

# **Untersuchungen zu den Mechanismen der Assemblierung und Disassemblierung von Desmosomen am Beispiel des Pemphigus**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften  
an der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München



Vera Rötzer

München 2015

Dissertation eingereicht am: 12.10.2015

Mündliche Prüfung am: 18.01.2016

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Hans Straka
2. Gutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Anja Horn-Bochtler

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation „Untersuchungen zu den Mechanismen der Assemblierung und Disassemblierung von Desmosomen am Beispiel des Pemphigus“ von mir selbstständig angefertigt wurde und ich keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die aus anderen Quellen wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen wurden gekennzeichnet.

Der Großteil der hier beschriebenen Ergebnisse und dargestellten Abbildungen wurde bereits in den folgenden Arbeiten veröffentlicht und in der vorliegenden Dissertation mit der Erlaubnis der Verlage verwendet:

- Rötzer V, Hartlieb E, Vielmuth F, Gliem M, Spindler V, Waschke J (2015). E-cadherin and Src associate with extradesmosomal Dsg3 and modulate desmosome assembly and adhesion. *Cellular and Molecular Life Science*, epub doi: 10.1007/s00018-015-1977-0.
- Rötzer V, Breit A, Waschke J, Spindler V (2014). Adducin is required for desmosomal cohesion in keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 289:14925-40, doi: 10.1074.
- Dehner C, Rötzer V, Waschke J, Spindler V (2014). A desmoplakin point mutation with enhanced keratin association ameliorates pemphigus vulgaris autoantibody-mediated loss of cell cohesion. *The American journal of pathology*, 184(9): 2528-2536, doi: 10.1016.
- Spindler V, Rötzer V, Dehner C, Kempf B, Gliem M, Radeva M, Hartlieb E, Harms G S, Schmidt E, Waschke J (2013). Peptide-mediated desmoglein 3 crosslinking prevents pemphigus vulgaris autoantibody-induced skin blistering. *Journal of Clinical Investigation*, 123(2): 800-811, doi: 10.1172.

Ich erkläre außerdem, dass die vorliegende Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt wurde.

München \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Vera Rötzer

## Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung.....	I
Inhaltsverzeichnis.....	II
Abkürzungsverzeichnis.....	V
Zusammenfassung.....	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Hautdecke .....	1
1.1.1 Struktur und Funktion .....	1
1.1.2 Die Epidermis .....	1
1.1.3 Adhäsionskontakte.....	2
1.1.3.1 Desmosomen.....	3
1.1.3.2 Adhärenskontakte .....	5
1.2 Desmosomaler Aufbau und Abbau .....	7
1.3 Das Zytoskelett der Zelle .....	8
1.3.1 Das Actin-Zytoskelett und dessen Begleitproteine .....	9
1.3.2 Intermediärfilamente .....	11
1.4 Pemphigus .....	13
1.4.1 Klinik des Pemphigus.....	13
1.4.2 Pathogenese von Pemphigus .....	15
1.4.2.1 Direkte Inhibierung der Desmoglein-Haftung und Desmoglein-Kompensationstheorie	16
1.4.2.2 Desmoglein-abhängige Signaltransduktion.....	18
1.4.2.3 Das Zytoskelett und Pemphigus .....	22
1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit .....	23
2 Material und Methoden.....	24
2.1 Material .....	24
2.1.1 Zelllinien und Bakterienstämme .....	24
2.1.2 Oligonukleotide, Plasmid-DNA und siRNA .....	24
2.1.3 Antikörper und Mediatoren .....	25
2.1.4 Chemikalien.....	28
2.1.5 Puffer und Lösungen .....	32
2.1.6 Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	35

## Inhaltsverzeichnis

---

2.2 Methoden.....	36
2.2.1 Zellkultur .....	36
2.2.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen.....	36
2.2.3 RNA-Expressionsuntersuchungen .....	36
2.2.3.1 Isolation der Gesamt-RNA.....	37
2.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von RNA .....	37
2.2.3.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese) .....	37
2.2.3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	38
2.2.3.5 Gelelektrophorese von DNA .....	38
2.2.4 Amplifikation rekombinanter Fusionskonstrukte .....	38
2.2.4.1 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	39
2.2.4.2 Herstellung und Transformation chemokompetenter E.coli .....	39
2.2.4.3 Isolation von Plasmid-DNA aus E.coli.....	40
2.2.5 Transiente Transfektion von HaCaT-Zellen .....	40
2.2.6 Transgenes Cortactin-Mausmodell .....	40
2.2.6.1 Genotypisierung mittels PCR.....	40
2.2.6.2 Isolation und Kultivierung muriner primärer Keratinozyten.....	41
2.2.7 Proteinbiochemische Methoden.....	42
2.2.7.1 Aufreinigung von Patienten-/Kontrollantikörpern.....	42
2.2.7.2 Proteinkonzentrationsmessung .....	42
2.2.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	42
2.2.7.4 Western-Blotting (WB) und Immunodetektion von Proteinen.....	43
2.2.7.5 Immunpräzipitation.....	44
2.2.8 Messung der RhoA-Aktivität mittels modifiziertem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	44
2.2.9 Indirekte Immunfluoreszenzdarstellung .....	45
2.2.10 Proximity-Ligation-Assay (PLA).....	46
2.2.11 Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP) .....	46
2.2.12 Zelldissoziationsversuche .....	47
2.2.13 Biolumineszenz-basierte Messung von intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Ionen.....	47
2.2.14 Grafische Darstellung und statistische Auswertung der Datensätze .....	48
3 Ergebnisse .....	49
3.1 Rolle des Actin-Zytoskeletts und der Adhärenskontakte bei der Assemblierung von Desmosomen.....	49

## Inhaltsverzeichnis

---

3.1.1 Bedeutung von Adducin für das kortikale Actin-Zytoskelett .....	49
3.1.2 Wirkung der siRNA-vermittelten Depletion von Adducin und E-Cadherin auf die interzelluläre Haftung .....	52
3.1.3 Effekte der siRNA-induzierten Depletion von Adducin auf die Lokalisation von Dsg3 .....	55
3.1.4 Einfluss von E-Cadherin auf die zelluläre Verteilung von Dsg3 .....	60
3.1.5 Abhängigkeit der Regulierung der desmosomalen Assemblierung von Src .....	63
3.1.6 Einfluss von Cortactin auf die Dsg3-vermittelte interzelluläre Haftung .....	68
3.2 Mechanismen des desmosomalen Abbaus am Beispiel Pemphigus .....	71
3.2.1 Bedeutung von Adducin bei der durch PV-Autoantikörper verursachten Destabilisierung der Desmosomen .....	71
3.2.2 PKC-vermittelte Phosphorylierung von Adducin in der Pathogenese von PV .....	78
3.2.3 Reorganisation der Keratinfilamente in der Pathogenese von PV .....	84
4 Diskussion .....	87
4.1. Actin-Bindeproteine und E-Cadherin sind an der Assemblierung der Desmosomen beteiligt .....	87
4.1.1 Adducin und Cortactin regulieren die Ausbildung der Desmosomen über Dsg3 .....	87
4.1.2 E-Cadherin ist zusammen mit Src essentiell für die Assemblierung und Reifung der Desmosomen .....	90
4.2 Rolle von Adducin bei der PV-IgG-induzierten desmosomalen Disassemblierung .....	94
4.3 Reorganisation der Keratinfilamente als charakteristisches Phänomen bei der Destabilisierung der Desmosomen bei PV .....	97
4.4 Ausblick .....	99
Literaturverzeichnis .....	101
Abbildungsverzeichnis .....	118
Tabellenverzeichnis .....	120
Publikationsverzeichnis .....	121
Danksagung .....	123

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADD	Adducin (Bezeichnung des Gen)
ADP	Adenosindiphosphat
AFM	engl. atomic force microscopy; Rasterkraftmikroskopie
AK23	pathogener monoklonaler Antikörper, der gegen die extrazelluläre Domäne von Desmoglein 3 gerichtet ist
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Arp 2/3	engl. actin-related protein 2/3, Actin-assoziiertes Protein 2/3
ATP	Adenosintriphosphat
ÄDP	äußere dichte Plaqueregion
BAPTA-AM	1,2 bis (o-Aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure; Ca <sup>2+</sup> -Chelator
BCA	engl. bicinchoninic acid; Bicinchoninsäure, 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure
BIM-X	Bisindolylmaleimide X, Inhibitor der PKC
bp	engl. base pairs; Basenpaare
BSA	engl. bovine serum albumine; Kälberserum
bzw.	beziehungsweise
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ion
cAMP	engl. cyclic adenosinmonophosphate; zyklisches Adenosinmonophosphat
CK	engl. cytokeratin, Zytokeratin(filamente)
cm	Zentimeter
CNF-1	engl. cytotoxic necrotising factor 1; Toxin zur Aktivierung von Rac1, Cdc42 und RhoA
CNF $\gamma$	engl. cytotoxic necrotising factor $\gamma$ ; Toxin zur Aktivierung von RhoA
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CTTN	Cortactin (Genbezeichnung)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPEC	Diethylpyrocarbonate
d.h.	das heißt
DM	dichte Mittellinie
DMEM	engl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. deoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
Dsc	Desmocollin
Dsg	Desmoglein
DP	Desmoplakin
DTT	Dithiothreitol

