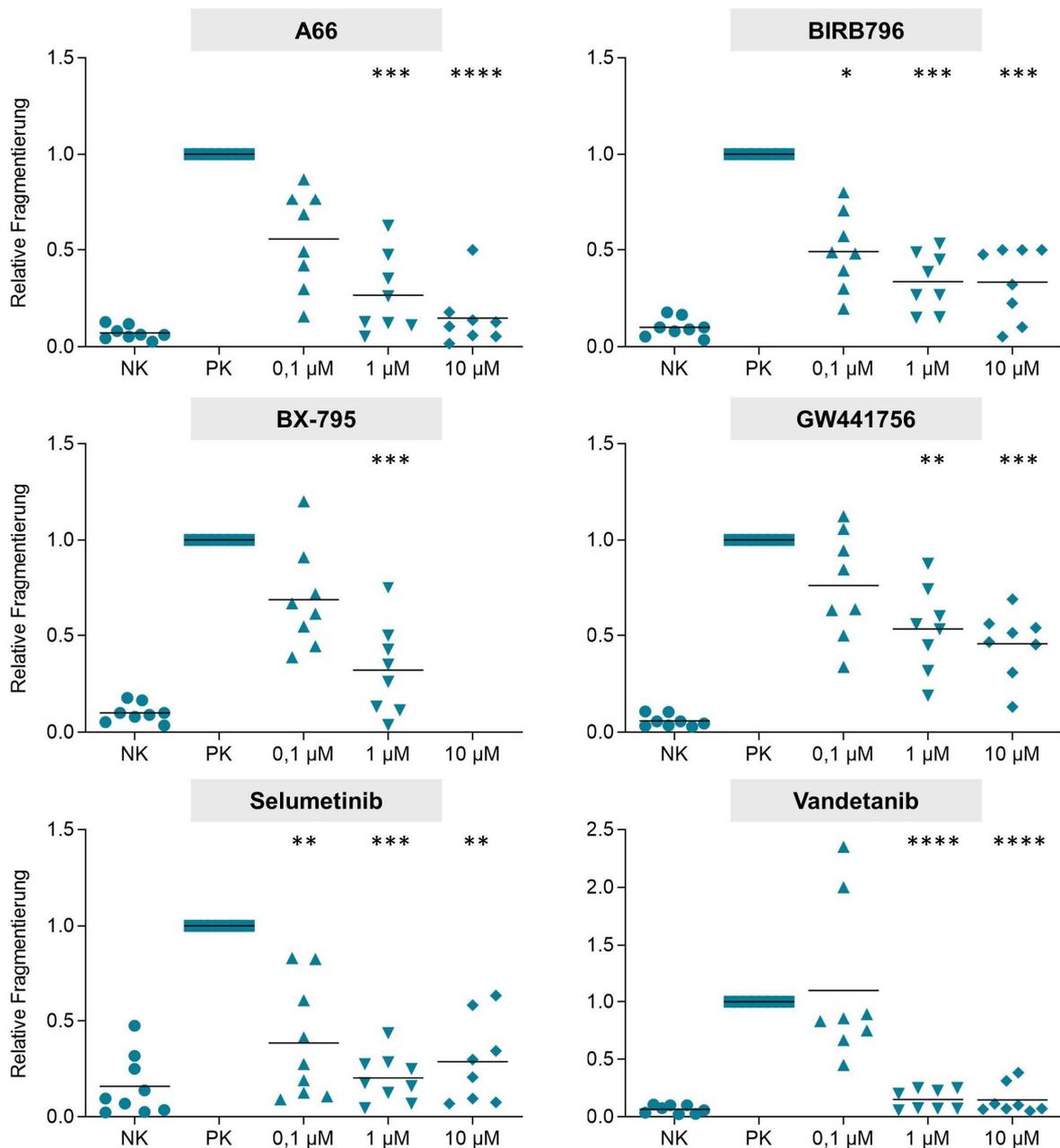


Abb. 3.5: Vielversprechende Inhibitoren der Keratinozytendissoziation

Diese Darstellung wurde analog zu Abb. 3.3 erstellt. Es wird erneut die relative Fragmentierung im Nachweisverfahren zur Keratinozytendissoziation abgebildet. Diese 6 Inhibitoren führten zu einer signifikanten Verringerung der Fragmentierung im Vergleich zur Positivkontrolle (PK). Bei BIRB796 und Selumetinib war das Ergebnis in allen drei Konzentrationen signifikant. Bei A66, BX-795 und GW441756 blieb eine reduzierte Fragmentzahl in der niedrigsten Konzentration zumindest makroskopisch und graphisch auffällig. Die Fragmentierung der Negativkontrolle (NK) unterschied sich jeweils signifikant von der PK. $n=8-9$, Streudiagramm mit Mittelwert, Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Post-Hoc-Test (*, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$; ****, $p \leq 0,0001$; Signifikanz zur PK).

Die 20 Inhibitoren ließen sich folglich in 7 Substanzen ohne Verringerung der Fragmentierung, 7 Substanzen mit unklarem Effekt und 6 Substanzen mit signifikanter Verringerung der Fragmentierung und damit einer Einstufung als vielversprechende Substanzen einteilen.

3.2.3 Induktion der Keratinozytendissoziation bei NHEK-Zellen

Zur Überprüfung der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf primäre Keratinozyten erfolgte eine Validierung an NHEK-Zellen. Aus den vielversprechenden Inhibitoren (**Abb. 3.5**) sind zwei zur Testung ausgewählt worden. Zusätzlich wurde ein Inhibitor (Iniparib) gewählt, der bei HaCaT-Zellen keinen inhibitorischen Effekt auf die Dissoziation zeigte.

Die Testung erfolgte mit NHEK-Zellen von zwei NHEK-Spendern und Autoantikörpern von je drei PV-Patienten (PV 5.2, 32.2 und 36.2), sodass sich insgesamt n=6 ergab. Als Positivkontrolle diente wieder PV-IgG in 0,1% DMSO und als Negativkontrolle KGM 2. Die gezählten Fragmente wurden erneut zur Positivkontrolle normalisiert.

Bei A66 und Selumetinib war die Keratinozytendissoziation wie erwartet in allen drei Konzentrationen signifikant reduziert. Iniparib zeigte wieder lediglich einen signifikanten Unterschied für die Negativkontrolle, aber keinen Unterschied zwischen Positivkontrolle und den getesteten Inhibitorkonzentrationen (**Abb. 3.6**).

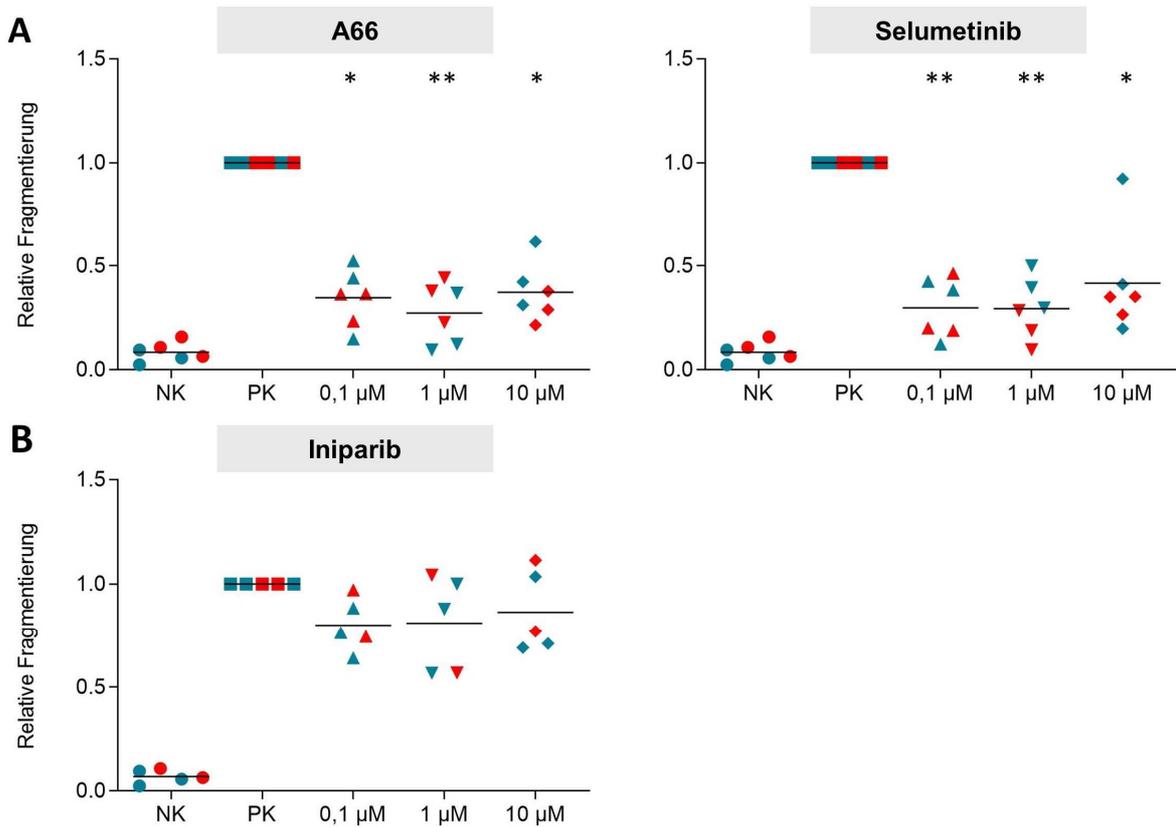


Abb. 3.6: Keratinozytendissoziation bei normal human epidermal keratinocytes

Normal human epidermal keratinocytes (NHEK-Zellen) von zwei NHEK-Spendern (rot: NHEK-Spender 1, blau: NHEK-Spender 2) wurden mit den Substanzen A66, Selumetinib und Iniparib und dem Immunapheresematerial von drei Pemphigus-vulgaris(PV)-Patienten validiert und die Fragmentierung zur Positivkontrolle (PK), *Keratinocyte Growth Medium 2* mit hoher Calcium-Konzentration (*HighCa²⁺*-Medium) mit PV-Immunapheresematerial und 0,1% Dimethylsulfoxid (DMSO) normalisiert wie in Kapitel 2.2.6 genauer beschrieben. Als Negativkontrolle (NK) wurde *HighCa²⁺*-Medium verwendet. Die Reduktion der Keratinozytendissoziation war bei A66 und Selumetinib in allen drei Konzentrationen signifikant (**A**). Iniparib konnte die Fragmentenzahl nicht verringern (**B**). Die Fragmentenzahl der NK unterschied sich jeweils signifikant von der PK. $n=5-6$, Streudiagramm mit Mittelwert, Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Post-Hoc-Test (*, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; Signifikanz zur PK).

4 Diskussion

PV ist eine sehr seltene, aber für die betroffenen Patienten sehr schwerwiegende Erkrankung. Aufgrund ihrer Seltenheit gibt es bisher wenige Möglichkeiten die Krankheit ursächlich zu behandeln. Die Behandlung beruht auf genereller Immunsuppression und der systemischen Elimination der pathogenen Autoantikörper bei refraktären Verläufen. Aktuell erreicht ein Großteil der PV-Patienten unter einer hochdosierten Glukokortikoid-Therapie in Kombination mit Rituximab eine vollständige Remission, allerdings erst nach einer durchschnittlichen Behandlungsdauer von 120-180 Tagen mit gravierenden, eventuell sogar letalen Nebenwirkungen und 20% erreichen nie eine vollständige Remission [16,53].

Ziel dieser Arbeit war es, die Signalkaskaden, die bei der Krankheitsentstehung mitwirken, genauer zu untersuchen, um zukünftig anhand dieser Ergebnisse gezieltere Therapien erarbeiten zu können. Dazu wurden 20 Inhibitoren mit bekannter Wirkung auf zelluläre Signalmoleküle auf ihre Wirkung auf mit PV-IgG behandelte Keratinozyten untersucht. Nach Inkubation der Zellen mit den Inhibitoren sowie pathogenem PV-IgG wurden die Zellschichten mechanischem Stress ausgesetzt, der bei alleiniger Anwesenheit von PV-Autoantikörpern zu einer Fragmentierung der Zellschicht geführt hatte. Ohne Anwesenheit von pathogenem IgG blieb die Zellschicht dagegen intakt. Anschließend konnte nun die Fragmentzahl der mit Inhibitor behandelten Keratinozyten-Zellschicht mit derjenigen von Keratinozyten, die nur mit PV-IgG in Kontakt gekommen waren, verglichen werden. Nach Ausschluss von drei Inhibitoren in der höchsten verwendeten Konzentration, da diese die Zellviabilität von Keratinozyten in einem Vorversuch signifikant erniedrigten, fanden sich zwei Substanzen, die die Fragmentierung der Keratinozyten in allen drei Konzentrationen verringern konnten. Vier weitere hatten einen signifikanten Effekt in zwei der drei Konzentrationen. Sieben andere Inhibitoren zeigten bisher unklare Steigerungen der Fragmentierung.

Im Folgenden sollen die 6 vielversprechenden Substanzen weiter hinsichtlich ihrer möglichen Pathophysiologie und klinischen Bedeutung erläutert und diskutiert sowie eine mögliche Erklärung für die bisher unklaren Effekte gefunden werden. Auch wird ein Ausblick auf die Identifikation neuer Angriffspunkte und die Weiterentwicklung anderer Therapieansätze gegeben.

4.1 Bedeutung der vielversprechenden Inhibitoren

Der PI3K-Inhibitor **A66** konnte die Keratinozytendissoziation in Gegenwart von PV-IgG signifikant in zwei der drei getesteten Konzentrationen bei HaCaT- und in allen drei Konzentrationen bei NHEK-Zellen reduzieren. Interessanterweise bestätigte sich auch in einem humanen Haut-Organkultur-Modell des PV eine dosisunabhängige, verminderte Blasenbildung nach Koinjektion von A66 und *single-chain variable fragments* (scFv) gegen Dsg1 und 3, wie Imke Burmester im Verlauf zeigen konnte [103, 104]. Über die EGFR- oder Cadherin-abhängige Aktivierung von PI3K-Isoformen in Keratinozyten werden u. a. Zellüberleben und -adhäsion reguliert. *Downstream* befinden sich Akt, FoxO, BAD, PDK1, das Protoonkogen *cellular myelocytomatosis* (c-Myc) und weitere Signalmoleküle [93–98] (**Kapitel 1.4.2.4**).