## Abkürzungsverzeichnis

---

EBS	Epidermolysis-Bullosa-Simplex
EC	engl. extracellular domain; extrazelluläre Domäne
E-Cad	E-Cadherin
ECL	engl. enhanced chemiluminescence; erweiterte Chemilumineszenz
E.coli	Escherichia coli
EEA-1	engl. early endosome antigen-1, Marker für Endosomen
EGFR	engl. epidermal growth factor receptor; epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
EGTA	engl. ethylene glycol tetraacetic acid; Ethylendioxy-bis-(ethylennitrilo)-tetraessigsäure; C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub>
ELISA	engl. enzyme-linked immunosorbent assay; antikörperbasiertes Nachweisverfahren mit enzymatischer Farbreaktion
engl.	englisch; englische Bezeichnung
ERK	engl. extracellular-signal regulated kinases
Fc	engl. crystallisable fragment; kristallisierbares Fragment eines Antikörpers
FKS	fötales Kälberserum
FRAP	engl. fluorescence recovery after photobleaching
G	Gramm
G	mittlere Erdbeschleunigung, Ortsfaktor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	engl. green fluorescent protein, grün fluoreszierendes Protein
griech.	griechisch, griechische Bezeichnung
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
H	Stunde(n)
HaCaT	engl, human adult low Ca <sup>2+</sup> high temperature, humane epitheliale Keratinozyten
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HbSS	engl. Hanks' Balanced/Buffered Salt Solution, gepufferte Salzlösung nach Hanks
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HSP27	engl. heat-shock protein 27; Hitzeschockprotein 27
I	engl. insoluble; unlöslich
IDM	innere dichte Plaqueregion
IF	Immunfluoreszenzdarstellung
IgG	Immunglobuline der Klasse G
IP	Immunpräzipitation
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
Kan	Kanamycin



## Abkürzungsverzeichnis

---

kDa	Kilodalton
L	Liter
lat.	lateinisch, lateinische Bezeichnung
LB	engl. lysogeny broth; Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien
M	Molar, mol/L
mA	Milliampere
MAPK	engl. mitogen-activated protein kinase; Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDCK-Zellen	engl. Madin Darby canine kidney cells; Epithelzellen aus der Niere des Hundes
MEK	engl. murine epidermal keratinocytes; epidermale Keratinozyten aus der Maus
MeOH	Methanol
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
MK2	Synonym für MAPKAPK2, engl. MAPK-activated protein kinase 2
mM	millimolar, mmol/L
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
n.s.	engl. not significant, nicht significant
n.t.	non-targeting
NaF	Natriumfluorid
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NaOH	Natronlauge
nM	Nanomolar, nmol/L
nm	Nanometer
NPG	Natrium-Propylgallat
OD	optische Dichte
P	Phosphatgruppe
PBS	engl. phosphate buffered saline
PCA	engl. para-Cumaricacid; para-Cumarsäure
PCR	Polymeraskettenreaktion
PF	Pemphigus foliaceus
PG	Plakoglobin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
Pkp	Plakophilin
PLA	engl. proximity ligation assay

## Abkürzungsverzeichnis

---

PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat, PKC-Aktivator
PMSF	Benzylsulfonylfluorid, Phenylmethansulfonylfluorid
PV	Pemphigus vulgaris
Rack1	engl. receptor of activated C kinase 1
RNA	engl. ribonucleic acid; Ribonukleinsäure
ROI	engl. region of interest
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
S	engl. soluble; löslich
SB	Stratum basale
SB202190	[4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole]; p38MAPK Inhibitor
SC	Stratum corneum
SDS	engl. sodium dodecyl sulfate; Natriumdodecylsulfat
SEM	engl. standard error of mean; Standardfehler
SG	Stratum granulosum
SH	engl. Src homology domain, homologe Domäne für Src
siRNA	engl. small interfering RNA
Src	Rous sarcoma (Src) kinase
SSp	Stratum spinosum
TP	Tandempeptid
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
Tyr	Tyrosin
TX-100	Triton-X-100
U	Unit
ULF	engl. unit length filaments
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
WB	Westernblot
ZA	Zonula adherens
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celcius
%	Prozent
∅	Durchmesser

## Zusammenfassung

Desmosomen sind spezialisierte Haftstrukturen, die die Stabilisierung des Zellverbundes gegenüber Zug- und Scherkräften gewährleisten. Dazu binden desmosomale Cadherine extrazellulär an Haftmoleküle benachbarter Zellen und sind intrazellulär unter anderem über Desmoplakin (DP) und Plakoglobin (PG) an Keratinfilamenten verankert. Insbesondere für das desmosomale Cadherin Desmoglein 3 (Dsg3), das sowohl innerhalb als auch außerhalb der Desmosomen vorkommt, wurde eine wichtige Bedeutung als Adhäsionsprotein in Keratinozyten nachgewiesen. Trotz ihrer Funktion, Widerstand gegen hohe mechanische Belastungen zu vermitteln, sind Desmosomen dynamische Strukturen, die einem stetigen Umbau unterliegen. Die Notwendigkeit einer genauen Regulierung des desmosomalen Auf- und Abbaus wird durch das Vorkommen zahlreicher vererbbarer und autoimmuner Erkrankungen unterstrichen. In der vorliegenden Arbeit wurden Mechanismen, die der geordneten Assemblierung der Desmosomen und der Disassemblierung nach Störung der desmosomalen Zell-Zell-Haftung unterliegen, untersucht.

Im ersten Teil der vorliegenden Studien standen die Vorgänge der Desmosomenbildung in humanen Keratinozyten im Fokus. Adhärenskontakte und deren Zusammenwirken mit Actinfilamenten spielen eine wichtige Rolle in der Ausbildung der Desmosomen. Für die Actin-Bindeproteine Adducin und Cortactin wurde durch siRNA-Interferenzstudien eine essentielle Funktion für die Vermittlung der desmosomalen Zell-Zell-Haftung nachgewiesen. Die siRNA-induzierte Depletion von Adducin verursachte eine Reduktion der zytoskelettal-gebundenen Dsg3-Moleküle, was mit einer reduzierten Membranmobilität korrelierte. Für Cortactin wurde eine direkte Interaktion mit Dsg3 mittels zweier unabhängiger molekularbiologischer Methoden nachgewiesen. Dies deutet auf eine direkte Rolle des Cortactins in der Regulierung der Desmosomen hin. Die siRNA-induzierte Depletion von E-Cadherin führte zum Verlust der membranständigen Lokalisation von Dsg3 und zu einer verminderten Verankerung der Dsg3-Moleküle innerhalb der zytoskelettalen Proteinfraction. Es wurde ein Signalkomplex aus extradesmosomalen Dsg3, E-Cadherin und der Tyrosinkinase Src identifiziert, dessen Stabilität durch Src reguliert wurde. Hierbei wurden Dsg3 und E-Cadherin an Tyrosinresten durch Src phosphoryliert, deren Aktivität sowohl für die Inkorporation von Dsg3 in die Desmosomen als auch für die Reifung der Desmosomen zu stabilen Haftkontakten essentiell war.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die Prozesse der desmosomalen Disassemblierung nach Inkubation mit Pemphigus vulgaris-Autoantikörpern (PV-IgG) analysiert.

PV ist eine etablierte Modellerkrankung zur Untersuchung der Desmosomen-vermittelten Zelladhäsion in Keratinozyten. Die Bindung der gegen Dsg1 und Dsg3 gerichteten PV-IgGs induziert eine Reduktion der Dsg3-Proteinmengen und eine Aktivierung verschiedener Signalwege, u.a. von RhoA und PKC. Da diese Signalwege ebenfalls Adducin regulieren und PV-IgGs eine Umorganisation des Actin-Zytoskeletts verursachen, die durch exogene Aktivierung von RhoA verhindert wird, wurde das Zusammenspiel von PV-IgGs, RhoA und Adducin untersucht. Die protektive Wirkung der RhoA-Aktivierung auf die Zell-Zell-Haftung und die Verteilung von Dsg3 nach Applikation der PV-IgGs war sowohl von der Expression als auch von der Phosphorylierung von Adducin an Serin726 abhängig. Interessanterweise verursachten PV-IgGs über den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und über PKC, unabhängig von RhoA, eine schnelle Phosphorylierung von Adducin an Serin726. Die durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom- und PKC-vermittelte Phosphorylierung von Adducin könnte somit einen Rettungsmechanismus der Keratinozyten darstellen, der in Reaktion auf die PV-IgG-Bindung einsetzt und die desmosomale Assemblierung induziert. Ferner wurde die reduzierte Verankerung der Keratinfilamente an Desmosomen, ein weiteres Merkmal der PV-Pathogenese, mit der Aktivität von PKC korreliert. Keratinfilamente, die einer dynamischen Regulierung durch p38MAPK unterliegen, lösen sich in Reaktion auf PV-IgGs von den Desmosomen und akkumulieren perinukleär. Dieses Phänomen der Zytokeratin-Retraktion wurde durch Inkubation mit Tandempeptid (TP), das die Transinteraktion von Desmogleinen stärkt, verhindert. Zusammenfassend liefern die in dieser Arbeit gewonnenen Daten neue Erkenntnisse über die Mechanismen des desmosomalen Umsatzes. Adducin und E-Cadherin nehmen eine essentielle Rolle in der Ausbildung und Aufrechterhaltung der desmosomalen Haftstrukturen ein. Untersuchungen der pathogenen Effekte der PV-IgGs unterstreichen die hohe Relevanz eines intakten Actin- und Keratin-Stützgerüsts für die interzelluläre Haftung von Keratinozyten. Diese Befunde könnten in Zukunft auch von medizinischer Relevanz für die Therapie von Pemphigus-Patienten sein.