Der potente und spezifische Inhibitor der p110 α -Isoform der PI3K, A66, bindet sowohl Wildtyp- als auch onkogene Formen von p110 α und zeigt nur eine geringe Kreuzreaktivität mit PI3K-Isoformen der Klasse II und keine Inhibition anderer Lipidkinasen oder mTOR. Er ist damit deutlich spezifischer als andere p110 α -Inhibitoren wie PIK-75 und konnte das Tumorstadium bei Tumorzelllinien mit PI3K α -Mutationen *in vivo* signifikant verringern. Es zeigte sich durch seinen Einsatz, dass eine alleinige p110 α -Inhibition ausreichend ist, um die Signalweiterleitung von Wachstumsfaktoren zu blockieren und damit bei einigen Tumoren das Wachstum zu unterbinden [105].

Weitere PI3K-Inhibitoren befinden sich in klinischen Studien für verschiedene Tumorarten. Der PI3K α/δ -Inhibitor Copanlisib zeigte bspw. in einer Phase-II-Studie zu refraktären, multipel vorbehandelten Lymphomen eine signifikante Effektivität [106]. Für die mögliche Therapie von PV wurde bisher hauptsächlich ein Effekt der PI3K-Inhibition in der Regulation von B-Zellen angenommen. Die PI3K δ spielt eine wichtige Rolle bei B-Zellüberleben, -aktivierung und -differenzierung. *Gain-of-function*-Mutationen des entsprechenden Gens konnten mit Autoimmunität in Verbindung gebracht werden, erklärt dadurch, dass der PI3K/Akt-Signalweg inflammatorische und anti-inflammatorische Effekte der B-Zellen ausbalanciert [107]. Ein PI3K δ -Inhibitor (Duvelisib) zeigte sich bereits *in vivo* im Mausmodell des systemischen Lupus erythematoses (SLE) als wirksam [108]. Weitere befinden sich in klinischen Studien für das Sjögren-Syndrom. Eine begonnene Phase-II-Studie für Paraclisib bei PV musste bei mangelndem Interesse der teilnehmenden Patienten ohne aussagekräftige Ergebnisse abgebrochen werden [49].

BIRB796 (Doramapimod) ist ein hochpotenter, oral verfügbarer pan-p38-MAPK-Inhibitor [109]. Er konnte die Keratinozytendissoziation bei HaCaT-Zellen in allen drei Konzentrationen signifikant verringern. Imke Burmester konnte eine dosisabhängige

Reduktion der Fragmentierung an NHEK-Zellen bestätigen und die Inhibition der scFv-induzierten Spaltbildung im humanen Haut-Organkultur-Modell nachweisen [103].

Durch die Inhibition der p38-MAPK werden *downstream* u. a. MK2, Hsp27, NF κ B und RhoA und ihre Funktionen in der Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose gehemmt [74,80,81].

Für p38-MAPK-Inhibitoren ist ein stärkerer Therapieerfolg in der Kombinationstherapie bei u. a. promyeloischer Leukämie, chronischer myeloischer Leukämie und multiplem Myelom sowie ein verbessertes Ansprechen von Chemotherapeutika bei verschiedenen Tumoren *in vitro* und *in vivo* bekannt [110–112]. Speziell BIRB796 befindet sich in Phase-III-Studien für die Behandlung chronischer Inflammation, wobei für Morbus Crohn letztendlich kein klinischer Erfolg nachgewiesen werden konnte [113], und zeigte vielversprechende Effekte bei Psoriasis-Mausmodellen sowie auf psoriatischer Haut *ex vivo* [114].

Bei PV wurde eine reduzierte Blasenbildung sowie verminderte Reduktion der Desmosomenanzahl und -größe im humanen Vollhautmodell bereits für einen anderen p38-MAPK-Inhibitor (SB202190) nachgewiesen [82]. Dagegen zeigte sich in epidermisspezifisch p38 α -defizienten Mäusen eine unveränderte Blasenbildung [115] und eine klinische Studie mit einem p38-MAPK-Inhibitor (KC-706) bei PV-Patienten musste wegen Hepatotoxizität ohne klinischen Erfolg abgebrochen werden (**Kapitel 1.4.2.2**), sodass eher davon auszugehen ist, dass die *downstream*-Aktivierung der p38-MAPK bei PV die Blasenbildung zwar verstärkt, aber keine essentielle Funktion im Pathomechanismus erfüllt. Allerdings wurde hier lediglich ein einziger p38-MAPK-Inhibitor verwendet und die Studie wurde abgebrochen, bevor eine aussagekräftige Anzahl an Patienten getestet werden konnte [116,117]. Daher ist ein therapeutischer Nutzen anderer p38-MAPK-Inhibitoren nicht ausgeschlossen.

Der spezifische PDK1-Inhibitor **BX-795** konnte die Fragmentierung im Nachweisverfahren zur Keratinozytendissoziation bei HaCaT-Zellen signifikant in der Konzentration 1 μ M und zumindest makroskopisch und graphisch auffällig bei 0,1 μ M reduzieren. Die Testung der Konzentration von 10 μ M musste aufgrund einer starken Reduzierung der Zellviabilität im Vorhinein ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse bestätigten sich im Verlauf an NHEK-Zellen. Im humanen Haut-Organkultur-Modell des PV veränderte die Substanz dagegen die Dsg1/3-induzierte Akantholyse nicht [103]. Für BX-795 ist zusätzlich eine Inhibition der TANK-bindenden Kinase (TBK) 1 und I κ B-Kinase (IKK) ϵ und letztlich dadurch eine Produktion von Interferon (INF) β in Makrophagen bekannt [118].

Die PDK 1 aktiviert *downstream* Akt, PKC und weitere Moleküle. Eine Beteiligung des PDK1/Akt-Signalweges mit Überexpression von PDK1 konnte in diversen Tumorarten (u. a. Melanom, Mammakarzinom) festgestellt werden. Dies führt zu einer Suppression von

Apoptosemechanismen und stimuliert die Angiogenese sowie Tumorzellproliferation und -metabolismus [119]. Dennoch hat es bisher kein PDK1-Inhibitor bis in klinische Studien geschafft, weil vermutlich eine alleinige Inhibition der PDK1 nicht ausreicht, sondern die zusätzliche Blockade weiterer Moleküle notwendig ist [120]. Diese Beobachtung deutet daraufhin, dass dies für die potenzielle Verwendung von PDK1-Inhibitoren bei der Therapie des PV ebenfalls gelten könnte. Die unveränderte Akantholyse im Haut-Organkultur-Modell bestätigt den Verdacht, dass eine alleinige Inhibition der PDK1 nicht ausreicht, um die Blasenbildung bei PV zu verringern.

Auch **GW441756** konnte die Fragmentierung bei HaCaT-Zellen in zwei der drei Konzentrationen dosisabhängig signifikant verringern. Bei NHEK-Zellen zeigte sich sogar eine signifikante, dosisabhängige Reduktion in allen Konzentrationen, was sich im Haut-Organkultur-Modell des PV ebenfalls bestätigte [103]. Bei GW441756 handelt es sich um einen selektiven und potenten Tropomyosinrezeptorkinase(Trk)A-Inhibitor mit zusätzlicher Inhibition der *leucine-rich repeat kinase* (LRRK) 2 und geringer Wirkung auf Raf und die Zyklin-abhängige Kinase (CDK) 2.

Die membrangebundene TrkA wird physiologisch mit hoher Affinität durch den *nerve growth factor* (NGF), welcher auch von basalen Keratinozyten synthetisiert und sezerniert wird, aktiviert und vermittelt v. a. Differenzierung und Überleben von Neuronen sowie die Expression von Neurotransmittern [121,122]. Die TrkA befindet sich ebenfalls nur in den basalen Schichten der Epidermis, sodass von einer autokrinen Schleife mit NGF auszugehen ist. Ihre Aktivierung steigert die Zellproliferation und verhindert Apoptose. Eine Inhibition der Phosphorylierung von TrkA durch den Inhibitor K252 konnte einen vermehrten Zelltod *in vitro* zeigen [123,124]. *Downstream* der TrkA befinden sich erneut u. a. die Signalwege um PLC, Ras, PI3K/Akt und Raf/MEK/ERK [125,126]. Bei Psoriasis zeigte sich eine Überexpression von TrkA sowie eine pathologische Verteilung in der gesamten Epidermis. K252 befindet sich hier in Phase-II-Studien zur topischen Anwendung [127]. CT327, ein anderer TrkA-Inhibitor, konnte keine Auswirkungen auf die klinische Ausprägung der Psoriasis, aber auf den begleitenden Pruritus zeigen [128].

Selumetinib (AZD6244) konnte die Fragmentierung sowohl der HaCaT- als auch der NHEK-Zellen in allen drei Konzentrationen signifikant reduzieren. Eine Wiederholung des Versuches mit einem dritten NHEK-Spender durch Imke Burmester konnte die dosisunabhängige Inhibition bestätigen. Auch im humanen Haut-Organkultur-Modell des PV mit zeigte sich eine dosisabhängige, verminderte Blasenbildung nach Koinjektion von Selumetinib und anti-Dsg1/3-scFv. Eine topische Behandlung mit Selumetinib in Basiscreme führte zu einer Reduktion der Spaltbildung um etwa 70% im Vergleich zu einer Reduktion um 90% nach Injektion der Substanz [103].

Bei Selumetinib handelt es sich um einen oral verfügbaren, potenten und selektiven MEK1/2-Inhibitor, der nicht-kompetitiv zu Adenosintriphosphat (ATP) an einer allosterischen Bindestelle bindet und somit die Bindung von ATP verhindert. Selumetinib zeigt keine zusätzliche Wirkung an EGFR, ERK2, *human epidermal growth factor receptor 2* (Her2/neu), MAP2K6, p38-MAPK α , und B-Raf. Durch Aktivierung der MEK1/2 wird die Phosphorylierung von ERK1/2, welches im Zellkern zur Aktivierung diverser Effektorproteine und Transkriptionsfaktoren führt, verhindert [129]. MEK1/2 befindet sich u. a. *downstream* des EGFR (**Kapitel 1.4.2**) und führt über ERK1/2 zu einem Verlust der Zelladhäsion [90].

In präklinischen Studien wirkte Selumetinib hervorragend gegen verschiedene Tumoren v. a. mit B-Raf- und K-Ras-Mutation [111]. Außerdem zeigte sich eine potenzielle T-Zell-Inhibierung. In klinischen Phase-I-Studien zeigte Selumetinib Wirksamkeit gegen verschiedene solide Tumoren wie bspw. Schilddrüsenkarzinome und hat bereits eine Phase-II-Studie für das fortgeschrittene *non-small-cell lung carcinoma* (NSCLC) mit K-Ras-Mutation durchlaufen, welche allerdings keinen langfristigen Vorteil der Kombination mit Docetaxel zur alleinigen Therapie mit Docetaxel zeigen konnte [130–132]. Die topische Behandlung von Neurofibromatose Typ 1 mit Selumetinib wurde erfolgreich in einer Phase II-Studie nachgewiesen [133]. Es sind aus diesen Studien dermatologische Nebenwirkungen ähnlich derer von EGFR-Inhibitoren bekannt. Dazu gehören akneiformer papulopustulöser Ausschlag, Xerosis cutis, Pruritus, Fissuren, Hyperpigmentierung, Stomatitis, Alopezie und Teleangiektasien [134], welche gegebenenfalls problematisch bei der Verwendung in der Behandlung von PV werden könnten. Andere MEK-Inhibitoren (u. a. Trametinib) finden bereits in der Therapie des fortgeschrittenen Melanoms Verwendung oder befinden sich in klinischen Studien [135,136]. Ein potenzieller positiver Effekt der Verwendung von Selumetinib bei PV könnte die erhöhte Wirksamkeit von Glukokortikoiden bei Gabe von MEK/ERK-Inhibitoren sein, da diese eine Tumornekrosefaktor(TNF) α -induzierte Inhibierung der Glukokortikoidrezeptor-Translokation reduzieren können und somit ein erhöhtes Ansprechen bewirken [137].

Der oral verfügbare, selektive Inhibitor des VEGFR2, **Vandetanib** (ZD6474), zeigte eine dosisabhängige, signifikante Reduktion der Keratinozytendissoziation in den Konzentrationen 1 μ M und 10 μ M. In der weiteren Testung an NHEK-Zellen durch Imke Burmester bestätigte sich dieses vielversprechende Ergebnis [103].

VEGFR2 gilt als der dominante Rezeptor für die Wirkung des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) auf Zellpermeabilität, Proliferation und Differenzierung von Endothelzellen und damit auf die Angiogenese und Neovaskularisation in Tumoren [138]. Aber auch eine konstitutive Expression von VEGFR in Keratinozyten und generell Epithelien ist bekannt

[139,140]. *Downstream* der Phosphorylierung des VEGFR2 befinden sich u. a. PKC, Akt und PI3K sowie ERK1/2, deren Beteiligung in der Pathogenese des PV gut bekannt ist [139]. Weiterhin konnte für Vandetanib *in vitro* eine Inhibierung der EGFR-Tyrosinkinaseaktivität in Tumorzellen und eine Wachstumsinhibierung in mehreren humanen Tumorzelllinien, die EGFR, aber nicht VEGFR2 exprimieren, gezeigt werden. Andere Studien haben demonstriert, dass Vandetanib die Wirkung von Docetaxel (*in vitro*) und Paclitaxel (*in vitro* und *in vivo*) auf Tumorzellwachstum potenziert [141]. Vandetanib findet bereits in der palliativen Therapie des medullären Schilddrüsenkarzinoms Verwendung und befindet sich in klinischen Studien für weitere Tumoren [142]. Es treten besonders häufig (bis zu 45%) dermatologische Nebenwirkungen wie Photosensitivität, Rötungen, Akne, Xerosis cutis und Pruritus auf, was wiederum auf die EGFR-Inhibition zurückgeführt wird [143]. Diese zusätzliche EGFR-Wirkung könnte sich also sowohl hilfreich als auch problematisch bis therapielimitierend darstellen. Weitere Erläuterungen hierzu erfolgen in **Kapitel 4.2**.

4.2 Mögliche Effekte der nicht erwarteten Hyperfragmentierung

Die Inhibitoren BGJ398, Enzastaurin, Fasiglifam, MK-2206, Linsitinib und Rapamycin zeigten eine starke Erhöhung der Fragmentzahl im Vergleich zur Positivkontrolle in der höchsten Konzentration (10 μM). Alle diese Substanzen hatten zuvor in der Testung der Zytotoxizität in derselben Konzentration keine Veränderungen der Viabilität von HaCaT-Zellen gezeigt, sodass nicht von einer Hyperfragmentierung durch vermehrten Zelltod sondern durch Verlust des Zell-Zell-Kontaktes auszugehen ist.

Enzastaurin, Fasiglifam, MK-2206 und Rapamycin hatten keinen Effekt auf die Fragmentzahl in den beiden niedrigeren Konzentrationen. Hierbei ist eine selektive Inhibition an der jeweiligen Hauptzielstruktur mit konsekutiver Aktivierung der beteiligten Signalkaskaden wahrscheinlich, die ihr Wirkmaximum erst bei höherer Konzentration erreicht und dann zu einem Verlust der Zelladhäsion führt.

BGJ398 und Linsitinib dagegen zeigten eine signifikante Reduktion der Fragmentierung in den Konzentrationen 0,1 μM und 1 μM (Linsitinib) bzw. nur bei 1 μM (BGJ398). Hierbei könnte das Überwiegen einer unspezifischen Wirkung an weiteren Zielstrukturen mit konsekutiver Verminderung des Zell-Zell-Kontaktes ab einer gewissen Schwellenkonzentration ursächlich sein oder eine nicht lineare, sondern V-förmige Dosis-Wirkungs-Beziehung, wie Sayar *et al.* diese für die EGFR-Inhibitoren Erlotinib und Lapatinib in einem Mausmodell des PV beschrieben haben [91]. Dabei zeigte sich eine optimale Wirkung der Inhibitoren auf die Blasenbildung bei 36-69% der normalen EGFR-Aktivität in der Epidermis. Bei höheren Konzentrationen verstärkte sich die Blasenbildung wieder graduierlich. Diese V-förmige Kurve konnte für beide Inhibitoren *in vivo* und *in vitro* beobachtet werden und bei Mäusen mit EGFR-Deletion fand sich eine verstärkte Blasenbildung in Anwesenheit der Dsg3-Antikörper, sodass nicht von einem *off-target*-Effekt auszugehen ist. Eine mögliche Erklärung ist hierbei die Korrelation mit der Hochregulierung von u. a. c-Myc bei zu niedrigen und zu hohen Konzentrationen von Erlotinib. Es ist bekannt, dass die Signalweiterleitung durch E-Cadherin in Maus-Keratinocyten von der Cadherin-Adhäsion und einer gewissen EGFR-Aktivität abhängt. E-Cadherin wiederum interagiert mit dem EGFR und Dsg3 [96,144], sodass eine zu starke EGFR-Inhibition die Dsg3-Signalweiterleitung stören und die Hochregulierung von c-Myc nach Bindung von PV-Autoantikörpern an Dsg3 zusätzlich verstärken könnte [145]. Diese Beobachtung könnte außerdem die dermatologischen Nebenwirkungen von EGFR-Inhibitoren (**Kapitel 4**) durch verminderte Integrität der Zelladhäsion innerhalb der Epidermis erklären und darauf hindeuten, dass eine genaue Titration der therapeutischen

Dosis bei ihrer Verwendung notwendig ist [91]. Dies könnte sich gerade bei der Behandlung von PV als therapielimitierend darstellen, da ein Verlust der Zelladhäsion das Gegenteil einer gewünschten erhöhten Stabilität der Zell-Zell-Kontakte bedeutet.

BGJ398 ist ein selektiver Inhibitor des *fibroblast growth factor receptor* (FGFR) 1/2/3 und zeigt eine zusätzliche inhibitorische Aktivität gegen VEGFR2 und ABL sowie die Tyrosinkinasen FYN, KIT, LCK, LYN und YES. Die Substanz befindet sich bereits in klinischen Studien für u. a. solide Tumoren mit FGFR-Mutationen sowie als Kombinationstherapeutikum für fortgeschrittene Melanome mit B-Raf-Mutation [146,147]. FGFR spielen eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung, Angiogenese, Metabolismus, endokrinen Prozessen und der Reparatur von Geweben. Dabei unterscheidet sich die Gewebeverteilung der einzelnen Rezeptoren [148,149]. Diese werden durch den *fibroblast growth factor* (FGF) aktiviert und führen zu einer Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden, u. a. PLC/PI3K/Akt, Ras/MEK/ERK und PKC [150,151]. Es findet dabei auch eine negative Rückkopplung über die Aktivierung der *Sprouty*-Proteine 1-4 statt, die die weitere Zellaktivierung durch FGFR verhindern, aber auch z. B. EGFR inhibieren [152]. Die Aktivierung des FGFR führt ebenfalls zu einer Hochregulierung von c-Myc [153,154]. Diese beiden Prozesse könnten gemeinsam die beobachtete Hyperfragmentierung im Nachweisverfahren zur Keratinozytendissoziation bedingt haben.

Linsitinib (OSI-906) ist ein selektiver Inhibitor des *insulin-like growth factor 1 receptor* (IGF1R) mit zusätzlicher Inhibierung des Insulinrezeptors und keiner Wirkung an ABL, EGFR, FGFR1/2, der Proteinkinase A oder weiteren. Die Substanz befand sich in klinischen Studien für verschiedene solide Tumoren [155]. Eine vielversprechende Phase-III-Studie bei adrenokortikalem Karzinom konnte letztendlich aber kein verlängertes Überleben zeigen [156]. Der IGF-1R ist eine Rezeptortyrosinkinase, die durch den *insulin-like growth factor* (IGF) 1 und 2 aktiviert wird und sich in fast allen Geweben nachweisen lässt. IGF1 wird hauptsächlich in der Leber nach Stimulation durch Somatotropin sezerniert. Durch Aktivierung des IGF1R kommt es zu anabolen Effekten im Organismus, d. h. Zellüberleben und -proliferation sowie Wachstum bzw. Hypertrophie von Geweben wie der Skelett- oder Herzmuskulatur werden stimuliert. IGF1 spielt dabei eine entscheidende Rolle während der Embryonalentwicklung. *Downstream* des IGF1R befinden sich u. a. die Signalwege um Ras/MEK/ERK und PI3K/Akt mit konsekutiver Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Myc [157,158]. In der Epidermis lässt sich der IGF1R vor allem in den basalen Schichten finden. Dabei korreliert seine Expression mit dem proliferativen Potenzial, d. h. es kommt zu einer Überexpression in proliferativer Epidermis (Psoriasis, chronische Wunden) und einer geringen Ausprägung in hochdifferenzierten Keratinozyten [159].

Rigosertib (ON-01910) zeigte dagegen eine Hyperfragmentierung im Nachweisverfahren zur Keratinozytendissoziation in der niedrigsten Konzentration (0,1 μM). In den beiden höheren Konzentrationen konnte die Substanz die Fragmentierung signifikant reduzieren. Rigosertib wirkt Ras-mimetisch an verschiedenen Ras-Effektorproteinen und inhibiert dabei u. a. die *polo-like kinase* (PLK) 1 und PI3K. Dabei kommt es zu einem mitotischen Arrest und Apoptose in diversen Tumorzelllinien, während normale humane Zelllinien nicht betroffen sind [160]. Eine Folge ist wahrscheinlich auch die Herunterregulierung von Cyclin D und c-Myc mit einer maximalen Inhibition im Bereich von 0,3-1 μM [161]. Die Substanz konnte in einer Phase-III-Studie für das fortgeschrittene myelodysplastische Syndrom das mediane Überleben signifikant verlängern [162].

Die PLK1 spielt eine wichtige Rolle in der Zellteilung beim Übergang von der G2- in die M-Phase. Sie kann somit v. a. in proliferativen Geweben gefunden werden und wird in diversen Tumoren überexprimiert [163]. Andere PLK1-Inhibitoren wie Volasertib befinden sich ebenfalls in klinischen Studien zur Behandlung von u. a. NSCLC und akuter myeloischer Leukämie [164,165].

4.3 Methodische Diskussion

Im Folgenden sollen mögliche Probleme und Optimierungsansätze der Methoden erläutert werden.

Bei der Auswahl der 20 verwendeten Inhibitoren handelte es sich um Substanzen, die zuvor in einem anderen Modell, einer Immunfluoreszenzmethode zur Dsg3-Internalisierung, gescreent worden waren. Hierbei könnten Substanzen der Library übersehen worden sein, die sich im Nachweisverfahren zur Keratinozytendissoziation als vielversprechend herausgestellt hätten. Es befand sich z. B. ein potenter EGFR-Inhibitor (PD153035) in der Library, von welchem ein Effekt auf die Keratinozytendissoziation zu erwarten wäre [91]. Das Screening mit einer präformierten Library von Substanzen bietet den Vorteil, dass ohne *Bias* neue beteiligte Signalkaskaden entdeckt oder bekannte bestätigt werden können. Dagegen fehlten aber auch Inhibitoren gegen viele bei PV wichtige Signalmoleküle wie Kaspasen, ERK und Src in der Library.

In der Testung der Zytotoxizität der Inhibitoren wurde lediglich ein Screening mit einer niedrigen Anzahl an Wiederholungen bei HaCaT-Zellen vorgenommen, sodass ggf. weitere Substanzen toxische Wirkungen auf Zellen zeigen oder NHEK-Zellen andere Ergebnisse aufweisen könnten. Es wurden daher zunächst nur die Inhibitorkonzentrationen mit schon makroskopisch eindeutiger Zytotoxizität (Gelbfärbung der Wells) ausgeschlossen. Da aber beispielsweise BX-795 in den niedrigeren Konzentrationen eine signifikante Verringerung der Fragmentierung gezeigt hat und somit als potenziell interessanter Inhibitor infrage gekommen wäre, sollte die Testung ggf. wiederholt werden, um fehlerhafte Ergebnisse der Zytotoxizität auszuschließen. Außerdem könnte die Zellviabilität zusätzlich mit weiteren Methoden wie einer durchflusszytometrischen Messung nach Lebend-Tot-Färbung validiert werden.

Bei der Anzucht der Keratinozyten auf den 12-Well-Multiwellplatten gestaltete es sich oftmals schwierig, den optimalen Zeitpunkt für den Start des Versuches zu definieren. Es sollte unbedingt auf eine ausreichende Konfluenz geachtet werden, um eine gute Ausgangsstabilität der Einzelzellschicht zu garantieren, wobei aber eine zu lange Inkubation mit eventuellem Absterben von Keratinozyten auch zu vermeiden ist. Gerade bei den NHEK-Zellen war dieser Zeitpunkt nicht immer leicht zu treffen. Weiterhin musste für die Kultivierung und den Versuchsablauf auf den Einsatz eines Antibiotikums (Penicillin/Streptomycin) im Zellkulturmedium zurückgegriffen werden, um bakterielle Kontaminationen zu vermeiden. Für u. a. Penicillin/Streptomycin ist allerdings ein wachstums- und differenzierungshemmender Effekt auf Keratinozyten bekannt. Dieser

betrifft vor allem die terminale Differenzierung von NHEK-Zellen in Zellkultur. Die Proliferation ist lediglich verlangsamt und die frühe Differenzierung nicht betroffen [166]. Es ist daher ein Einfluss des Antibiotikums auf die generierten Ergebnisse nicht gänzlich auszuschließen. Bei den NHEK-Zellen wurde zumindest während der Kultivierung auf Penicillin/Streptomycin verzichtet, um eine mögliche Verfälschung der Ergebnisse durch Einfluss des Antibiotikums möglichst gering zu halten.

Es wurde sich für die Verwendung von Immunapheresematerial von PV-Patienten entschieden, um die Situation an Patienten bestmöglich abzubilden. Dieses enthält neben Dsg3- meist auch Dsg1-Autoantikörper sowie weitere pathogene Autoantikörper. Im Gegensatz zur Verwendung reiner Dsg3-Autoantikörper müssen die gefundenen Signalkaskaden also nicht zwangsläufig *downstream* des Dsg3 ihre Effekte zeigen, sondern könnten auch durch andere Autoantikörper aktiviert worden sein, wie Walter *et al.* dies bereits beschrieben haben [90].

Bei der Ausübung von mechanischem Stress auf die Zellschicht durch Auf- und Abpipettieren kam es auf eine gleichmäßige und langsame Ausführung an, um das Ausmaß des Stresses über die Versuchsdurchläufe konstant zu halten. Bei verschiedenen Anwendern sollte daher ein gewisser Unterschied bedacht werden, welcher aber durch die Berechnung der relativen Fragmentierung innerhalb einer Platte an Bedeutung verliert. Für bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse könnte aber an einer stabileren, automatisierten Methode für mechanischen Stress gearbeitet werden.

Die Auszählung der Fragmente erfolgte manuell, was sich bei sehr hoher Fragmentzahl als schwierig erwies und von daher mit einer gewissen Ungenauigkeit behaftet ist. Da sehr hohe Fragmentzahlen nur bei den in **Kapitel 4.2** beschriebenen Effekten der Inhibitoren auftraten, war dieser Fehler vernachlässigbar, aber sollte bei zukünftiger Verwendung des Verfahrens durch eine Etablierung automatisierter Zählung der Fragmente ersetzt werden.

Schließlich ist noch zu berücksichtigen, dass der Hauptdurchlauf der Versuche nur an HaCaT-Zellen erfolgte und lediglich die Testung von vielversprechenden Inhibitoren an den NHEK-Zellen, welche primären humanen Keratinozyten entsprechen. Die HaCaT-Zellen könnten dagegen durch ihre Immortalisierung eine abweichende Verteilung intrazellulärer Signalkaskaden aufweisen und damit nur bedingt Rückschlüsse auf die Abläufe in nativen humanen Keratinozyten erlauben. Zur besseren Beurteilung der Reproduzierbarkeit an NHEK-Zellen wurde Iniparib als Substanz ohne Reduktion der Keratinozytendissoziation getestet und konnte dieses Ergebnis ebenfalls reproduzieren.

4.4 Ausblick

Die in dieser Arbeit entstandenen Ergebnisse bilden bereits einen wichtigen Schritt in der Erforschung neuer Therapieoptionen des PV, indem durch die Testung der Inhibitoren im Zellkulturmodell einige potenziell wirksame Substanzen eingegrenzt werden konnten. Als nächste Schritte erfolgten bereits die Vervollständigung der Versuche zur Keratinozytendissoziation bei NHEK-Zellen sowie eine Testung im humanen Haut-Organkultur-Modell des PV. Hierbei bestätigten sich die in dieser Arbeit bereits generierten Ergebnisse an HaCaT- und NHEK-Zellen. Lediglich BX-795 zeigte im Haut-Organkultur-Modell keine Auswirkung auf die Blasenbildung. Im nächsten Schritt sollten Versuche mit den Inhibitoren im Mausmodell erfolgen, um auch mögliche systemische oder lokale Nebenwirkungen besser beurteilen zu können.