## **1 Einleitung**

### **1.1 Die Hautdecke**

#### **1.1.1 Struktur und Funktion**

Als größtes Organ des menschlichen Körpers bedeckt die Haut die gesamte Körperoberfläche und macht etwa 15% des Gesamtgewichts eines Erwachsenen aus. Die Haut ist ein sehr dynamisches Organ, das sich stetig verändert. Durch die Wanderung der Zellen aus tieferen Schichten zur Oberfläche werden abgeschilferte Zellen der oberen Hautschichten ersetzt. In anatomischer Hinsicht wird die Hautdecke in drei verschiedene Schichten unterteilt: die Epidermis, die Dermis und die Subkutis. Als tiefste Schicht der Hautdecke liegt die Subkutis der Dermis an und setzt sich hauptsächlich aus Fettgewebe und lockerem Bindegewebe zusammen (Kanitakis, 2002; Lüllmann-Rauch, 2012). Die Dermis besteht vorwiegend aus Bindegewebe und enthält sowohl Blut- und Lymphgefäße als auch Nervenzellen und wird nach außen hin von der Epidermis begrenzt. Indem die Haut als Hüllorgan eine Abgrenzung zwischen dem Organismus und der Umwelt bildet, übernimmt sie wichtige Aufgaben für den Organismus. Dazu zählen sowohl die Aufrechterhaltung des Wasser- und Elektrolythaushaltes (Begrenzung des inneren Milieus gegen die Außenwelt) als auch die Abwehr von Umweltkomponenten, wie mechanische und chemische Schäden, Hitze, Infektionen und Wasser (Begrenzung der Außenwelt gegen das innere Milieu) (Proksch et al., 2008). Die Haut nimmt zudem eine wichtige Funktion in der Immunantwort, der Thermoregulierung und in der Synthese von Vitamin D ein (Welsch et al., 2014).

#### **1.1.2 Die Epidermis**

Die Epidermis besteht aus einem mehrschichtig verhornten Plattenepithel, das vorwiegend von Keratinozyten gebildet wird. Diese spezifischen Epithelzellen erneuern sich im Laufe von vier Wochen und sind durch Adhäsions- und Verschlusskontakte, die im Abschnitt 1.1.3 genauer beschrieben werden, untereinander verbunden. Zusätzlich sind in der Epidermis Melanozyten, Langerhans-Zellen und Merkel-Zellen sowie epidermale Derivate wie Haare und Nägel angesiedelt. Die sich stets erneuernde Epidermis kann allgemein aufgrund der Morphologie und dem Reifungsgrad der Keratinozyten in vier Schichten unterteilt werden. Die basale Epithelschicht (Stratum basale) liegt der Dermis auf und besteht aus einer Einzelschicht aus kubischen Keratinozyten, die über Hemidesmosomen und fokale Kontakte an der Basallamina befestigt sind. In der Basalschicht befinden sich auch die teilungsfähigen Stammzellen. Die aufliegende

Stachelzellschicht (Stratum spinosum) wird von mehreren Zelllagen polygonaler Keratinozyten gebildet, die über Desmosomen fest mit den benachbarten Zellen verbunden sind. Hier ist ein Netzwerk aus Zytokeratinfilamenten vorzufinden, das der Haut durch die Verankerung an die Desmosomen mechanische Stärke verleiht. Die darauf folgende Körnerzellschicht (Stratum granulosum) enthält abgeflachte Zellen, die mit basophilen Keratohyalin granula angereichert sind. Daneben produzieren die Keratinozyten in diesem Stadium lysosomale Enzyme, die wichtig für die terminalen Verhornungsprozesse der obersten Epithelschichten sind. Die Hornschicht (Stratum corneum) ist aus vielen Lagen abgeflachter, verhornter Zellen aufgebaut, die weder Zellkerne noch Organellen enthalten und von einer kontinuierlichen Schicht Extrazellulärmatrix umhüllt sind (Chu, 2008; Welsch et al., 2014). Unter der Mitwirkung der Verschlusskontakte in der Körnerzellschicht bildet diese Schicht aus Korneozyten die natürliche Barriere gegen Wasser- und Elektrolytverlust und das Eindringen von Mikroben (Madison, 2003; Wickett und Visscher, 2006). In der gesunden Haut finden mitotische Prozesse ausschließlich in der Basalschicht statt. Die drei unteren Schichten bestehen aus lebenden Keratinozyten, wohingegen die Hornschicht tote Zellen enthält. Abgeschilferte Korneozyten werden durch den kontinuierlichen Strom epithelialer Zellen von der Basalschicht hin zur Hautoberfläche erneuert (Chu, 2008; Murphy, 1997).

### 1.1.3 Adhäsionskontakte

Ein wesentliches Merkmal vielzelliger Organismen ist die direkte Interaktion benachbarter Zellen. Je nach ihrer Struktur und ihrer Funktion können drei Sorten von Zell-Zell-Kontakten unterschieden werden: Verschlusskontakte, Kommunikationskontakte und Adhäsionskontakte. Die hauptsächliche Funktion der Verschlusskontakte, deren Hauptvertreter die Tight Junctions darstellen, liegt in der Abdichtung der Interzellularräume (Anderson et al., 2004; Schneeberger und Lynch, 1992). Diese Kontakte bilden über die Interaktion der Transmembranproteine, wie den Occludinen und den Claudinen, eine Diffusionsbarriere und sorgen für die polare Differenzierung der Zellen (Anderson, 2001; Gumbiner, 1993). Kommunikationskontakte gewährleisten hingegen die chemische und elektrische Kopplung der Zellen. Dies erfolgt bei den Gap Junctions (Nexus) durch eine Zusammenlagerung von zwei Connexonen mit Connexin als Hauptbestandteil (Evans und Martin, 2002). Die mechanische Zellhaftung wird durch Desmosomen und Adhärensjunktionen gewährleistet, die zusammen die Gruppe der Adhäsionskontakte darstellen (Welsch et al., 2014). Adhäsionskontakte weisen folgende gemeinsame Bestandteile auf:

- Transmembranproteine, die mittels ihrer extrazellulären Domäne  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig an Moleküle der benachbarten Zellen binden.

- Plaqueproteine, die den intrazellulären Bereich der Transmembranproteine am Zytoskelett verankern.
- Filamente des Zytoskeletts

Unterschiede zwischen Desmosomen und Adhärensjunktionen manifestieren sich in ihrer Struktur, ihrer Cadherin-Komposition (entweder desmosomale oder klassische Cadherine), ihren Plaqueproteinen und ihren assoziierten Zytoskelett-Bestandteilen (Franke, 2009; Green et al., 2010; Holthofer et al., 2007; Lüllmann-Rauch, 2012).

### 1.1.3.1 Desmosomen

Desmosomen (Maculae adherentes) sind komplexe scheibenförmige Kontakte mit einem Durchmesser von etwa 0,2-0,5  $\mu\text{m}$  und einer symmetrischen Struktur bestehend aus zwei Verdichtungsstellen (Plaques), die von benachbarten Zellen stammen und einen interzellulären Spalt von  $\sim 30$  nm bilden. Die desmosomale Ultrastruktur kann weiterhin in zwei Plaqueregionen, einer äußeren elektronendichten Region sowie einer inneren elektronendichten Region und einer dichten Mittellinie, an der die Interaktion der Cadherine benachbarter Zellen stattfindet, unterteilt werden (Holthofer et al., 2007; Yin und Green, 2004). Desmosomen sind aus drei verschiedenen Proteintypen aufgebaut: den desmosomalen Cadherinen (Typ1-Transmembranproteinen) und Vertretern der Amadillo- sowie der Plakinfamilie (Plaqueproteine) (Angst et al., 2001; Garrod et al., 2002a; Koch und Franke, 1994). Diese assemblieren sich zu sogenannten „halben Desmosomen“ an der Zellmembran, bevor sie an Partnern der gegenüberliegenden Zelle binden und in Abhängigkeit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zu funktionellen Desmosomen heranreifen (Garrod, 2010). Desmosomale Cadherine sind die adhäsiven Einheiten der Desmosomen und können weiterhin in Desmogleine (Dsg1-4) und Desmocolline (Dsc1-3) unterteilt werden. Diese bestehen aus fünf Extrazellulärdomänen (EC 1-5) sowie einer transmembranären und einer zytoplasmatischen Domäne. Über ihre Extrazellulärdomänen binden desmosomale Cadherine in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen entweder in cis- oder trans-Interaktion an Partnermoleküle benachbarter Zellen und vermitteln somit die Haftung zwischen den Zellen (Garrod und Chidgey, 2008; Getsios et al., 2004; Godsel et al., 2004). Neben einer homophilen Bindung können desmosomale Cadherine auch heterophile Interaktionen eingehen (Heupel et al., 2008; Nie et al., 2011; Spindler et al., 2009). Während die transmembranäre Domäne die Plasmamembran durchspannt, interagiert die zytoplasmatische Domäne der desmosomalen Cadherine zum einen mit Mitgliedern der Amadillo-Proteinfamilie, wie Plakoglobin (PG), das ebenfalls in Adhärenskontakten vorkommt (Abschnitt 1.1.3.2) und mit Plakophilin (Pkp1-3), und zum anderen mit Desmoplakin (DP), einem Vertreter der Plakin-Proteinfamilie. Hierbei bindet PG direkt an die zytoplasmatische Domäne der

desmosomalen Cadherine und vermittelt über die Interaktion mit DP die Anheftung der Keratinfilamente der Zelle an die Desmosomen. Zusammen bildet die Assoziation von PG, Pkp und DP die äußere dichte Plaques unter der Membran, wohingegen die Bindung zwischen DP und dem Keratin-Zytoskelett die innere dichte Plaques darstellt (Delva et al., 2009; Getsios et al., 2004; Waschke, 2008) (Abb. 1).