Das Verhindern der Autoantikörper-induzierten Blasenbildung durch direkte Inhibition der beteiligten Signalkaskaden in den Keratinozyten bietet den Vorteil eines schnellen Therapieeintritts. Eine adjuvante Behandlung mit niedermolekularen Inhibitoren ließe sich also gerade am Therapiebeginn mit der immunsuppressiven Therapie kombinieren und könnte so zu einer schnelleren Remission und besseren Lebensqualität der Patienten führen. Bei bekannten starken dermatologischen und anderen Nebenwirkungen einiger der Inhibitoren ist dabei eine mögliche topische Therapie zu bevorzugen. Niedermolekulare Inhibitoren werden bereits bei anderen inflammatorischen Hauterkrankungen wie Alopecia areata als topische Behandlungen verwendet [167]. Der topisch anwendbare TrkA-Inhibitor CT327 zeigte gute Ergebnisse in der Pruritus-Therapie bei Psoriasis [128].

Da sich die Pathogenese des PF nur darin unterscheidet, dass hauptsächlich Autoantikörper gegen Dsg1 gebildet werden, welches vorwiegend in den superfiziellen Schichten der Epidermis vorkommt, ist davon auszugehen, dass die intrazellulären Signalkaskaden, die durch die Antikörper ausgelöst werden, sich kaum von PV unterscheiden. Daher sollten die gefundenen vielversprechenden Substanzen bei PF eine ähnliche Wirkung zeigen. Um dies zu validieren, könnte aber eine Testung mit Immunapheresematerial von PF-Patienten oder im Haut-Organkultur-Modell mit scFv nur gegen Dsg1 angeschlossen werden.

Bei PNP mit u. a. Antikörpern gegen Dsg3, Dsg1, Envoplakin, Periplakin, Desmoplakin I und II, Plektin und BP230 ist bei hohem Verhältnis an Dsg3- und Dsg1-Autoantikörpern ebenfalls eine Wirkung der getesteten Inhibitoren zu erwarten [168,169]. Auch bei den Antikörpern gegen die anderen Keratinozyten-Antigene könnten die Substanzen wirkungsvoll sein. Da bei PNP allerdings auch eine Beteiligung der zellulären Immunität mit

lokaler Aktivierung von CD8⁺-T-Zellen, Interferon (IFN) γ und TNF α eine Rolle zu spielen scheint [16,170], bleibt das Ausmaß der Wirkung ungewiss.

In der Zukunft könnten sich allerdings auch Verfahren wie die *Chimeric-autoantibody-receptor*(CAAR)-T-Zell-Therapie als aussichtsreicher herausstellen, da diese direkt am Ursprung der Autoimmunerkrankung, den Autoantikörper-produzierenden B-Zellen, ansetzen und somit ohne die systemischen Nebenwirkungen der weiter *downstream* ansetzenden Inhibition von beteiligten Signalkaskaden oder einer Immunsuppression auskommen. Ellebrecht *et al.* entwickelten nach dem Prinzip der bereits erfolgreich bei gewissen Krebsarten eingesetzten *Chimeric-antigen-receptor*(CAR)-T-Zell-Therapie einen chimären, CD19-spezifischen Autoantikörperrezeptor, der zukünftig in humane T-Zellen integriert werden kann (**Abb. 4.1**). Dieser besteht aus extrazellulären Fragmenten des Dsg3-Antigens, z. B. den Cadherin-Domänen 1-4 oder 1-5, sowie den transmembranösen und intrazellulären Signaldomänen CD8 α und CD137-CD3 ζ , welche schon erfolgreich in klinischen CAR-T-Zell-Studien verwendet wurden. Dieser wird über einen lentiviralen Vektor *ex vivo* in die zuvor gewonnenen, patienteneigenen T-Zellen eingebracht [171–173]. Die T-Zellen binden daraufhin nach Reinjektion die Dsg3-Autoantikörper-spezifischen B-Zellen, sodass diese direkt und die dazugehörigen Autoantikörper-produzierenden Plasmazellen indirekt eliminiert werden. Diese Methode zeigte sich schon *in vivo* im Mausmodell und *in vitro* mit humanen T-Zellen und geklonten CD19⁺-B-Zellen mit Dsg3-spezifischem B-Zellrezeptor (BCR) von PV-Patienten als sehr wirkungsvoll. Es kam zu einer signifikanten Reduktion von im Blut zirkulierenden Dsg3-Autoantikörpern und der klinischen Ausprägung des PV. Dabei wurde die Wirkung weder durch anwesende monoklonale Dsg3- oder polyklonale PV-IgG-Autoantikörper aufgehoben, noch gab es unspezifische Reaktionen gegen B-Zellen ohne Dsg3-spezifischen BCR und die CAAR-T-Zellen blieben im Mausmodell anhaltend im Organismus detektierbar. Auch zeigte sich keine zytotoxische Wirkung gegen Dsg- und Dsc-exprimierende humane Keratinozyten und keine anderen Nebenwirkungen im Mausmodell. Als nächster Schritt soll eine Erprobung der Methode am Hund erfolgen, bevor eine Erprobung in klinischen Studien erfolgen kann [56,173].

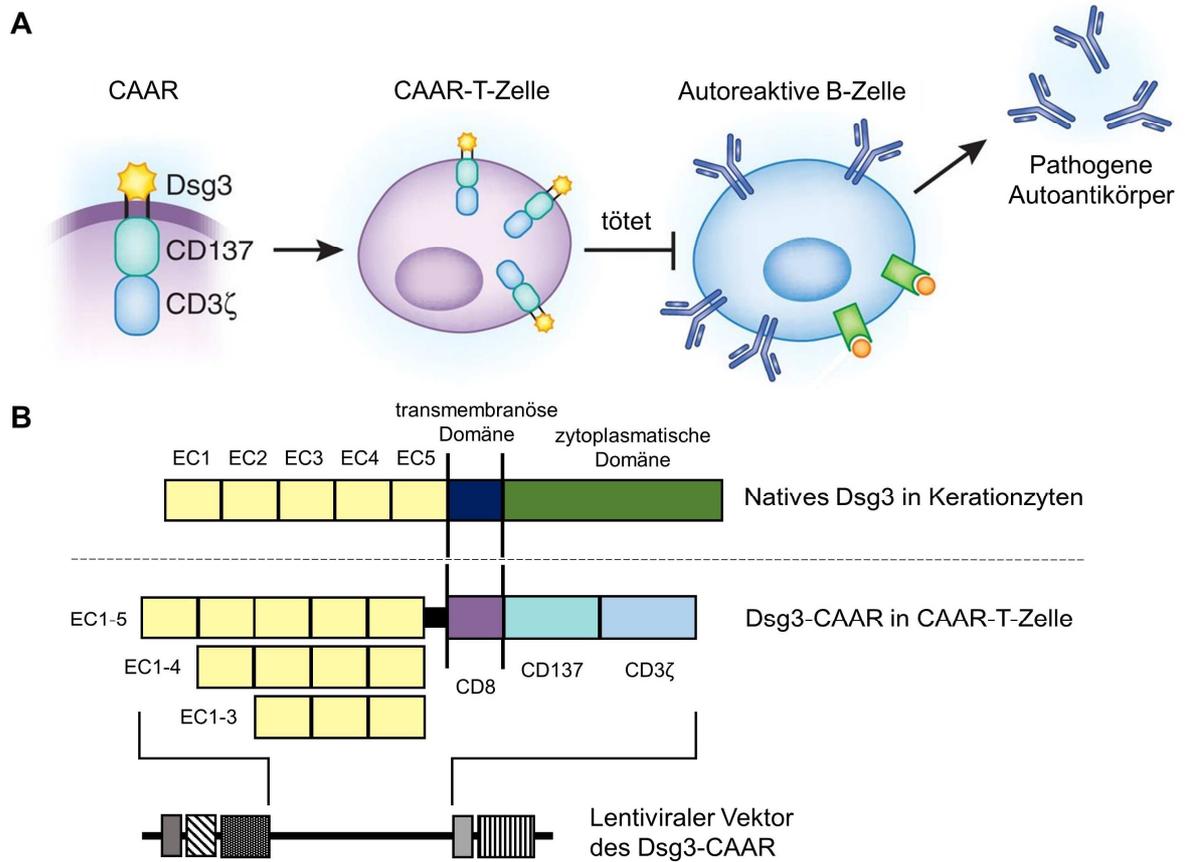


Abb. 4.1: Funktionsweise der *Chimeric-autoantibody-receptor*-T-Zell-Therapie und Aufbau des *Desmoglein-3-chimeric-autoantibody-receptor*

Die *Chimeric-autoantibody-receptor*(CAAR)-T-Zell-Therapie funktioniert über eine Einbringung von Bestandteilen des Desmoglein (Dsg) 3 gekoppelt an T-Zellrezeptordomänen in patienteneigene T-Zellen. Diese bekämpfen daraufhin autoreaktive B-Zellen, die Autoantikörper gegen Dsg3 produzieren (**A**). Die extrazellulären Domänen (EC) 1-3, 1-4 und 1-5 des Dsg3 wurden dafür an die Signaldomänen *cluster of differentiation* (CD) 8 α und CD137-CD3 ζ von T-Zellen gekoppelt. Die hierfür benötigte DNA wurde in einen lentiviralen Vektor eingebracht, der dann diese dann in das Genom der entnommenen T-Zellen eingeschleust hat (**B**).

Abbildung modifiziert nach [173,174].

5 Zusammenfassung

Pemphigus vulgaris (PV) gehört zu den blasenbildenden Autoimmundermatosen und zeichnet sich durch Akantholyse der unteren Schichten der Epidermis aus. Es kommt zu schmerzhaften, verschieblichen Blasen und Erosionen vor allem an druckbelasteter Haut und Mukosa, die unbehandelt durch großflächige Beteiligung und Sekundärinfektionen oft letal enden. Als ursächlich haben sich bisher hauptsächlich Autoantikörper gegen Desmoglein (Dsg) 3 als Antigen auf der Zelloberfläche von Keratinozyten herausgestellt.

Die Therapie von PV erfolgt vor allem mit systemischen Glukokortikoiden, die ggf. mit weiteren Immunsuppressiva kombiniert werden. Da diese aber nur sehr unspezifisch wirken und starke Nebenwirkungen haben, werden dringend neue Therapiemöglichkeiten benötigt.

Ziel dieser Arbeit war die Validierung der Wirksamkeit von 20 bereits vorselektierenden Inhibitoren der Selleckchem *Target Selective Inhibitory Library* auf die Blasenbildung in einem *in-vitro*-Modell des PV.

Es erfolgte zunächst ein Screening der Zytotoxizität der Inhibitoren auf HaCaT-Zellen, welches die Substanzen BX-795, Evacetrapib und NU7441 in der Konzentration von 10 µM aufgrund toxischer Effekte für die weiteren Versuche ausschloss. Im Nachweisverfahren zur Keratinozytendissoziation erfolgte dann die Inkubation von einer Einzelzellschicht von HaCaT- bzw. NHEK-Zellen mit dem Immunapheresematerial von PV-Patienten sowie den Inhibitoren in drei verschiedenen Konzentrationen (0,1 µM, 1 µM und 10 µM). Anschließend wurde die Zellschicht mit dem Enzym Dispase abgelöst und mechanischer Stress ausgeübt. Die Anzahl der entstehenden Fragmente wurde gezählt und in Relation zur Positivkontrolle (PV-Immunapheresematerial) gesetzt. Dabei galt eine signifikante Reduzierung der Fragmentzahl als wirksamer Effekt des Inhibitors.

Die 6 Inhibitoren A66, BIRB796, BX-795, GW1441756, Selumetinib und Vandetanib zeigten eine signifikante Reduktion der Fragmentierung bei HaCaT-Zellen. Erfreulicherweise bestätigten sich diese Ergebnisse an NHEK-Zellen mit den Inhibitoren Selumetinib und A66. Die erneut nicht-signifikante Testung des zuvor bei HaCaT-Zellen nicht-wirksamen Inhibitors Iniparib deutete weiterhin auf eine gute Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die NHEK-Zellen hin.

Die hier erbrachten Ergebnisse dienen als Grundlage für die weitere Testung der 6 vielversprechenden Substanzen *in vitro* und *in vivo* mit dem Ziel der Entwicklung neuer Therapieoptionen. Nach der Vervollständigung der Ergebnisse bei NHEK-Zellen sollte im nächsten Schritt die Validierung der Wirksamkeit der Inhibitoren im humanen Vollhaut- und Mausmodell erfolgen. Die Verwendung der Inhibitoren erscheint dabei vor allem als adjuvante Behandlung für eine schnellere Remission des PV vielversprechend.

Literaturverzeichnis

- [1] Moll, I. (Hrsg.) Unsere dynamische Haut: Aufbau und Funktionen. *Duale Reihe Dermatologie*, 8. Auflage, 15–27 (Thieme, Stuttgart, 2016).
- [2] Ulfing, N. (Hrsg.) Haut. *Kurzlehrbuch Histologie*, 5. Auflage, 211–219 (Thieme, Stuttgart, 2019).
- [3] Hertl, M. Dermatologische Grundlagen. Plewig, G., Ruzicka, T., Kaufmann, R. und Hertl, M. (Hrsg.) *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie*, 7. Auflage, 3–21 (Springer, Berlin, 2018).
- [4] Lüllmann-Rauch, R. und Asan, E. (Hrsg.) Haut und Hautanhangsgebilde. *Taschenlehrbuch Histologie*, 6. Auflage, 634–656 (Thieme, Stuttgart, 2019).
- [5] Brenner, M. und Berking, C. Grundlagen der Hautpigmentierung: Biochemie und Regulation der Melaninsynthese. *Hautarzt* **61**, 554–560 (2010).
- [6] <https://ja.dh.duke.edu/sites/default/files/DermPearlsPart1.pdf> (zuletzt abgerufen am 12.06.2020).
- [7] Schmidt, E. und Zillikens, D. Pemphigoid diseases. *Lancet* **381**, 320–332 (2013).
- [8] https://www.amboss.com/de/wissen/Blasenbildende_Autoimmundermatosen (zuletzt abgerufen am 12.06.2020).
- [9] Amagai, M., Klaus-Kovtun, V. und Stanley, J. R. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* **67**, 869–877 (1991).
- [10] Ishii, K. Identification of desmoglein as a cadherin and analysis of desmoglein domain structure. *J Invest Dermatol* **127**, E6–E7 (2007).
- [11] Sadik, C., Zillikens, D. und Hertl, M. Bullöse Autoimmundermatosen. Plewig, G., Ruzicka, T., Kaufmann, R. und Hertl, M. (Hrsg.) *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie*, 7. Auflage, 839–873 (Springer, Berlin, 2018).
- [12] Alpsy, E., Akman-Karakas, A. und Uzun, S. Geographic variations in epidemiology of two autoimmune bullous diseases: Pemphigus and bullous pemphigoid. *Arch Dermatol Res* **307**, 291–298 (2015).
- [13] Shah, A. A., Seiffert-Sinha, K., Sirois, D., Werth, V. P., Rengarajan, B., Zrnchik, W., Attwood, K. und Sinha, A. A. Development of a disease registry for autoimmune bullous diseases: Initial analysis of the pemphigus vulgaris subset. *Acta Derm Venereol* **95**, 86–90 (2015).
- [14] Michailidou, E. Z., Belazi, M. A., Markopoulos, A. K., Tsatsos, M. I., Mourellou, O. N. und Antoniadou, D. Z. Epidemiologic survey of pemphigus vulgaris with oral manifestations in northern Greece: Retrospective study of 129 patients. *Int J Dermatol* **46**, 356–361 (2007).
- [15] Bertram, F., Bröcker, E. B., Zillikens, D. und Schmidt, E. Prospektive Untersuchung der Inzidenz blasenbildender Autoimmundermatosen in Unterfranken. *J Dtsch Dermatol Ges* **7**, 434–440 (2009).
- [16] Kasperkiewicz, M., Ellebrecht, C. T., Takahashi, H., Yamagami, J., Zillikens, D., Payne, A. S. und Amagai, M. Pemphigus. *Nat Rev Dis Primers* **3**, 17026 (2017).
- [17] [https://www.memorangapp.com/flashcards/148168/Classic+Labs%2FFindings+\(First+Aid\)](https://www.memorangapp.com/flashcards/148168/Classic+Labs%2FFindings+(First+Aid)) (zuletzt abgerufen am 12.06.2020).

- [18] Grando, S. A. Pemphigus autoimmunity: Hypotheses and realities. *Autoimmunity* **45**, 7–35 (2012).
- [19] Kitajima, Y. New insights into desmosome regulation and pemphigus blistering as a desmosome-remodeling disease. *Kaohsiung J Med Sci* **29**, 1–13 (2013).
- [20] Payne, A. S., Hanakawa, Y., Amagai, M. und Stanley, J. R. Desmosomes and disease: Pemphigus and bullous impetigo. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 536–543 (2004).
- [21] Amagai, M. Autoimmunity against desmosomal cadherins in pemphigus. *J Dermatol Sci* **20**, 92–102 (1999).
- [22] Mahoney, M. G., Wang, Z., Rothenberger, K., Koch, P. J., Amagai, M. und Stanley, J. R. Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. *J Clin Invest* **103**, 461–468 (1999).
- [23] Pan, M., Liu, X. und Zheng, J. The pathogenic role of autoantibodies in pemphigus vulgaris. *Clin Exp Dermatol* **36**, 703–707 (2011).
- [24] Rock, B., Martins, C. R., Theofilopoulos, A. N., Balderas, R. S., Anhalt, G. J., Labib, R. S., Futamura, S., Rivitti, E. A. und Diaz, L. A. The pathogenic effect of IgG4 autoantibodies in endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem). *N Engl J Med* **320**, 1463–1469 (1989).
- [25] Funakoshi, T., Lunardon, L., Ellebrecht, C. T., Nagler, A. R., O’Leary, C. E. und Payne, A. S. Enrichment of total serum IgG4 in patients with pemphigus. *Br J Dermatol* **167**, 1245–1253 (2012).
- [26] Aalberse, R. C. und Schuurman, J. IgG4 breaking the rules. *Immunology* **105**, 9–19 (2002).
- [27] Patel, H. P., Diaz, L. A., Anhalt, G. J., Labib, R. S. und Takahashi, Y. Demonstration of pemphigus antibodies on the cell surface of murine epidermal cell monolayers and their internalization. *J Invest Dermatol* **83**, 409–415 (1984).
- [28] Jones, J. C. R., Yokoo, K. M. und Goldman, R. D. Further analysis of pemphigus autoantibodies and their use in studies on the heterogeneity, structure, and function of desmosomes. *J Cell Biol* **102**, 1109–1117 (1986).
- [29] Hashimoto, K., Shafran, K. M., Webber, P. S., Lazarus, G. S. und Singer, K. H. Anti-cell surface pemphigus autoantibody stimulates plasminogen activator activity of human epidermal cells: A mechanism for the loss of epidermal cohesion and blister formation. *J Exp Med* **157**, 259–272 (1983).
- [30] Vielmuth, F., Waschke, J. und Spindler, V. Loss of desmoglein binding is not sufficient for keratinocyte dissociation in pemphigus. *J Invest Dermatol* **135**, 3068–3077 (2015).
- [31] Calkins, C. C., Setzer, S. V., Jennings, J. M., Summers, S., Tsunoda, K., Amagai, M. und Kowalczyk, A. P. Desmoglein endocytosis and desmosome disassembly are coordinated responses to pemphigus autoantibodies. *J Biol Chem* **281**, 7623–7634 (2006).
- [32] Mao, X., Nagler, A. R., Farber, S. A., Choi, E. J., Jackson, L. H., Leiferman, K. M., Ishii, N., Hashimoto, T., Amagai, M., Zone, J. J. und Payne, A. S. Autoimmunity to desmocollin 3 in pemphigus vulgaris. *Am J Pathol* **177**, 2724–2730 (2010).
- [33] Nguyen, V. T., Ndoye, A. und Grando, S. A. Pemphigus vulgaris antibody identifies pemphaxin: A novel keratinocyte annexin-like molecule binding acetylcholine. *J Biol Chem* **275**, 29466–29476 (2000).

- [34] Nguyen, V. T., Ndoeye, A. und Grando, S. A. Novel human $\alpha 9$ acetylcholine receptor regulating keratinocyte adhesion is targeted by pemphigus vulgaris autoimmunity. *Am J Pathol* **157**, 1377–1391 (2000).
- [35] Grando, S. A. Cholinergic control of epidermal cohesion. *Exp Dermatol* **15**, 265–282 (2006).
- [36] Marchenko, S., Chernyavsky, A. I., Arredondo, J., Gindi, V. und Grando, S. A. Antimitochondrial autoantibodies in pemphigus vulgaris: A missing link in disease pathophysiology. *J Biol Chem* **285**, 3695–3704 (2010).
- [37] Grando, S. A., Bystryn, J. C., Chernyavsky, A. I., Frušić-zlotkin, M., Gniadecki, R., Lotti, R., Milner, Y., Pittelkow, M. R. und Pincelli, C. Apoptolysis: A novel mechanism of skin blistering in pemphigus vulgaris linking the apoptotic pathways to basal cell shrinkage and suprabasal acantholysis. *Exp Dermatol* **18**, 764–770 (2009).
- [38] Pretel, M., España, A., Marquina, M., Pelacho, B., López-Picazo, J. M. und López-Zabalza, M. J. An imbalance in Akt/mTOR is involved in the apoptotic and acantholytic processes in a mouse model of pemphigus vulgaris. *Exp Dermatol* **18**, 771–780 (2009).
- [39] Frušić-Zlotkin, M., Raichenberg, D., Wang, X., David, M., Michel, B. und Milner, Y. Apoptotic mechanism in pemphigus autoimmunoglobulins-induced acantholysis: Possible involvement of the EGF receptor. *Autoimmunity* **39**, 563–575 (2006).
- [40] Arredondo, J., Chernyavsky, A. I., Karaoui, A. und Grando, S. A. Novel mechanisms of target cell death and survival and of therapeutic action of IVIg in pemphigus. *Am J Pathol* **167**, 1531–1544 (2005).
- [41] Schmidt, E. und Waschke, J. Apoptosis in pemphigus. *Autoimmun Rev* **8**, 533–537 (2009).
- [42] Kawasaki, Y., Aoyama, Y., Tsunoda, K., Amagai, M. und Kitajima, Y. Pathogenic monoclonal antibody against desmoglein 3 augments desmoglein 3 and p38 MAPK phosphorylation in human squamous carcinoma cell line. *Autoimmunity* **39**, 587–590 (2006).
- [43] Aoyama, Y., Owada, M. K. und Kitajima, Y. A pathogenic autoantibody, pemphigus vulgaris-IgG, induces phosphorylation of desmoglein 3, and its dissociation from plakoglobin in cultured keratinocytes. *Eur J Immunol* **29**, 2233–2240 (1999).
- [44] Schmidt, E., Gutberlet, J., Siegmund, D., Berg, D., Wajant, H. und Waschke, J. Apoptosis is not required for acantholysis in pemphigus vulgaris. *Am J Physiol Cell Physiol* **296**, C162 (2009).
- [45] Witte, M. und Zillikens, D. 59/w mit Erosionen an Mund- und Nasenschleimhaut: Vorbereitung auf die Facharztprüfung: Folge 18. *Hautarzt* **69**, 157–161 (2018).
- [46] Hertl, M., Jedlickova, H., Karpati, S., Marinovic, B., Uzun, S., Yayli, S., Mimouni, D., Borradori, L., Feliciani, C., Ioannides, D., Joly, P., Kowalewski, C., Zambruno, G., Zillikens, D. und Jonkman, M. F. Pemphigus. S2 guideline for diagnosis and treatment: Guided by the European Dermatology Forum (EDF) in cooperation with the European Academy of Dermatology and Venereology (EADV). *J Eur Acad Dermatology Venereol* **29**, 405–414 (2015).
- [47] Nguyen, V. T., Arredondo, J., Chernyavsky, A. I., Kitajima, Y., Pittelkow, M. und Grando, S. A. Pemphigus vulgaris IgG and methylprednisolone exhibit reciprocal effects on keratinocytes. *J Biol Chem* **279**, 2135–2146 (2004).
- [48] Atzmony, L., Hodak, E., Gdalevich, M., Rosenbaum, O. und Mimouni, D. Treatment of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus: A systematic review and meta-

- analysis. *Am J Clin Dermatol* **15**, 503–515 (2014).
- [49] Yanovsky, R. L., McLeod, M. und Ahmed, A. R. Treatment of pemphigus vulgaris: Part 2 – emerging therapies. *Expert Rev Clin Immunol* **15**, 1061–1071 (2019).
- [50] Chams-Davatchi, C., Esmaili, N., Daneshpazhooh, M., Valikhani, M., Balighi, K., Hallaji, Z., Barzegari, M., Akhyani, M., Ghodsi, S. Z., Seirafi, H., Tabrizi Nazemi, M. J., Mortazavi, H. und Mirshams-Shahshahani, M. Randomized controlled open-label trial of four treatment regimens for pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol* **57**, 622–628 (2007).
- [51] Beissert, S., Werfel, T., Frieling, U., Böhm, M., Sticherling, M., Stadler, R., Zillikens, D., Rzany, B., Hunzelmann, N., Meurer, M., Gollnick, H., Ruzicka, T., Pillekamp, H., Junghans, V., Bonsmann, G. und Luger, T. A. A comparison of oral methylprednisolone plus azathioprine or mycophenolate mofetil for the treatment of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* **143**, 1536–1542 (2007).
- [52] Kasperkiewicz, M., Eming, R., Behzad, M., Hunzelmann, N., Meurer, M., Schulze-Koops, H., Von Wussow, P., Hertl, M., Zillikens, D., Freivogel, K., Dörner, T. und Schmidt, E. Efficacy and safety of rituximab in pemphigus: Experience of the German Registry of Autoimmune Diseases. *J Dtsch Dermatol Ges* **10**, 727–731 (2012).
- [53] Joly, P., Maho-Vaillant, M., Prost-Squarcioni, C., Hebert, V., Houivet, E., Calbo, S., Caillot, F., Golinski, M. L., Labeille, B., Picard-Dahan, C., Paul, C., Richard, M. A., Bouaziz, J. D., Duvert-Lehembre, S., Bernard, P., Caux, F., Alexandre, M., Ingen-Housz-Oro, S., Vabres, P., Delaporte, E., Quereux, G., Dupuy, A., Debarbieux, S., Avenel-Audran, M., D’Incan, M., Bedane, C., Bénétou, N., Jullien, D., Dupin, N., Misery, L., Machet, L., Beylot-Barry, M., Dereure, O., Sassolas, B., Vermeulin, T., Benichou, J. und Musette, P. First-line rituximab combined with short-term prednisone versus prednisone alone for the treatment of pemphigus (Ritux 3): A prospective, multicentre, parallel-group, open-label randomised trial. *Lancet* **389**, 2031–2040 (2017).
- [54] Li, N., Zhao, M., Hilario-Vargas, J., Prisanh, P., Warren, S., Diaz, L. A., Roopenian, D. C. und Liu, Z. Complete FcRn dependence for intravenous Ig therapy in autoimmune skin blistering diseases. *J Clin Invest* **115**, 3440–3450 (2005).
- [55] Thiers, B. H. A randomized double-blind trial of intravenous immunoglobulin for pemphigus. *Yearb Dermatology Dermatologic Surg* **2010**, 258 (2010).
- [56] Pollmann, R., Schmidt, T., Eming, R. und Hertl, M. Pemphigus: A comprehensive review on pathogenesis, clinical presentation and novel therapeutic approaches. *Clin Rev Allergy Immunol* **54**, 1-25 (2018).
- [57] Grando, S. Functional role of the nicotinic arm of the acetylcholine regulatory axis in human B-cell lines. *J Exp Pharmacol* **1**, 1–7 (2009).
- [58] Iraj, F. und Yoosefi, A. R. Healing effect of pilocarpine gel 4% on skin lesions of pemphigus vulgaris. *Int J Dermatol* **45**, 743–746 (2006).
- [59] Sajda, T. und Sinha, A. A. Autoantibody signaling in pemphigus vulgaris: Development of an integrated model. *Front Immunol* **9**, 692 (2018).
- [60] Sharpe, G. R., Gillespie, J. I. und Greenwell, J. R. An increase in intracellular free calcium is an early event during differentiation of cultured human keratinocytes. *FEBS Lett* **254**, 25–28 (1989).
- [61] Tu, C. L., Chang, W. und Bikle, D. D. The extracellular calcium-sensing receptor is required for calcium-induced differentiation in human keratinocytes. *J Biol Chem* **276**, 41079–41085 (2001).