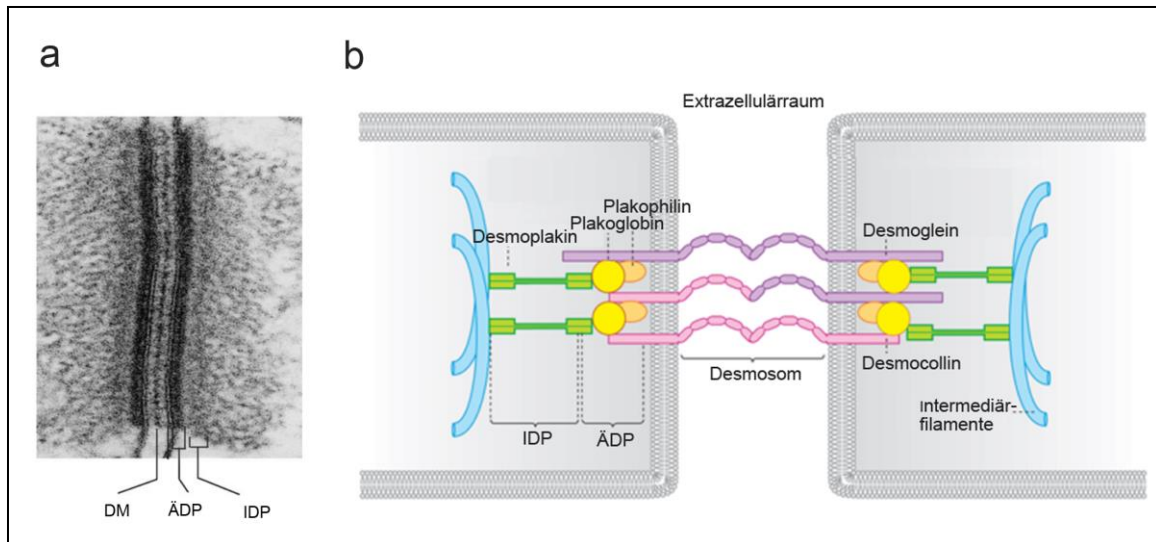


Abbildung 1: Aufbau eines Desmosoms

(a) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Desmosoms (Rinderzunge) [mit der Genehmigung des Elsevier Verlages verwendet und modifiziert nach Yin und Green, 2004]. (b) Schematische Darstellung eines Desmosoms [mit der Genehmigung des John Wiley & Sons Verlages verwendet und modifiziert nach Waschke und Spindler, 2014]. IDP: innere dichte Plaquerregion; ÄDP: äußere dichte Plaquerregion; DM: dichte Mittellinie

Das Expressionsmuster der desmosomalen Komponenten ist sowohl gewebs- als auch differenzierungsspezifisch, und Änderungen in deren zellulären Verteilung werden mit einer Vielzahl an teilweise letalen Erkrankungen verbunden (Delva et al., 2009; Desai et al., 2009; Garrod et al., 2002b; Huber, 2003; Johnson et al., 2014; Waschke, 2008). Aufgrund ihres starken interzellulären Haftvermögens sind Desmosomen insbesondere in Geweben wie dem Myokard und der Epidermis lokalisiert, die einer kontinuierlichen und starken mechanischen Belastung ausgesetzt sind. Innerhalb der letzten Jahre häuften sich die Erkenntnisse, dass die Haftstärke der Desmosomen nicht ausschließlich auf deren komplexen molekularen Struktur beruht, sondern auch zum einen auf deren Beteiligung an der Regulation verschiedener Signalwege (Dubash und Green, 2011; Garrod und Chidgey, 2008; Nekrasova und Green, 2013; Spindler und Waschke, 2014) und zum anderen auf deren Fähigkeit, einen sogenannten ‚hyperadhäsiven‘ Zustand einzunehmen. Dieser Begriff beschreibt den  $Ca^{2+}$ -unabhängigen Zustand, der auf der besonders



kräftigen und stabilen Bindung zwischen Desmosomen beruht und den vermutlich die überwiegende Mehrheit der Desmosomen in der Epidermis innehat (Garrod et al., 2005). Hierbei ist die starke Verankerung der Keratinfilamente an die Desmosomen von Bedeutung (Dehner et al., 2014; Garrod und Kimura, 2008; Kitajima, 2013), die über DP reguliert wird (Hobbs et al., 2011; Hobbs und Green, 2012). Studien zeigten, dass Desmosomen von Keratinozyten, die bis einige Tage nach der Konfluenz kultiviert wurden,  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig waren und eine vergleichbar starke Adhäsionskraft wie intakte Epithelien in *in vivo*-Modellen aufwiesen. Dieser hyperadhäsive Zustand kann allerdings unter der Signalgebung von Proteinkinase C (PKC) reversibel in einen  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Status zurückgeführt werden (Garrod et al., 2005; Kimura et al., 2007; Wallis et al., 2000).

### 1.1.3.2 Adhärenskontakte

Adhärensjunktionen stellen die zweite Gruppe der Zell-Zell-Adhärenskontakte dar und weisen große Ähnlichkeiten zu den desmosomalen Strukturen auf: die Adhärensmoleküle gehören zu den  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen klassischen Cadherinen, wie z. B. E-Cadherin und P-Cadherin in Epithelien. Ebenfalls werden benachbarte Zellen über eine Bindung der extrazellulären Domänen der Cadherine miteinander verknüpft (Goodwin et al., 1990; Yap et al., 1997). Als Plaqueproteine dienen eine Gruppe von Cateninen, wie p120-Catenin und  $\beta$ -Catenin, die beide direkt an die Cadherine binden, und  $\alpha$ -Catenin, das abhängig von der Zugspannung als einziger Vertreter direkt mit den Actinfilamenten interagiert. Somit vermittelt  $\alpha$ -Catenin über eine Bindung an  $\beta$ -Catenin die Assoziation des Actin-Zytoskeletts mit dem Cadherin/Catenin-Komplex (Harris und Tepass, 2010; Vasioukhin und Fuchs, 2001; Yonemura et al., 2010) (Abb. 2).  $\gamma$ -Catenin ist identisch mit PG, das vornehmlich mit den desmosomalen Cadherinen assoziiert und die Funktion des  $\beta$ -Catenins in dem Cadherin/Catenin-Komplex einnehmen kann, sodass über dieses Molekül ein Austausch zwischen beiden Kontakttypen besteht (Goodwin und Yap, 2004; Niessen, 2007).

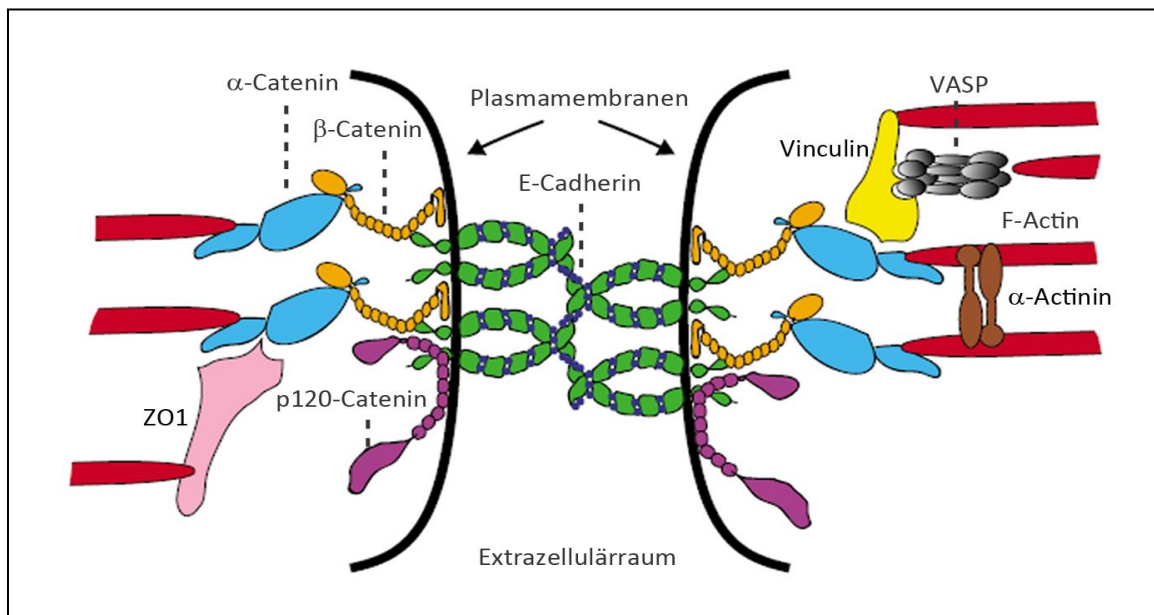


Abbildung 2: Aufbau eines Adhärenskontakts

Schematische Darstellung eines Adhärenskontakts [mit der Genehmigung des Elsevier Verlages verwendet und modifiziert nach Vasioukhin und Fuchs, 2001].

In polarisierten Epithelzellen sind die Adhärensjunctionen in einer Zonula adherens (ZA), einem Adhäsionsgürtel am apikalen Zellpol nahe der Verschlusskontakte, lokalisiert und von einem Band aus Actinfilamenten umgeben. Basolateral dieser ZA sind die Adhärenskontakte fleckförmig gebündelt (Niessen, 2007; Yonemura, 2011). Neben ihrer charakteristischen bandförmigen Lokalisierung sind Adhärensjunctionen die Schlüsselfaktoren für die Organisation des Gewebes einschließlich der Ausbildung der Zellpolarität, der embryonalen Entwicklung und der Zellwanderung (Goodwin und Yap, 2004; Gumbiner, 2005; Niessen et al., 2011) und fungieren als Spannungssensoren, die mechanische Stimuli in eine chemische Reaktion übersetzen (Lecuit und Yap, 2015; Yonemura et al., 2010). Weiterhin ist es seit mehr als zwei Jahrzehnten allgemein anerkannt, dass Adhärensjunctionen nicht nur zusammen mit den Desmosomen die interzelluläre Haftung gewährleisten, sondern dass sie ebenfalls zwingend erforderlich für die Assemblierung der Desmosomen sind (Amagai et al., 1995a; Lewis et al., 1994; O'Keefe et al., 1987). So zeigte etwa eine Studie mit E-Cadherin-depletierten Epithelzellen, dass PG essentiell für die Kommunikation zwischen Adhärenskontakten und Desmosomen ist, indem es die Bildung der Desmosomen in Gegenwart von E-Cadherin initiiert (Lewis et al., 1997). Eine direkte Interaktion zwischen desmosomalen und klassischen Cadherinen, namentlich zwischen Dsg3 und E-Cadherin, wurde nach Entzug von extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen detektiert (Trojanovsky et al., 1999).

### 1.2 Desmosomaler Aufbau und Abbau

Obwohl Desmosomen eine starke interzelluläre Haftung gewährleisten, handelt es sich hierbei um dynamische Strukturen, die sich z.B. im Zuge der epidermalen Differenzierung, der Mitose oder der Wundheilung umformen. Desmosomen unterliegen einem stetigen Umsatz und damit auch einem Austausch ihres Bestandes an desmosomalen Cadherinen. Aktuelle Erkenntnisse über die Dynamik der Desmosomen konnten durch den Einsatz moderner Verfahren, wie der Detektion fluoreszierender Reporter in der Lebendzellmikroskopie und in Fluoreszenz-basierten Bleichungsstudien (engl. fluorescence recovery after photobleaching; FRAP) gewonnen werden (Desai et al., 2009; Nekrasova und Green, 2013). Desmosomale Cadherine und auch PG werden konstitutiv als Propeptid synthetisiert und gelangen über den klassischen sekretorischen Weg an die Plasmamembran (Green et al., 2010). Der Transport der desmosomalen Proteine an die Zelloberfläche erfolgt über unterschiedliche Mechanismen, die auf verschiedenen Komponenten des Zytoskeletts beruhen (Green und Simpson, 2007). Desmosomale Cadherine gelangen in Vesikeln, die über Kinesin-Motorproteine entlang der Mikrotubuli transportiert werden, an die Plasmamembran (Nekrasova et al., 2011). Dort gruppieren sie sich unter erhöhten extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen und in Gegenwart von Adhärenskontakten zu Transdimeren (Green und Simpson, 2007) und werden dann vermutlich lateral in bereits bestehende Desmosomen verschoben (Sato et al., 2000) oder bilden *de novo* Desmosomen. Die übrigen zytoplasmatischen Plaquekomponenten werden abhängig vom Actin-Zytoskelett an neugebildete Desmosomen befördert. Insbesondere für DP wurde gezeigt, dass dieses mit den zunächst perinukleär lokalisierten Keratinfilamenten verankert wird, sobald zwei benachbarte Zellen aneinander gebunden werden (Green und Simpson, 2007). Hierfür ist Pkp2 notwendig, das die Verknüpfung von DP mit den Keratinfilamenten vermittelt und sowohl PKC als auch RhoA rekrutiert. Die räumliche Nähe zu PKC bewirkt eine Phosphorylierung von DP und den Umbau des Actin-Zytoskeletts, beides Grundvoraussetzung für die Ausbildung der Desmosomen (Bass-Zubek et al., 2008; Godsel et al., 2010; Godsel et al., 2005). Zuletzt werden die Komplexe aus DP und Keratinfilamenten über Armadillo-Proteine an die entstehenden Desmosomen gebunden und sorgen für eine zusätzliche Stabilisierung (Godsel et al., 2004; Waschke, 2008). Werden Epithelzellen unter niedrigem  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt kultiviert, so weisen diese einen deutlich erhöhten Umsatz der desmosomalen Haftproteine auf. So wurde in diesen Zellen z.B. für Dsg1 gezeigt, dass dieses unter niedrigem  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt eine Halbwertszeit von 2,7 bis 4 h hat, während sich dessen Halbwertszeit nach der Ausbildung der Haftkontakte auf 20 bis 24 h erhöhte (Burdett, 1998). In einer weiterführenden Studie wurde mittels FRAP-Messungen exemplarisch für fluoreszierende Dsc2-Moleküle gezeigt, dass desmosomale Cadherine in ausgereiften Desmosomen innerhalb

einer kurzen Zeitspanne ausgetauscht werden (Windoffer et al., 2002). Da Desmosomen generell extrem stabile Strukturen sind, weist die Entdeckung dieses schnellen Cadherin-Umsatzes auf die Existenz zweier unterschiedlicher Vorräte an desmosomalen Cadherinen hin: einem Desmosomen-gebundenen und einem leicht löslichen Anteil außerhalb der Desmosomen. Es wird spekuliert, dass diese extradesmosomalen Proteinmengen als Reserve dienen könnten, bevor die Cadherine in die Desmosomen integriert werden (Spindler und Waschke, 2014) und in den Prozessen der desmosomalen Disassemblierung als erstes degradiert werden (Jennings et al., 2011).

Anhand von Studien mit humanen Keratinozyten und Epithelzellen wird angenommen, dass sich desmosomale Proteine unter niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen zu halben Desmosomen formieren, die an die Plasmamembran transportiert und dort, da sie nicht zur Haftung der Desmosomen beitragen können, schließlich internalisiert und abgebaut werden (Demlehner et al., 1995; Duden und Franke, 1988). Sobald die extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration jedoch erhöht wird, setzt die Assemblierung der Desmosomen an der Zelloberfläche ein und die interzelluläre Haftung wird gestärkt (Hennings und Holbrook, 1983; Hobbs et al., 2011; Watt et al., 1984). Eine erhöhte exogene  $\text{Ca}^{2+}$ -Zufuhr führt weiterhin zu einer schnellen Aktivierung der Phospholipase C, was schließlich in einem Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels und in der Aktivierung der PKC resultiert. Wie bereits beschrieben, vermittelt PKC letztendlich über die Phosphorylierung von DP die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Ausbildung der Desmosomen (Kitajima et al., 1999).

### 1.3 Das Zytoskelett der Zelle

Das Zytoplasma eukaryotischer Zellen wird von einem dreidimensionalen Zytoskelett, einem Netzwerk aus Proteinfilamenten, durchzogen. Dieses ist an vielen zellulären Prozessen beteiligt, wie z.B. der mechanischen Stabilisierung der Zellform und -größe, dem Transport der Zellorganellen und Chromosomen sowie der Wanderung von Zellen (Fletcher und Mullins, 2010; Janmey, 1995). Das Zytoskelett setzt sich aus drei Arten von Proteinpolymeren zusammen, die entsprechend ihrer Funktion und dem Durchmesser ihrer Filamente unterteilt werden können: Actinfilamente ( $\varnothing$  7 nm), Intermediärfilamente ( $\varnothing$  10 nm) und Mikrotubuli ( $\varnothing$  25 nm). Allen drei Filamenttypen ist gemein, dass sie sich nach einem Baukastenprinzip zusammensetzen, welches die dynamische Selbstassoziation (Polymerisation) und Dissoziation (Depolymerisation) der entsprechenden filamentären Proteine und deren assoziierten Moleküle umfasst (Alberts B, 2002; Lüllmann-Rauch, 2012). Da sowohl das Actin-Zytoskelett als auch die Intermediärfilamente Hauptkomponenten der Adhäsionskontakte sind, werden diese im Folgenden genauer beschrieben.