- [62] Aoyama, Y., Yamamoto, Y., Yamaguchi, F. und Kitajima, Y. Low to high Ca²⁺-switch causes phosphorylation and association of desmocollin 3 with plakoglobin and desmoglein 3 in cultured keratinocytes. *Exp Dermatol* **18**, 404–408 (2009).
- [63] Xie, Z. und Bikle, D. D. The recruitment of phosphatidylinositol 3-kinase to the E-cadherin-catenin complex at the plasma membrane is required for calcium-induced phospholipase C- γ 1 activation and human keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* **282**, 8695–8703 (2007).
- [64] Punnonen, K., Denning, M., Lee, E., Li, L., Rhee, S. G. und Yuspa, S. H. Keratinocyte differentiation is associated with changes in the expression and regulation of phospholipase C isoenzymes. *J Invest Dermatol* **101**, 719–726 (1993).
- [65] Esaki, C., Seishima, M., Yamada, T., Osada, K. und 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* **105**, 329–333 (1995).
- [66] Cataisson, C., Joseloff, E., Murillas, R., Wang, A., Atwell, C., Torgerson, S., Gerdes, M., Subleski, J., Gao, J.-L., Murphy, P. M., Wiltrout, R. H., Vinson, C. und Yuspa, S. H. Activation of cutaneous protein kinase C α induces keratinocyte apoptosis and intraepidermal inflammation by independent signaling pathways. *J Immunol* **171**, 2703–2713 (2003).
- [67] Hara, T., Saito, Y., Hirai, T., Nakamura, K., Nakao, K., Katsuki, M. und Chida, K. Deficiency of protein kinase C α in mice results in impairment of epidermal hyperplasia and enhancement of tumor formation in two-stage skin carcinogenesis. *Cancer Res* **65**, 7356–7362 (2005).
- [68] Hobbs, R. P., Amargo, E. V., Somasundaram, A., Simpson, C. L., Prakriya, M., Denning, M. F. und Green, K. J. The calcium ATPase SERCA2 regulates desmoplakin dynamics and intercellular adhesive strength through modulation of PKC α signaling. *FASEB J* **25**, 990–1001 (2011).
- [69] Thomason, H. A., Cooper, N. H., Ansell, D. M., Chiu, M., Merrit, A. J., Hardman, M. J. und Garrod, D. R. Direct evidence that PKC α positively regulates wound re-epithelialization: Correlation with changes in desmosomal adhesiveness. *J Pathol* **227**, 346–356 (2012).
- [70] Kröger, C., Loschke, F., Schwarz, N., Windoffer, R., Leube, R. E. und Magin, T. M. Keratins control intercellular adhesion involving PKC- α -mediated desmoplakin phosphorylation. *J Cell Biol* **201**, 681–692 (2013).
- [71] Ammoun, S., Lindholm, D., Wootz, H., Åkerman, K. E. O. und Kukkonen, J. P. G-protein-coupled OX1 orexin/hcrtr-1 hypocretin receptors induce caspase-dependent and -independent cell death through p38 mitogen-/stress- activated protein kinase. *J Biol Chem* **281**, 834–842 (2006).
- [72] Eckert, R. L., Efimova, T., Dashti, S. R., Balasubramanian, S., Deucher, A., Crish, J. F., Sturniolo, M. und Bone, F. Keratinocyte survival, differentiation, and death: Many roads lead to mitogen-activated protein kinase. *J Invest Dermatol Symp Proc* **7**, 36–40 (2002).
- [73] Johnson, G. L. und Lapadat, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **298**, 1911–1912 (2002).
- [74] Meng, X., Qiu, L., Song, H. und Dang, N. MAPK pathway involved in epidermal terminal differentiation of normal human epidermal keratinocytes. *Open Med* **13**, 189–195 (2018).

- [75] Berkowitz, P., Hu, P., Liu, Z., Diaz, L. A., Enghild, J. J., Chua, M. P. und Rubenstein, D. S. Desmosome signaling: Inhibition of p38MAPK prevents pemphigus vulgaris IgG-induced cytoskeleton reorganization. *J Biol Chem* **280**, 23778–23784 (2005).
- [76] Rousseau, S., Houle, F., Landry, J. und Huot, J. P38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene* **15**, 2169–2177 (1997).
- [77] Mao, X., Li, H., Sano, Y., Gaestel, M., Park, J. M. und Payne, A. S. MAPKAP kinase 2 (MK2)-dependent and -independent models of blister formation in pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol* **134**, 68–76 (2014).
- [78] Jolly, P. S., Berkowitz, P., Bektas, M., Lee, H. E., Chua, M., Diaz, L. A. und Rubenstein, D. S. p38MAPK signaling and desmoglein-3 internalization are linked events in pemphigus acantholysis. *J Biol Chem* **285**, 8936–8941 (2010).
- [79] Bektas, M., Jolly, P. S., Berkowitz, P., Amagai, M. und Rubenstein, D. S. A pathophysiologic role for epidermal growth factor receptor in pemphigus acantholysis. *J Biol Chem* **288**, 9447–9456 (2013).
- [80] Wu, N. L., Lee, T. A., Tsai, T. L. und Lin, W. W. TRAIL-induced keratinocyte differentiation requires caspase activation and p63 expression. *J Invest Dermatol* **131**, 874–883 (2011).
- [81] Waschke, J., Spindler, V., Bruggeman, P., Zillikens, D., Schmidt, G. und Drenckhahn, D. Inhibition of Rho A activity causes pemphigus skin blistering. *J Cell Biol* **175**, 721–727 (2006).
- [82] Egu, D. T., Walter, E., Spindler, V. und Waschke, J. Inhibition of p38MAPK signalling prevents epidermal blistering and alterations of desmosome structure induced by pemphigus autoantibodies in human epidermis. *Br J Dermatol* **177**, 1612–1618 (2017).
- [83] Hackel, P. O., Zwick, E., Prenzel, N. und Ullrich, A. Epidermal growth factor receptors: Critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 184–189 (1999).
- [84] Pastore, S., Mascia, F., Mariani, V. und Girolomoni, G. The epidermal growth factor receptor system in skin repair and inflammation. *J Invest Dermatol* **128**, 1365–1374 (2008).
- [85] Gaudry, C. A., Palka, H. L., Dusek, R. L., Huen, A. C., Khandekar, M. J., Hudson, L. G. und Green, K. J. Tyrosine-phosphorylated plakoglobin is associated with desmogleins but not desmoplakin after epidermal growth factor receptor activation. *J Biol Chem* **276**, 24871–24880 (2001).
- [86] Chernyavsky, A. I., Arredondo, J., Kitajima, Y., Sato-Nagai, M. und Grando, S. A. Desmoglein versus non-desmoglein signaling in pemphigus acantholysis: Characterization of novel signaling pathways downstream of pemphigus vulgaris antigens. *J Biol Chem* **282**, 13804–13812 (2007).
- [87] Tsunoda, K., Ota, T., Aoki, M., Yamada, T., Nagai, T., Nakagawa, T., Koyasu, S., Nishikawa, T. und Amagai, M. Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. *J Immunol* **170**, 2170–2178 (2003).
- [88] Sanchez-Carpintero, I., Espana, A., Pelacho, B., Moratalla, N. L., Rubenstein, D. S., Diaz, L. A. und Lopez-Zabalza, M. J. In vivo blockade of pemphigus vulgaris acantholysis by inhibition of intracellular signal transduction cascades. *Br J Dermatol* **151**, 565 (2004).

- [89] Walter, E., Vielmuth, F., Wanuske, M. T., Seifert, M., Pollmann, R., Eming, R. und Waschke, J. Role of DSG1- And DSG3-mediated signaling in pemphigus autoantibody-induced loss of keratinocyte cohesion. *Front Immunol* **10**, 1128 (2019).
- [90] Walter, E., Vielmuth, F., Rotkopf, L., Sárdy, M., Horváth, O. N., Goebeler, M., Schmidt, E., Eming, R., Hertl, M., Spindler, V. und Waschke, J. Different signaling patterns contribute to loss of keratinocyte cohesion dependent on autoantibody profile in pemphigus. *Sci Rep* **7**, 3579 (2017).
- [91] Sayar, B. S., Rüegg, S., Schmidt, E., Sibilila, M., Siffert, M., Suter, M. M., Galichet, A. und Müller, E. J. EGFR inhibitors erlotinib and lapatinib ameliorate epidermal blistering in pemphigus vulgaris in a non-linear, V-shaped relationship. *Exp Dermatol* **23**, 33–38 (2014).
- [92] Anderson, K. E. und Jackson, S. P. Class I phosphoinositide 3-kinases. *Int J Biochem Cell Biol* **35**, 1028–1033 (2003).
- [93] Carmeliet, P., Lampugnani, M. G., Moons, L., Breviario, F., Compernelle, V., Bono, F., Balconi, G., Spagnuolo, R., Oosthuysen, B., Dewerchin, M., Zanetti, A., Angellilo, A., Mattot, V., Nuyens, D., Lutgens, E., Clotman, F., De Ruiter, M. C., Groot, A. G. De, Poelmann, R., Lupu, F., Herbert, J. M., Collen, D. und Dejana, E. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* **98**, 147–157 (1999).
- [94] Pece, S., Chiariello, M., Murga, C. und Gutkind, J. S. Activation of the protein kinase Akt/PKB by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell junctions. Evidence for the association of phosphatidylinositol 3-kinase with the E-cadherin adhesion complex. *J Biol Chem* **274**, 19347–19351 (1999).
- [95] Pece, S. und Gutkind, J. S. Signaling from E-cadherins to the MAPK pathway by the recruitment and activation of epidermal growth factor receptors upon cell-cell contact formation. *J Biol Chem* **275**, 41227–41233 (2000).
- [96] Calautti, E., Li, J., Saoncella, S., Brissette, J. L. und Goetinck, P. F. Phosphoinositide 3-kinase signaling to Akt promotes keratinocyte differentiation versus death. *J Biol Chem* **280**, 32856–32865 (2005).
- [97] Franke, T. F., Hornik, C. P., Segev, L., Shostak, G. A. und Sugimoto, C. PI3K/Akt and apoptosis: Size matters. *Oncogene* **22**, 8983–8998 (2003).
- [98] Dainichi, T., Hayden, M. S., Park, S. G., Oh, H., Seeley, J. J., Grinberg-Bleyer, Y., Beck, K. M., Miyachi, Y., Kabashima, K., Hashimoto, T. und Ghosh, S. PDK1 is a regulator of epidermal differentiation that activates and organizes asymmetric cell division. *Cell Rep* **15**, 1615–1623 (2016).
- [99] Lee, H. E., Berkowitz, P., Jolly, P. S., Diaz, L. A., Chua, M. P. und Rubenstein, D. S. Biphasic activation of p38MAPK suggests that apoptosis is a downstream event in pemphigus acantholysis. *J Biol Chem* **284**, 12524–12532 (2009).
- [100] Braga, V. M. M., Machesky, L. M., Hall, A. und Hotchin, N. A. The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J Cell Biol* **137**, 1421–1431 (1997).
- [101] Seishima, M., Satoh, S., Nojiri, M., Osada, K. und Kitajima, Y. Pemphigus IgG induces expression of urokinase plasminogen activator receptor on the cell surface of cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* **109**, 650–655 (1997).
- [102] Waschke, J. The desmosome and pemphigus. *Histochem Cell Biol* **130**, 21–54 (2008).
- [103] Burmester, I. A. K., Flaswinkel, S., Thies, C.-S., Kasprick, A., Kamaguchi, M.,

- Bumiller-Bini, V., Emtenani, S., Feldmann, N., Kridin, K., Schmidt, E., van Beek, N., Zillikens, D., Hammers, C. M., Hundt, J. E. und Ludwig, R. J. Identification of novel therapeutic targets for blocking acantholysis in pemphigus. *Br J Pharmacol* (2020).
- [104] Burmester, I. A. K., Emtenani, S., Johns, J. G., Ludwig, R. J., Hammers, C. M. und Hundt, J. E. Translational use of a standardized full Human skin organ culture model in autoimmune blistering diseases. *Curr Protoc Pharmacol* **85**, e56 (2019).
- [105] Jamieson, S., Flanagan, J. U., Kolekar, S., Buchanan, C., Kendall, J. D., Lee, W. J., Rewcastle, G. W., Denny, W. A., Singh, R., Dickson, J., Baguley, B. C. und Shepherd, P. R. A drug targeting only p110 α can block phosphoinositide 3-kinase signalling and tumour growth in certain cell types. *Biochem J* **438**, 53–62 (2011).
- [106] Dreyling, M., Santoro, A., Mollica, L., Leppä, S., Follows, G. A., Lenz, G., Kim, W. S., Nagler, A., Panayiotidis, P., Demeter, J., Öcan, M., Kosinova, M., Bouabdallah, K., Morschhauser, F., Stevens, D. A., Trevarthen, D., Giurescu, M., Cupit, L., Liu, L., Köchert, K., Seidel, H., Peña, C., Yin, S., Hiemeyer, F., Garcia-Vargas, J., Childs, B. H. und Zinzani, P. L. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition by copanlisib in relapsed or refractory indolent lymphoma. *J Clin Oncol* **35**, 3898–3905 (2017).
- [107] Michalovich, D. und Nejentsev, S. Activated PI3 kinase delta syndrome: From genetics to therapy. *Front Immunol* **9**, 369 (2018).
- [108] Winkler, D. G., Faia, K. L., Dinitto, J. P., Ali, J. A., White, K. F., Brophy, E. E., Pink, M. M., Proctor, J. L., Lussier, J., Martin, C. M., Hoyt, J. G., Tillotson, B., Murphy, E. L., Lim, A. R., Thomas, B. D., MacDougall, J. R., Ren, P., Liu, Y., Li, L. S., Jessen, K. A., Fritz, C. C., Dunbar, J. L., Porter, J. R., Rommel, C., Palombella, V. J., Changelian, P. S. und Kutok, J. L. PI3K- δ and PI3K- γ inhibition by IPI-145 abrogates immune responses and suppresses activity in autoimmune and inflammatory disease models. *Chem Biol* **20**, 1364–1374 (2013).
- [109] Kuma, Y., Sabio, G., Bain, J., Shpiro, N., Márquez, R. und Cuenda, A. BIRB796 inhibits all p38 MAPK isoforms in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **280**, 19472–19479 (2005).
- [110] Verma, A., Mohindru, M., Deb, D. K., Sassano, A., Kambhampati, S., Ravandi, F., Minucci, S., Kalvakolanul, D. V. und Plataniias, L. C. Activation of Rac1 and the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in response to arsenic trioxide. *J Biol Chem* **277**, 44988–44995 (2002).
- [111] Ciombor, K. K. und Bekaii-Saab, T. Selumetinib for the treatment of cancer. *Expert Opin Investig Drugs* **24**, 111–123 (2015).
- [112] Paillas, S., Boissière, F., Bibeau, F., Denouel, A., Mollevi, C., Causse, A., Denis, V., Vezzio-Vié, N., Marzi, L., Cortijo, C., Ait-Arsa, I., Askari, N., Pourquier, P., Martineau, P., Del Rio, M. und Gongora, C. Targeting the p38 MAPK pathway inhibits irinotecan resistance in colon adenocarcinoma. *Cancer Res* **71**, 1041–1049 (2011).
- [113] Schreiber, S., Feagan, B., D’Haens, G., Colombel, J. F., Geboes, K., Yurcov, M., Isakov, V., Golovenko, O., Bernstein, C. N., Ludwig, D., Winter, T., Meier, U., Yong, C. und Steffgen, J. Oral p38 mitogen-activated protein kinase inhibition with BIRB 796 for active crohn’s disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Gastroenterol Hepatol* **4**, 325–334 (2006).
- [114] Sakurai, K., Dainichi, T., Garcet, S., Tsuchiya, S., Yamamoto, Y., Kitoh, A., Honda, T., Nomura, T., Egawa, G., Otsuka, A., Nakajima, S., Matsumoto, R., Nakano, Y., Otsuka, M., Iwakura, Y., Grinberg-Bleyer, Y., Ghosh, S., Sugimoto, Y., Guttman-Yassky, E., Krueger, J. G. und Kabashima, K. Cutaneous p38 mitogen-activated protein kinase activation triggers psoriatic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* **144**, 1036–1049 (2019).