### 1.3.1 Das Actin-Zytoskelett und dessen Begleitproteine

Innerhalb einer Zelle liegt Actin in zwei unterschiedlichen Formen vor - als globuläres Monomer (G-Actin) und als filamentäres Polymer (F-Actin). Actin-Monomere sind ATPasen, die sich an die schnell wachsenden (+) Enden der asymmetrischen Actinfilamente unter ATP-Hydrolyse anlagern. Die Depolymerisation der Actinfilamente findet an den (-) Enden durch Ablösung der ADP-gebundenen Actinunterheiten statt. In einem Prozess, der als ‚Tretmühlenmechanismus‘ bekannt ist, stehen die freigegebenen Actinunterheiten nach Austausch des Nukleotids einer erneuten Bindung an das F-Actin zur Verfügung. Auswachsende Actinfilamente werden wiederum in Einheiten höherer Ordnung organisiert und erfüllen vielfältige Funktionen in der Zelle (Pollard et al., 2000; Schmidt und Hall, 1998). Das Actin-Zytoskelett ermöglicht es somit der Zelle, mit seinen hochdynamischen und zugleich stabilisierenden Eigenschaften auf Umwelteinflüsse zu reagieren und essentielle Prozesse, wie etwa Zellteilung (Kunda und Baum, 2009), intrazellulären Transport (Heng und Koh, 2010) und Endozytose (Merrifield, 2004; Qualmann und Kessels, 2002), auszuüben. Um die wechselseitige Natur des Actin-Zytoskeletts zu verdeutlichen, seien hier zwei Beispiele genannt: indem das Actin-Zytoskeletts ein Geflecht aus quervernetzten kortikalen Actinfilamenten unterhalb der Zellmembran bildet, stabilisiert es zum einen die Zelle mechanisch und reguliert folglich auch deren Zellform. Zum anderen beruht die Wanderung von Zellen, ein Prozess, der Änderungen der Zellpolarität und Zellform umfasst, auf einem zeitlich und räumlich regulierten Umbau des Actin-Zytoskeletts (Pollard und Borisy, 2003; Rafelski und Theriot, 2004). Der dynamische Umbau des Actin-Zytoskeletts bedarf jedoch einer genauen Regulierung. Hierbei sind Mitglieder der Rho-GTPase-Familie, besonders Rac1, RhoA und Cdc42, die bekanntesten Regulatoren des Actin-Zytoskeletts. Rho-GTPasen sind molekulare Schalter, die durch eine Bindung von extrazellulären Signalen, wie Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Hormone, an deren spezifische Transmembranrezeptoren aktiviert werden. Aktive, GTP-gebundene Rho-GTPasen regulieren wiederum zusammen mit ihren assoziierten Kinasen die zeitliche und räumliche Aktivität einer Vielzahl an Effektormolekülen. Unter diesen befinden sich auch viele Actin-bindende Proteine (Hall, 1994; Hall, 1998; Heng und Koh, 2010; Lee und Dominguez, 2010). Entsprechend ihrer Funktion können Actin-bindende Proteine in drei Hauptgruppen unterteilt werden:

- Gruppe I: Proteine, die den Aufbau der Actinfilamente, d.h. sowohl die Zusammenlagerung der G-Actinmoleküle als auch den Auswuchs, die Stabilität und den Abbau der Actinfilamente regulieren.

- Gruppe II: Proteine, die Actinfilamente in funktionelle Systeme höherer Ordnung organisieren, d.h. Gruppierung bzw. Verknüpfung von F-Actin zu Bündeln oder losen Netzwerken.
- Gruppe III: Proteine, die ein stabiles mechanisches Gerüst organisieren, indem sie Actinfilamente an die Zellmembran knüpfen oder eine Interaktion der verschiedenen zytoskelettalen Filamenttypen vermitteln. Dieses Gerüst wird ebenfalls für den Myosin-vermittelten Transport von Vesikeln genutzt.

Wichtig hierbei ist, dass Actin-bindende Proteine nicht nur auf eine dieser Gruppen beschränkt sind (dos Remedios et al., 2003; Winder und Ayscough, 2005), was im Folgenden am Beispiel des Adducins und des Cortactins ausgeführt wird. Adducine umfassen eine Proteinfamilie von nah verwandten Isoformen ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ), die sich zu funktionellen Heterodimeren bzw. -tetrameren formieren, die entweder aus  $\alpha/\beta$ - oder  $\alpha/\gamma$ -Untereinheiten bestehen. Während die Isoformen  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Adducin ubiquitär exprimiert werden, ist das  $\beta$ -Adducin vorwiegend in Erythrozyten und im Gehirn vorzufinden (Matsuoka et al., 2000). Adducin (lat. adducere: zusammenführen) vermittelt zum einen die Bildung des Spectrin-basierten Zytoskeletts, indem es Spectrin an Actinfilamente rekrutiert und somit den Aufbau des Spectrin/Actin-Netzwerkes unterhalb der Plasmamembran fördert (Hughes und Bennett, 1995; Li et al., 1998). Zum anderen hat Adducin eine entscheidende Funktion in der Regulierung des Actin-Zytosketts, indem es Actinfilamente bündelt und deren schnell auswachsenden Enden bedeckt (Kuhlman et al., 1996; Taylor und Taylor, 1994). Neueren Daten zufolge ist Adducin auch an der Etablierung von Zell-Zell-Kontakten beteiligt (Naydenov und Ivanov, 2011). Sowohl *in vitro*- als auch *in vivo*-Studien demonstrierten eine vermehrte Lokalisierung von Adducin an interzellulären Verbindungen (Dong et al., 1995; Kaiser et al., 1989; Matsuoka et al., 1998). Zudem konnte nach siRNA-vermittelter Hemmung der Proteinexpression gezeigt werden, dass Adducin-defiziente Zellen eine verzögerte Neubildung von Adhärensjunktionen (Naydenov und Ivanov, 2010) und eine verminderte Zell-Zell-Haftung (Chen et al., 2011) aufweisen.

Obwohl Adducin zunächst als ein Calmodulin-bindendes Protein identifiziert wurde (Gardner, 1986), wird dessen zelluläre Lokalisierung und Aktivität durch eine Vielzahl an Kinasen reguliert. Es wurde gezeigt, dass sowohl die Actin-Assoziation als auch die Spectrin-Rekrutierung zum einen durch die Bindung von Calmodulin (Gardner und Bennett, 1987; Kuhlman et al., 1996) und zum anderen durch die PKC- und Protein Kinase A (PKA)-vermittelte Phosphorylierung inhibiert wird (Dong et al., 1995; Matsuoka et al., 1996; Matsuoka et al., 1998). Auf der anderen Seite erhöht die Phosphorylierung durch Rho-Kinasen die Affinität von Adducin zu Actin und Spectrin (Fukata et al., 1999; Kimura et al., 1998).

Cortactin ist ein weiterer Vertreter der Actin-bindenden Proteine, die multiple Funktionen in der Zelle ausüben. Das nahezu ubiquitär exprimierte Protein fördert neben der Assemblierung auch die Umorganisation des Actin-Zytoskeletts. Durch die Bindung extrazellulärer Stimuli an Rezeptortyrosinkinasen wird Cortactin aktiviert und transloziert überwiegend an das periphere kortikale Actin-Stützgerüst (Ammer und Weed, 2008; Cosen-Binker und Kapus, 2006). Dort vermittelt es durch Komplexbildung mit Arp 2/3 (engl. actin-related protein 2/3) die Ausbildung neuer Actinfilament-Verzweigungen und verhindert gleichzeitig deren Disassemblierung (Weaver et al., 2001; Weed et al., 2000). Die Aktivierung von Cortactin erfolgt über die Phosphorylierung durch Tyrosin- und Serin/Threoninkinasen, wie etwa durch Src (engl. Rous sarcoma kinase) und ERK (engl. extracellular-signal regulated kinases), an der SH3 Domäne (Daly, 2004; Evans et al., 2012). Cortactin ist an der Ausbildung von Lamellipodien, an der Zellwanderung und an Clathrin-abhängigen und -unabhängigen Endozytoseprozessen beteiligt (Ammer und Weed, 2008; Samaj et al., 2004; Weed und Parsons, 2001).

### **1.3.2 Intermediärfilamente**

Intermediärfilamente verdanken ihren Namen der Tatsache, dass sie mit einem Durchmesser von 10 nm dünner als Mikrotubuli, aber dicker als Actinfilamente sind. Intermediärfilamente bestehen, im Gegensatz zu den globulären Untereinheiten der Actinfilamente und Mikrotubuli, aus langgestreckten Monomeren, die sich ohne Verbrauch von ATP zu seilartigen, unpolaren Filamenten zusammenlagern. Unter den Proteinen des Zytoskeletts weisen die Proteine des Intermediärfilament-Systems die höchste biochemische Vielfalt auf. Bis jetzt wurden im Menschen etwa 70 verschiedene Intermediärfilament-Proteine identifiziert, die entweder entsprechend ihrer Lokalisierung innerhalb einer Zelle bzw. eines Gewebes, oder auch entsprechend ihrer differenzierungs- und entwicklungspezifischen Verteilung in fünf Gruppen eingeteilt werden. Während Keratine (Gruppe I und II) in Epithelien und Desmine bzw. Vimentine (Gruppe III) in Muskelzellen bzw. peripheren Neuronen vorzufinden sind, sind verschiedene Vertreter der Gruppe IV in Neuronen und Lamine (Gruppe V) in den Zellkernen aller Zelltypen lokalisiert (Godsel et al., 2008; Lodish, 2000). Basale Keratinozyten enthalten Heterodimere aus basischem Keratin 5 (Gruppe II) und saurem Keratin 14 (Gruppe I), wohingegen differenzierte Zellen der höher gelegenen Schichten Keratin 1 und 10 exprimieren (Owens und Lane, 2003). Aufgrund ihres spezifischen Expressionsmusters werden Intermediärfilament-Proteine auch zur Identifikation von Zellen genutzt, was eine besondere Bedeutung in der Diagnose und anschließenden Therapie von Tumoren hat (Lodish, 2000). Trotz ihrer hohen Diversität sind alle Mitglieder der Intermediärfilament-Familie nach einem gemeinsamen strukturellen Grundplan

aufgebaut. Sie haben eine konservierte  $\alpha$ -helikale Domäne, die von hochvariablen N- und C-terminalen Domänen flankiert wird (Goldman et al., 2008; Parry, 2005). Zwei Intermediärfilament-Untereinheiten lagern sich über ihre zentralen Domänen zu Dimeren und schließlich zu Tetrameren zusammen, die als Grundbausteine dieser Filamente gelten. Der Längenauswuchs der Intermediärfilamente findet in drei Schritten statt: Assoziation der Tetramere zu Filamenteinheiten (ULFs; engl. unit length filaments), deren Anlagerung an beide Seiten der unpolaren Filamente und deren anschließende radiäre Verdichtung (Herrmann et al., 2007; Kirmse et al., 2007). In Echtzeitmessungen/FRAP-Studien an Keratinfilamenten migrierender Zellen wurde ein stetiger Kreislauf zwischen Dissoziation und anschließender Assoziation der entlassenen Monomere gezeigt, der eine schnelle Anpassung des Keratin-Stützgerüsts an Umwelteinflüsse ermöglicht (Kölsch et al., 2010; Windoffer et al., 2004). Obwohl es weiterer Studien bedarf, ist bekannt, dass der Umbau des Intermediärfilament-Netzwerks durch einen Actinfilament-basierten Transport der Intermediärfilament-Vorläufer notwendig ist (Kölsch et al., 2009; Woll et al., 2005). Der Umbau des Intermediärfilament-Netzwerkes wird durch assoziierte Intermediärfilament-Proteine, wie etwa DP als Vertreter der Plakin-Familie (Foisner und Wiche, 1991; Green et al., 2005) und durch Phosphorylierung, insbesondere über PKC und p38MAPK (p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase) reguliert (Izawa und Inagaki, 2006; Omary et al., 2006).

Wie in rasterkraftmikroskopischen (engl. atomic force microscopy; AFM) Studien gezeigt wurde, können die flexiblen und zugleich dehnbaren Intermediärfilamente enormen Scherkräften widerstehen (Mucke et al., 2005; Mucke et al., 2004). Diese Kombination aus Plastizität und Belastbarkeit macht das Intermediärfilament-System zu einem wichtigen Faktor für die Zelle, um mechanischem Stress standzuhalten. So konnte gezeigt werden, dass die Expression von Keratinmutanten in der Haut von Mäusen zu einer starken Störung des Intermediärfilament-Netzwerkes und zur Entstehung eines Epidermolysis-Bullosa-Simplex (EBS) Phänotyps führte, der mit der intrazellulären Ruptur von Keratinozyten und der Bildung von intraepidermalen Blasen nach geringer mechanischer Beanspruchung assoziiert ist (Bohnekamp et al., 2015; Fuchs et al., 1992; Homberg et al., 2015; Vassar et al., 1991). Neben ihrer mechanischen Stützfunktion sind Intermediärfilamente in Zusammenarbeit mit den Actinfilamenten und den Mikrotubuli an Zellprozessen wie der Zellmigration und der Kontrolle der Zellform beteiligt (Huber et al., 2015). Weiterhin sind Intermediärfilamente essentielle Gerüstmoleküle, die zum einen die Aktivität wichtiger Proteinkinasen modulieren und zum anderen durch den Transport von Vesikeln und Zellorganellen unter anderem die Größe und Architektur der Zelle regulieren (Coulombe und Wong, 2004; Kim und Coulombe, 2007).



### 1.4 Pemphigus

Pemphigus (griech. pemphix: Blase) stellt eine Gruppe von lebensbedrohenden Autoimmundermatosen dar, die durch die Bildung intraepithelialer Blasen innerhalb der Haut und der Mundhöhle charakterisiert sind (Hertl, 2000; Lever, 1953). Die Erkrankung wird vor allem durch Autoantikörper gegen desmosomale Cadherine ausgelöst (Stanley und Amagai, 2006). Pemphigus kann entsprechend den klinischen und histologischen Phänotypen des Patienten, d.h. der Regionen der Blasenmanifestation, der Tiefe der intraepidermalen Spaltbildung und des Antikörperprofils, in weitere Untergruppen eingeteilt werden (Mahoney et al., 1999; Singer et al., 1985). Zwei klassische Untergruppen stellen zum einen Pemphigus vulgaris (PV), der meist einen schweren Krankheitsverlauf mit einer oralen Beteiligung aufweist und zum anderen der benignere Pemphigus foliaceus (PF) dar. Pemphigus ist eine seltene Erkrankung mit einer Inzidenz von 0,75 bis 5 Millionen Fällen/Jahr, die meist bei Patienten zwischen 40-60 Jahren diagnostiziert wird (Bickle et al., 2002; Waschke, 2008). Beide Geschlechter sind gleichermaßen von der Krankheit betroffen, und es existiert eine höhere Prävalenz innerhalb bestimmter Völkergruppen und Gebiete auf der Erde, z.B. im Nahen und Mittleren Osten (Groves, 2009; Paul, 2012). Neben den klinischen und histologischen Merkmalen wird Pemphigus anhand des ELISA-basierten serologischen Autoantikörperprofils diagnostiziert (Bystryn und Rudolph, 2005; Kneisel und Hertl, 2011b). Die Therapie von Pemphigus basiert vorwiegend auf der Applikation immunsuppressiver Medikamente wie Kortikosteroide und auf der Verminderung pathogener Autoantikörper durch Plasmapherese (Bickle et al., 2002). Da die Pathogenese von Pemphigus bis heute nur unzureichend verstanden ist und die therapeutischen Ansätze mit starken Nebenwirkungen verbunden sind, ist es von immenser Bedeutung, das Verständnis über Pemphigus zu vertiefen.

#### 1.4.1 Klinik des Pemphigus

Mit der Entdeckung von zirkulierenden Autoantikörpern in Seren von PV-Patienten schufen Beutner und Kollegen vor über 50 Jahren die Grundlage für die Erforschung der Pathogenese des Pemphigus. In Immunfluoreszenzstudien an der humanen Haut zeigten sie, dass diese Autoantikörper gegen Strukturen auf der Zelloberfläche von Keratinozyten gerichtet sind (Beutner und Jordon, 1964). Unserem heutigen Wissensstand zufolge wird Pemphigus durch Autoantikörper der Immunglobulin-Klasse G (IgG) ausgelöst, die an Adhäsionsmoleküle der Desmosomen binden und damit den Verlust interzellulärer Haftung und die Trennung benachbarter Zellen, auch bekannt als Akantholyse, induzieren (Hu et al., 1978; Payne et al., 2004; Stanley, 2003). Zu diesem Wissensstand trug eine Vielzahl an Untersuchungen bei. Initial wurde die Pathogenität der IgGs aus Seren von PV-Patienten (PV-IgGs) *in vitro* in Organkulturen humaner

Haut, in Kertinozytenkulturen (Farb et al., 1978; Schiltz und Michel, 1976) und schließlich auch *in vivo* durch passiven Transfer auf neonatale Mäuse (Anhalt et al., 1982) gezeigt. In allen Fällen reichte die Applikation der aufgereinigten PV-IgGs aus, um eine PV-typische Blasenbildung zu induzieren. Auf molekularbiologischer Ebene identifizierten Stanley und Kollegen durch Immunpräzipitationsstudien in Keratinozyten-Extrakten zunächst das Zielantigen von PV als ein 130 kDa Molekül (Stanley et al., 1982) und schließlich das PF-Antigen als ein 160 kDa Molekül (Stanley et al., 1984). In den 1990er Jahren wurden diese Antigenmoleküle durch Genbankanalysen als desmosomale Cadherine, d.h. Dsg3 (130 kDa Molekül) und Dsg1 (160 kDa Molekül) identifiziert (Amagai et al., 1991; Koch et al., 1990). Den endgültigen Nachweis, dass Desmosomen das autoimmune Ziel von Pemphigus sind, erbrachten Amagai und Kollegen. Wurde die Bildung von Blasen im Mausmodell durch spezifische Antikörper gegen Dsg3 und Dsg1 induziert, so konnten rekombinante Dsg1 und Dsg3 Moleküle die pathogenen Autoantikörper absorbieren und die Ausbildung von Blasen somit verhindern (Amagai et al., 1995b; Amagai et al., 1994; Amagai et al., 1992).

Mit einem Anteil von etwa 80-90% ist PV die häufigste und zugleich bestuntersuchtteste Form der Pemphigus-Erkrankungen. Patienten mit PV leiden zunächst an schmerzhaften Entzündungen im Mund- und Rachenbereich (Abb. 3a) und sind oftmals in der Aufnahme von Nahrung und Flüssigkeit eingeschränkt. In einigen Fällen kommt es zu einer Generalisierung auf der gesamten Körperoberfläche durch die Bildung von flachen, flüssigkeitsgefüllten Blasen, die leicht rupturieren und sich zu schmerzhaften Erosionen oder Krusten entwickeln (Abb. 3b).