- [115] Mao, X., Sano, Y., Park, J. M. und Payne, A. S. p38 MAPK activation is downstream of the loss of intercellular adhesion in pemphigus vulgaris. *J Biol Chem* **286**, 1283–1291 (2011).
- [116] Kridin, K., Ahn, C., Huang, W. C., Ansari, A. und Sami, N. Treatment update of autoimmune blistering diseases. *Dermatol Clin* **37**, 215–228 (2019).
- [117] Sinha, A. A., Hoffman, M. B. und Janicke, E. C. Pemphigus vulgaris: Approach to treatment. *Eur J Dermatol* **25**, 103–113 (2015).
- [118] Clark, K., Plater, L., Peggise, M. und Cohen, P. Use of the pharmacological inhibitor BX795 to study the regulation and physiological roles of TBK1 and I κ B Kinase ϵ : A distinct upstream kinase mediates ser-172 phosphorylation and activation. *J Biol Chem* **284**, 14136–14146 (2009).
- [119] Feldman, R. I., Wu, J. M., Polokoff, M., Zhu, D., Biroc, S., Alicke, B., Yuan, S., Buckman, B., Chang, Z. und Arnaiz, D. 249 novel small molecule inhibitors of 3'-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK-1). *EJC Suppl* **2**, 77 (2004).
- [120] Sestito, S. und Rapposelli, S. A patent update on PDK1 inhibitors (2015-present). *Expert Opin Ther Pat* **29**, 271–282 (2019).
- [121] Di Marco, E., Mathor, M., Bondanza, S., Cutuli, N., Marchisio, P. C., Cancedda, R. und De Luca, M. Nerve growth factor binds to normal human keratinocytes through high and low affinity receptors and stimulates their growth by a novel autocrine loop. *J Biol Chem* **268**, 22838–22846 (1993).
- [122] Huang, E. J. und Reichardt, L. F. Trk receptors: Roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* **72**, 609–642 (2003).
- [123] Pincelli, C. und Marconi, A. Autocrine nerve growth factor in human keratinocytes. *J Dermatol Sci* **22**, 71–79 (2000).
- [124] Pincelli, C., Haake, A. R., Benassi, L., Grassilli, E., Magnoni, C., Ottani, D., Polakowska, R., Franceschi, C. und Giannetti, A. Autocrine nerve growth factor protects human keratinocytes from apoptosis through its high affinity receptor (TRK): A role for BCL-2. *J Invest Dermatol* **109**, 757–764 (1997).
- [125] Sofroniew, M. V., Howe, C. L. und Mobley, W. C. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci* **24**, 1217–1281 (2001).
- [126] Segal, R. A. Selectivity in neurotrophin signaling: Theme and variations. *Annu Rev Neurosci* **26**, 299–330 (2003).
- [127] Truzzi, F., Marconi, A. und Pincelli, C. Neurotrophins in healthy and diseased skin. *Dermatoendocrinol* **3**, 32–36 (2011).
- [128] Roblin, D., Yosipovitch, G., Boyce, B., Robinson, J., Sandy, J., Mainero, V., Wickramasinghe, R., Anand, U. und Anand, P. 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* **95**, 542–548 (2015).
- [129] Yeh, T. C., Marsh, V., Bernat, B. A., Ballard, J., Colwell, H., Evans, R. J., Parry, J., Smith, D., Brandhuber, B. J., Gross, S., Marlow, A., Hurley, B., Lyssikatos, J., Lee, P. A., Winkler, J. D., Koch, K. und Wallace, E. Biological characterization of ARRY-142886 (AZD6244), a potent, highly selective mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor. *Clin Cancer Res* **13**, 1576–1583 (2007).
- [130] Casalupe, F., Sgambato, A., Maione, P., Sacco, P. C., Santabarbara, G. und Gridelli, C. Selumetinib for the treatment of non-small cell lung cancer. *Expert Opin Investig*

- Drugs* **26**, 973–984 (2017).
- [131] Jänne, P. A., Shaw, A. T., Pereira, J. R., Jeannin, G., Vansteenkiste, J., Barrios, C., Franke, F. A., Grinsted, L., Zazulina, V., Smith, P., Smith, I. und Crinò, L. Selumetinib plus docetaxel for KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer: A randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet Oncol* **14**, 38–47 (2013).
- [132] Jänne, P. A., Van Den Heuvel, M. M., Barlesi, F., Cobo, M., Mazieres, J., Crinò, L., Orlov, S., Blackhall, F., Wolf, J., Garrido, P., Poltoratskiy, A., Mariani, G., Ghiorghiu, D., Kilgour, E., Smith, P., Kohlmann, A., Carlile, D. J., Lawrence, D., Bowen, K. und Vansteenkiste, J. Selumetinib plus docetaxel compared with docetaxel alone and progression-free survival in patients with KRAS-mutant advanced non-small cell lung cancer: The SELECT-1 randomized clinical trial. *JAMA* **317**, 1844–1853 (2017).
- [133] Gross, A. M., Wolters, P., Baldwin, A., Dombi, E., Fisher, M. J., Weiss, B. D., Kim, A., Blakeley, J. O., Whitcomb, P., Holmblad, M., Martin, S., Roderick, M. C., Paul, S. M., Therrien, J., Heisey, K., Doyle, A., Smith, M. A., Glod, J., Steinberg, S. M. und Widemann, B. C. SPRINT: Phase II study of the MEK 1/2 inhibitor selumetinib (AZD6244, ARRY-142886) in children with neurofibromatosis type 1 (NF1) and inoperable plexiform neurofibromas (PN). *J Clin Oncol* **36**, 10503–10503 (2018).
- [134] Balagula, Y., Huston, K. B., Busam, K. J., Lacouture, M. E., Chapman, P. B. und Myskowski, P. L. Dermatologic side effects associated with the MEK 1/2 inhibitor selumetinib (AZD6244, ARRY-142886). *Invest New Drugs* **29**, 1114–1121 (2011).
- [135] Flaherty, K. T., Robert, C., Hersey, P., Nathan, P., Garbe, C., Milhem, M., Demidov, L. V., Hassel, J. C., Rutkowski, P., Mohr, P., Dummer, R., Trefzer, U., Larkin, J. M. G., Utikal, J., Dreno, B., Nyakas, M., Middleton, M. R., Becker, J. C., Casey, M., Sherman, L. J., Wu, F. S., Ouellet, D., Martin, A. M., Patel, K. und Schadendorf, D. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med* **367**, 107–114 (2012).
- [136] Sarkisian, S. und Davar, D. MEK inhibitors for the treatment of NRAS mutant melanoma. *Drug Des Devel Ther* **12**, 2553–2565 (2018).
- [137] Onda, K., Nagashima, M., Kawakubo, Y., Inoue, S., Hirano, T. und Oka, K. Mitogen-activated protein kinase kinase 1/extracellular signal-regulated kinase (MEK-1/ERK) inhibitors sensitize reduced glucocorticoid response mediated by TNF α in human epidermal keratinocytes (HaCaT). *Biochem Biophys Res Commun* **351**, 266–272 (2006).
- [138] Wedge, S. R., Ogilvie, D. J., Dukes, M., Kendrew, J., Chester, R., Jackson, J. A., Boffey, S. J., Valentine, P. J., Curwen, J. O., Musgrove, H. L., Graham, G. A., Hughes, G. D., Thomas, A. P., Stokes, E. S. E., Curry, B., Richmond, G. H. P., Wadsworth, P. F., Bigley, A. L. und Hennequin, L. F. ZD6474 inhibits vascular endothelial growth factor signaling, angiogenesis, and tumor growth following oral administration. *Cancer Res* **62**, 4645–4655 (2002).
- [139] Zhu, J. W., Wu, X. J., Lu, Z. F., Luo, D., Cai, S. Q. und Zheng, M. Role of VEGF receptors in normal and psoriatic human keratinocytes: Evidence from irradiation with different UV sources. *PLoS One* **8**, e55463 (2013).
- [140] Yang, X. H., Man, X. Y., Cai, S. Q., Yao, Y. G., Bu, Z. Y. und Zheng, M. Expression of VEGFR-2 on HaCaT cells is regulated by VEGF and plays an active role in mediating VEGF induced effects. *Biochem Biophys Res Commun* **349**, 31–38 (2006).
- [141] Ciardiello, F., Bianco, R., Caputo, R., Caputo, R., Damiano, V., Troiani, T., Melisi, D., De Vita, F., De Placido, S., Bianco, A. R. und Tortora, G. Antitumor activity of

- ZD6474, a vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in human cancer cells with acquired resistance to anti-epidermal growth factor receptor therapy. *Clin Cancer Res* **10**, 784–793 (2004).
- [142] Viola, D., Valerio, L., Molinaro, E., Agate, L., Bottici, V., Biagini, A., Lorusso, L., Cappagli, V., Pieruzzi, L., Giani, C., Sabini, E., Passannati, P., Puleo, L., Matrone, A., Pontillo-Contillo, B., Battaglia, V., Mazzeo, S., Vitti, P. und Elisei, R. Treatment of advanced thyroid cancer with targeted therapies: Ten years of experience. *Endocr Relat Cancer* **23**, R185–R205 (2016).
- [143] Fallahi, P., Di Bari, F., Ferrari, S. M., Spisni, R., Materazzi, G., Miccoli, P., Benvenga, S. und Antonelli, A. Selective use of vandetanib in the treatment of thyroid cancer. *Drug Des Devel Ther* **9**, 3459–3470 (2015).
- [144] Tsang, S. M., Liu, L., Teh, M. T., Wheeler, A., Grose, R., Hart, I. R., Garrod, D. R., Fortune, F. und Wan, H. Desmoglein 3, via an interaction with E-cadherin, is associated with activation of Src. *PLoS One* **5**, e14211 (2010).
- [145] Williamson, L., Raess, N. A., Caldelari, R., Zakher, A., De Bruin, A., Posthaus, H., Bolli, R., Hunziker, T., Suter, M. M. und Müller, E. J. Pemphigus vulgaris identifies plakoglobin as key suppressor of c-Myc in the skin. *EMBO J* **25**, 3298–3309 (2006).
- [146] Nogova, L., Sequist, L. V., Garcia, J. M. P., Andre, F., Delord, J. P., Hidalgo, M., Schellens, J. H. M., Cassier, P. A., Camidge, D. R., Schuler, M., Vaishampayan, U., Burris, H., Tian, G. G., Campone, M., Wainberg, Z. A., Lim, W. T., LoRusso, P., Shapiro, G. I., Parker, K., Chen, X., Choudhury, S., Ringeisen, F., Graus-Porta, D., Porter, D., Isaacs, R., Buettner, R. und Wolf, J. Evaluation of BGJ398, a fibroblast growth factor receptor 1-3 kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors harboring genetic alterations in fibroblast growth factor receptors: Results of a global phase I, dose-escalation and dose-expansion study. *J Clin Oncol* **35**, 157–165 (2017).
- [147] Czyz, M. Fibroblast growth factor receptor signaling in skin cancers. *Cells* **8**, 540 (2019).
- [148] Belov, A. A. und Mohammadi, M. Molecular mechanisms of fibroblast growth factor signaling in physiology and pathology. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a015958 (2013).
- [149] Dorey, K. und Amaya, E. FGF signalling: Diverse roles during early vertebrate embryogenesis. *Development* **137**, 3731–3742 (2010).
- [150] Kelleher, F. C., O’Sullivan, H., Smyth, E., McDermott, R. und Viterbo, A. Fibroblast growth factor receptors, developmental corruption and malignant disease. *Carcinogenesis* **34**, 2198–2205 (2013).
- [151] Eswarakumar, V. P., Lax, I. und Schlessinger, J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**, 139–149 (2005).
- [152] Helsten, T., Schwaederle, M. und Kurzrock, R. Fibroblast growth factor receptor signaling in hereditary and neoplastic disease: biologic and clinical implications. *Cancer Metastasis Rev* **34**, 479–496 (2015).
- [153] Liu, H., Ai, J., Shen, A., Chen, Y., Wang, X., Peng, X., Chen, H., Shen, Y., Huang, M., Ding, J. und Geng, M. c-Myc alteration determines the therapeutic response to FGFR inhibitors. *Clin Cancer Res* **23**, 974–984 (2017).
- [154] Mahe, M., Dufour, F., Neyret-Kahn, H., Moreno-Vega, A., Beraud, C., Shi, M., Hamaidi, I., Sanchez-Quiles, V., Krucker, C., Dorland-Galliot, M., Chapeaublanc, E., Nicolle, R., Lang, H., Pouponnot, C., Massfelder, T., Radvanyi, F. und Bernard-

- Pierrot, I. An FGFR 3/ MYC positive feedback loop provides new opportunities for targeted therapies in bladder cancers. *EMBO Mol Med* **10**, e8163 (2018).
- [155] Ji, Q. S., Mulvihill, M. J., Rosenfeld-Franklin, M., Cooke, A., Feng, L., Mak, G., O'Connor, M., Yao, Y., Pirritt, C., Buck, E., Eyzaguirre, A., Arnold, L. D., Gibson, N. W. und Pachter, J. A. A novel, potent, and selective insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor blocks insulin-like growth factor-I receptor signaling in vitro and inhibits insulin-like growth factor-I receptor-dependent tumor growth in vivo. *Mol Cancer Ther* **6**, 2158–2167 (2007).
- [156] Fassnacht, M., Berruti, A., Baudin, E., Demeure, M. J., Gilbert, J., Haak, H., Kroiss, M., Quinn, D. I., Hesselting, E., Ronchi, C. L., Terzolo, M., Choueiri, T. K., Poondru, S., Fleege, T., Rorig, R., Chen, J., Stephens, A. W., Worden, F. und Hammer, G. D. Linsitinib (OSI-906) versus placebo for patients with locally advanced or metastatic adrenocortical carcinoma: A double-blind, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol* **16**, 426–435 (2015).
- [157] Chitnis, M. M., Yuen, J. S. P., Protheroe, A. S., Pollak, M. und Macaulay, V. M. The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway. *Clin Cancer Res* **14**, 6364–6370 (2008).
- [158] Conover, C. A. und Bale, L. K. Insulin-like growth factor I induction of c-myc expression in bovine fibroblasts can be blocked by antecedent insulin receptor activation. *Exp Cell Res* **238**, 122–127 (1998).
- [159] Hodak, E., Gottlieb, A. B., Anzilotti, M. und Krueger, J. G. The insulin-like growth factor 1 receptor is expressed by epithelial cells with proliferative potential in human epidermis and skin appendages: Correlation of increased expression with epidermal hyperplasia. *J Invest Dermatol* **106**, 564–570 (1996).
- [160] Navada, S. C. und Silverman, L. R. The safety and efficacy of rigosertib in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Expert Rev Anticancer Ther* **16**, 805–810 (2016).
- [161] Prasad, A., Park, I. W., Allen, H., Zhang, X., Reddy, M. V. R., Boominathan, R., Reddy, E. P. und Groopman, J. E. Styryl sulfonyl compounds inhibit translation of cyclin D1 in mantle cell lymphoma cells. *Oncogene* **28**, 1518–1528 (2009).
- [162] Garcia-Manero, G., Fenaux, P., Al-Kali, A., Baer, M. R., Sekeres, M. A., Roboz, G. J., Gaidano, G., Scott, B. L., Greenberg, P., Platzbecker, U., Steensma, D. P., Kambhampati, S., Kreuzer, K. A., Godley, L. A., Atallah, E., Collins, R., Kantarjian, H., Jabbour, E., Wilhelm, F. E., Azarnia, N. und Silverman, L. R. Rigosertib versus best supportive care for patients with high-risk myelodysplastic syndromes after failure of hypomethylating drugs (ONTIME): a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* **17**, 496–508 (2016).
- [163] Holtrich, U., Wolf, G., Bräuninger, A., Karn, T., Böhme, B., Rübsamen-Waigmann, H. und Strebhardt, K. Induction and down-regulation of PLK, a human serine/threonine kinase expressed in proliferating cells and tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1736–1740 (1994).
- [164] Wang, Y., Singh, R., Wang, L., Nilsson, M., Goonatilake, R., Tong, P., Li, L., Giri, U., Villalobos, P., Mino, B., Rodriguez-Canales, J., Wistuba, I., Wang, J., Heymach, J. V. und Johnson, F. M. Polo-like kinase 1 inhibition diminishes acquired resistance to epidermal growth factor receptor inhibition in non-small cell lung cancer with T790M mutations. *Oncotarget* **7**, 47998–48010 (2016).
- [165] Van den Bossche, J., Lardon, F., Deschoolmeester, V., De Pauw, I., Vermorken, J. B., Specenier, P., Pauwels, P., Peeters, M. und Wouters, A. Spotlight on volasertib: Preclinical and clinical evaluation of a promising Plk1 inhibitor. *Med Res Rev* **36**,

- 749–786 (2016).
- [166] Nygaard, U. H., Niehues, H., Rikken, G., Rodijk-Olthuis, D., Schalkwijk, J. und van den Bogaard, E. H. Antibiotics in cell culture: friend or foe? Suppression of keratinocyte growth and differentiation in monolayer cultures and 3D skin models. *Exp Dermatol* **24**, 964–965 (2015).
- [167] Putterman, E. und Castelo-Soccio, L. Topical 2% tofacitinib for children with alopecia areata, alopecia totalis, and alopecia universalis. *J Am Acad Dermatol* **78**, 1207–1209.e1 (2018).
- [168] Yong, A. A. und Tey, H. L. Paraneoplastic pemphigus. *Australas J Dermatol* **54**, 241–250 (2013).
- [169] Sehgal, V. N. und Srivastava, G. Paraneoplastic pemphigus/paraneoplastic autoimmune multiorgan syndrome. *Int J Dermatol* **48**, 162–169 (2009).
- [170] Reich, K., Brinck, U., Letschert, M., Blaschke, V., Dames, K., Braess, J., Wörmann, B., Rüniger, T. M. und Neumann, C. Graft-versus-host disease-like immunophenotype and apoptotic keratinocyte death in paraneoplastic pemphigus. *Br J Dermatol* **141**, 739–746 (1999).
- [171] Porter, D. L., Levine, B. L., Kalos, M., Bagg, A. und June, C. H. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* **365**, 725–733 (2011).
- [172] Maude, S. L., Frey, N., Shaw, P. A., Aplenc, R., Barrett, D. M., Bunin, N. J., Chew, A., Gonzalez, V. E., Zheng, Z., Lacey, S. F., Mahnke, Y. D., Melenhorst, J. J., Rheingold, S. R., Shen, A., Teachey, D. T., Levine, B. L., June, C. H., Porter, D. L. und Grupp, S. A. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med* **371**, 1507–1517 (2014).
- [173] Ellebrecht, C. T., Bhoj, V. G., Nace, A., Choi, E. J., Mao, X., Cho, M. J., Di Zenzo, G., Lanzavecchia, A., Seykora, J. T., Cotsarelis, G., Milone, M. C. und Payne, A. S. Reengineering chimeric antigen receptor T cells for targeted therapy of autoimmune disease. *Science* **353**, 179–184 (2016).
- [174] Chatenoud, L. Precision medicine for autoimmune disease. *Nat Biotechnol* **34**, 930–932 (2016).

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abb. 1.1: Aufbau der Epidermis	3
Abb. 1.2: Aufbau der Haut, Hautanhangsgebilde und Subkutis.....	4
Abb. 1.3: Vergleich von Pemphigus vulgaris und bullösem Pemphigoid.....	5
Abb. 1.4: Histopathologie von Pemphigus vulgaris links und klinisches Erscheinungsbild rechts	6
Abb. 1.5: Desmoglein-Kompensationstheorie	7
Abb. 1.6: Theorie der Apoptolyse.....	9
Abb. 1.7: Direkte und indirekte Immunfluoreszenz bei Pemphigus vulgaris.....	11
Abb. 1.8: Schematischer Aufbau eines Desmosoms.....	14
Abb. 1.9: Mögliche Signalkaskaden der Blasenbildung bei Pemphigus vulgaris.....	18
Abb. 2.1: Ablauf des Thiazolylblau-Tetrazoliumbromid-Testverfahrens.....	29
Abb. 2.2: Beispiel des Nachweisverfahrens zur Keratinozytendissoziation	32
Abb. 2.3: Ablauf des Nachweisverfahrens zur Keratinozytendissoziation.....	33
Abb. 3.1: Gute Viabilität der HaCaT-Zellen nach Inkubation mit den Inhibitoren	36
Abb. 3.2: Toxische Effekte auf die HaCaT-Zellen nach Inkubation mit den Inhibitoren.....	37
Abb. 3.3: Inhibitoren der Keratinozytendissoziation ohne Reduzierung der Fragmentzahl	40
Abb. 3.4: Inhibitoren der Keratinozytendissoziation mit unklarem Effekt	42
Abb. 3.5: Vielversprechende Inhibitoren der Keratinozytendissoziation	44
Abb. 3.6: Keratinozytendissoziation bei <i>normal human epidermal keratinocytes</i>	46
Abb. 4.1: Funktionsweise der <i>Chimeric-autoantibody-receptor</i> -T-Zell-Therapie und Aufbau des Desmoglein-3- <i>chimeric-autoantibody-receptor</i>	60

Tabellen

Tab. 2.1: Spender des Immunapheresematerials.....	24
Tab. 2.2: Verwendete Inhibitoren der Selleckchem <i>Target Selective Inhibitory Library</i>	26
Tab. 3.1: Testung des Immunapheresematerials	38

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich für die wertvolle Unterstützung bei der Fertigstellung meiner Arbeit bedanken, ohne welche dies nicht möglich gewesen wäre.

Besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. vet. Jennifer Hundt, die mich als Doktorandin übernommen hat und zahlreiche kostbare Abendstunden in die Besprechung meiner Arbeit investiert hat. Ohne diese intensiven Gespräche über meine Dissertation und natürlich die netten, persönlichen Unterhaltungen beim gemeinsamen Abendessen zwischendurch wäre die Vollendung meiner Arbeit sicherlich deutlich langwieriger und langweiliger gewesen.

Herrn Prof. Dr. med. Ralf Ludwig danke ich für die Bereitstellung meines Themas und den stetigen Enthusiasmus, den er meinen Ergebnissen entgegenbrachte. Die zahlreichen netten Gespräche und Ratschläge habe ich sehr positiv in Erinnerung behalten.

Ich danke dem Direktor des Lübecker Instituts für Experimentelle Dermatologie (LIED), Herrn Prof. Dr. rer. nat. Hauke Busch, für die Möglichkeit, die Experimente in seinem Labor durchzuführen, und für die Bereitstellung aller benötigten Materialien.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Anika Kasprick für die intensive Betreuung vor allem während der experimentellen Phase meiner Arbeit bedanken. Sie stand mir jederzeit zur Hilfe für die Lösung eines Problems, das sich während meiner Versuche ergab. Ihr verdanke ich Kenntnisse um wissenschaftliche Praxis und Schriften und die Unterstützung von der Bewerbung bis zur Erstellung von Präsentationen und Postern.

Frau Dr. rer. physiol. Katja Bieber möchte ich als Mentorin ebenfalls für ihre Ratschläge bei auftretenden Problemen danken.

Ich danke weiterhin Sarah Flaswinkel für die Einführung in meine Methoden und die Beantwortung jeglicher Fragen, die sich zu diesen im Verlauf ergaben.

Ich möchte mich herzlich bei allen Mitgliedern des LIED für die freundliche Atmosphäre im Labor und die stete Hilfsbereitschaft bedanken. Hier möchte ich besonders Claudia Kauderer, Astrid Fischer und Vanessa Krull für die Hilfe bei jeglichen technischen Problemen danken. Frau Dr. rer. nat. Maxi Hofrichter danke ich für die geduldige Einführung in die Arbeit mit Zellkulturen. Weitere Unterstützung erhielt ich u. a. durch Frau Dr. rer. nat. Shirin Emtenani und Herrn Dr. rer. hum. biol. Yask Gupta.

Besonderer Dank gilt auch meinen Doktoranden-Kolleginnen Hannah Zillikens, Pia Stüssel und Kerstin Neuschütz für ihre mentale Unterstützung und vor allem die vielen witzigen gemeinsamen Stunden, die wir auf den Retreats, den Journal Clubs und den Tagungen in Göttingen und Lübeck verbracht haben. Ich danke euch für den steten Beistand, wenn es zwischendurch mal nicht so geklappt hat, wie es sollte.

Ich danke dem Graduiertenkolleg „Modulation von Autoimmunität“ (GRK 1727) und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Förderung durch ein Stipendium. Dies machte es mir möglich, das Medizinstudium für die Dauer der Forschungsarbeit ruhen zu lassen. Das GRK 1727 sowie das Exzellenzcluster „Entzündung an Grenzflächen“ bildeten ein wissenschaftliches Umfeld, das mir Chancen, meine Ergebnisse zu präsentieren, und immer die Möglichkeit zum Austausch von Informationen gab. Beides habe ich sehr zu schätzen gelernt.

Zuletzt danke ich besonders herzlich meiner Familie, meinem Freund Hanno und meinen Freunden für die Unterstützung während meiner gesamten Studienzeit, die gemeinsamen Erfahrungen und Erlebnisse und bereichernden Begegnungen.

Anhang

Ethikantrag zur Verwendung des Immunapheresematerials von Pemphigus-Patienten, Aktenzeichen: 12-178



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Herrn
Prof. Dr. med. Enno Schmidt
Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie
im Hause

Ethik-Kommission

Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Stellv. Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Frank Gieseler

Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann
Tel.: +49 451 3101 1008
Fax: +49 451 3101 1024
ethikkommission@uni-luebeck.de

Aktenzeichen: 12-178

Datum: 16. September 2016

12-178: Autoantikörperreaktivität und Pathophysiologie bei blasenbildenden Autoimmunerkrankung (Pemphigoid und Pemphigus)
Teilprojekt: Identifizierung potenzieller Therapeutika durch selektive Inhibition intrazellulärer Signalwege in Autoantikörper-aktivierten Keratinozyten.
Ihr Schreiben vom 12. September 2016

Ralf Lüdewig

Sehr geehrter Herr Prof. Schmidt,

die Ethik-Kommission nimmt das Teilprojekt zu o.g. Studie zur Kenntnis.

Folgende Unterlagen haben vorgelegen:

- Ihr Anschreiben vom 12. September 2016
- Synopsis.

Mit freundlichen Grüßen

A. Katalinic
Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Vorsitzender

Publikationen und Vorträge

Publikationen

- 2020 I. Burmester*, S. Flaswinkel*, C.-S. Thies, A. Kasprick, M. Kamaguchi, V. Bumiller-Bini, S. Emtenani, N. Feldmann, K. Krisin, E. Schmidt, N. van Beek, D. Zillikens, C. Hammers, J. Hundt*, R. Ludwig* **equal contributors*
Identification of novel therapeutic targets for blocking acantholysis in pemphigus, British Journal of Pharmacology

Vorträge

- 2016 Autumn-Retreat des GRK 1727 in Bad Segeberg
Validation of signaling cascades after binding of pemphigus antibodies

Poster

- 2017 Spring-Retreat des GRK 1727 in Lübeck
Validation of signaling cascades after binding of pemphigus antibodies
- 2017 *Scientific Conference of International Pemphigus & Pemphigoid Foundation*
in Lübeck
C.-S. Thies, S. Flaswinkel, E. Schmidt, R. Ludwig, A. Kasprick
Validation of signaling cascades after binding of pemphigus antibodies