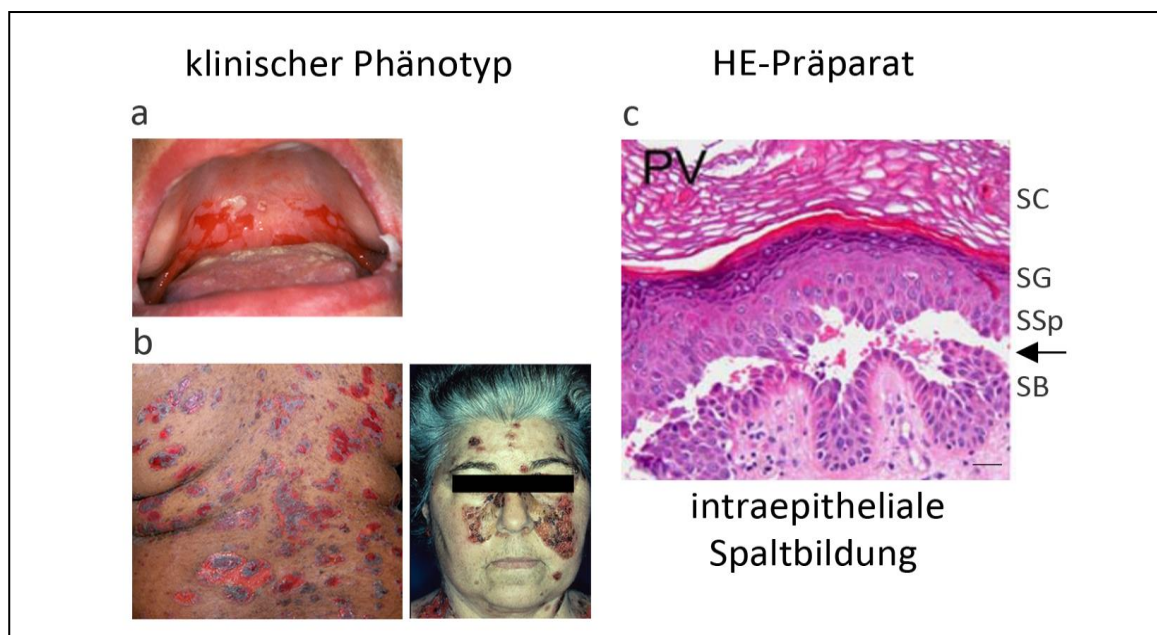


Abbildung 3: Klinischer Phänotyp und histologisches Präparat von PV-Patienten

(a) Schleimhautläsionen eines PV-Patienten (b) Rücken und Gesicht eines PV-Patienten mit Blasen und Erosionen [Bildquelle: Dr. Miklós Sardy, Klinik für Dermatologie und Allergologie, LMU München], (c) HE-Päparat der Epidermis eines PV-Patienten mit suprabasaler Spaltbildung (Pfeil), Maßstab: 50 µm [mit der Genehmigung des Springer Verlages verwendet und modifiziert nach Waschke, 2008]. SC = Stratum corneum, SG = Stratum granulosum, SSp = Stratum spinosum, SB = Stratum basale

In diesem Krankheitsstadium kann es durch den Barriereverlust der Haut zu Dehydrierung und Superinfektionen kommen. Histologisch manifestiert sich PV durch Spaltbildung in den tiefen Schichten der Epidermis, vornehmlich direkt über der Basalschicht (Abb. 3c) (Kneisel und Hertl, 2011a; Schmidt et al., 2000).

Werden im Krankheitsverlauf Antikörper gegen Dsg3 gebildet, so beschränkt sich die Blasenbildung meist auf die Schleimhäute (Mucosa-dominanter PV-Typ), wohingegen die Produktion von Antikörpern gegen Dsg3 und Dsg1 sowohl die Schleimhäute als auch die Epidermis betrifft (mukokutaner PV-Typ) (Amagai et al., 1999). Dieses Autoantikörperprofil korreliert jedoch nicht in allen Fällen mit dem klinischen Phänotyp, beispielsweise können Hautläsionen ohne Schleimhautbefall in seltenen Fällen auch nur durch Antikörper gegen Dsg3 ausgelöst werden (Saleh et al., 2015)

### 1.4.2 Pathogenese von Pemphigus

Neben dem Ziel, geeignete Therapieansätze zu etablieren, ist Pemphigus in den letzten Jahren immer mehr als Modellerkrankung zur Erforschung der Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Haftung in den Fokus getreten (Amagai und Stanley, 2012; Spindler und Waschke, 2014). Entscheidend hierfür ist zum einen, dass es sich bei Pemphigus, im Gegensatz zu anderen autoimmunen Hautdermatosen wie dem bullösen Pemphigoid, um eine nicht-inflammatorische Erkrankung handelt (Sitaru und Zillikens, 2005; Yancey, 2005), d.h. eine Spaltbildung durch PV-Autoantikörper wird ohne Aktivierung des Komplements oder der Leukozyten induziert (Anhalt et al., 1986). Dass die körpereigene Immunantwort in Pemphigus eine untergeordnete Rolle spielt, vereinfacht die Interpretation des Pathogenesemechanismus und ermöglicht die Projektion der Effekte auf die Interaktion der Autoantikörper mit den Zielantigenen (Kitajima, 2014). Zum anderen stehen mit PV-IgGs aufgrund der genauen Identifizierung der Zielantigene eine Fülle an technischen Werkzeugen zur Verfügung. Durch die einfache Gewinnung der Autoantikörper aus PV-Patientenseren oder durch kommerzielle und aus einem PV-Mausmodell generierte monoklonale Antikörper (Tsunoda et al., 2003) kann die Pemphigus-Erkrankung modellhaft *in vitro* und *in vivo* induziert werden. Auch mutante Mäuse mit einer Deletion des Dsg3-Gens (Dsg3<sup>-/-</sup> knockout

Mäuse) zeigen einen charakteristischen PV-ähnlichen Phänotyp, der mit dem Verlust interzellulärer Haftung und der Bildung von intraepithelialen Blasen einhergeht (Koch et al., 1997). Bis heute herrscht jedoch Unklarheit darüber, wie Pemphigus-Autoantikörper den Verlust interzellulärer Haftung induzieren. Vor Entdeckung der pathogenen Autoantikörper galt das Konzept der proteolytischen Spaltung von Adhäsionsmolekülen als plausibler Mechanismus für die Blasenbildung in Pemphigus (Cirillo et al., 2007; Farb et al., 1978; Hashimoto et al., 1983). In den letzten Jahren wurde durch die Verfügbarkeit über moderne zellbiologische Techniken und durch die Entdeckung der Zielantigene der Pemphigus-Autoantikörper eine Vielzahl an Hypothesen etabliert, wie es in Pemphigus zur Akantholyse kommt. Es gibt zwei prinzipielle Konzepte für den Pathogenesemechanismus von Pemphigus (Kitajima, 2013; Kitajima, 2014; Sharma et al., 2007; Waschke und Spindler, 2014), die im Folgenden näher beschrieben werden.

### **1.4.2.1 Direkte Inhibierung der Desmoglein-Haftung und Desmoglein-Kompensationstheorie**

Das Konzept der direkten Inhibierung der Desmoglein-Haftung, auch als sterische Behinderung bekannt, entstand nach Identifikation der desmosomalen Cadherine als Ziel-Antigene bei Pemphigus. Diesem Konzept zufolge wird deren Transinteraktion durch Bindung der PV-IgGs behindert (Amagai et al., 1991). Für die Möglichkeit der direkten Inhibierung sprechen die Daten mit AK23, einem monoklonalen, gegen Dsg3 gerichteten Antikörper, der in Dsg3<sup>-/-</sup>-knockout Mäusen gezüchtet wurde (Tsunoda et al., 2003). AK23 ist gegen die EC1-Region der Extrazellulärdomäne gerichtet und weist im Gegensatz zu monoklonalen Antikörpern gegen andere Dsg3-Domänen (AK9 und AK18) eine mit PV-IgGs vergleichbare Pathogenität auf. In AFM-Studien wurde schließlich gezeigt, dass AK23 wie auch IgG-Fraktionen aus PV-Patienten die homophile Transinteraktion von Dsg3 blocken (Heupel et al., 2009b; Heupel et al., 2008). Die Hypothese der sterischen Hinderung wird auch für die Erklärung der unterschiedlichen regionalen Blasenmanifestation in PV und PF herangezogen. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass die Blasenbildung verhindert wurde, wenn die Antikörper gegen Dsg1 und Dsg3 aus den Seren von Pemphigus-Patienten eliminiert wurden (Amagai et al., 1994; Amagai et al., 1992). Auf diesen Daten basierend, wurde die Theorie der Desmoglein-Kompensation etabliert (Hanakawa et al., 2002; Mahoney et al., 1999). Diese Theorie besagt, dass sich Dsg1 und Dsg3 gegenseitig kompensieren und beruht auf dem charakteristischen Expressionsmuster von Dsg1 und Dsg3 in der Epidermis und der Schleimhaut (Kottke et al., 2006) (Abb. 4). Dementsprechend bilden sich bei Pemphigus Blasen, sofern eines der Cadherine die Haftungsfunktion des anderen nicht kompensieren kann.

In der Mucosa-dominanten PV-Variante mit Antikörpern gegen Dsg3 kommt die Spaltbildung dadurch zustande, dass Dsg3 in der Schleimhaut im Vergleich zu Dsg1 deutlich stärker exprimiert wird und somit Dsg1 nicht den Haftungsverlust kompensieren kann. Beim mukokutanem PV mit Antikörpern gegen Dsg3 und Dsg1 kommt es der Kompensationstheorie zufolge zu suprabasaler Spaltbildung, da nach Antikörperbindung an Dsg1 und Dsg3 die interzelluläre Haftung durch diese nicht mehr übernommen werden kann. Da Dsg3 nicht in den apikalen Schichten der Epidermis vorkommt, kommt es bei PF mit Antikörpern gegen Dsg1 zur superfiziellen epidermalen Blasenbildung ohne muköser Beteiligung (Amagai, 2003; Kitajima, 2014).

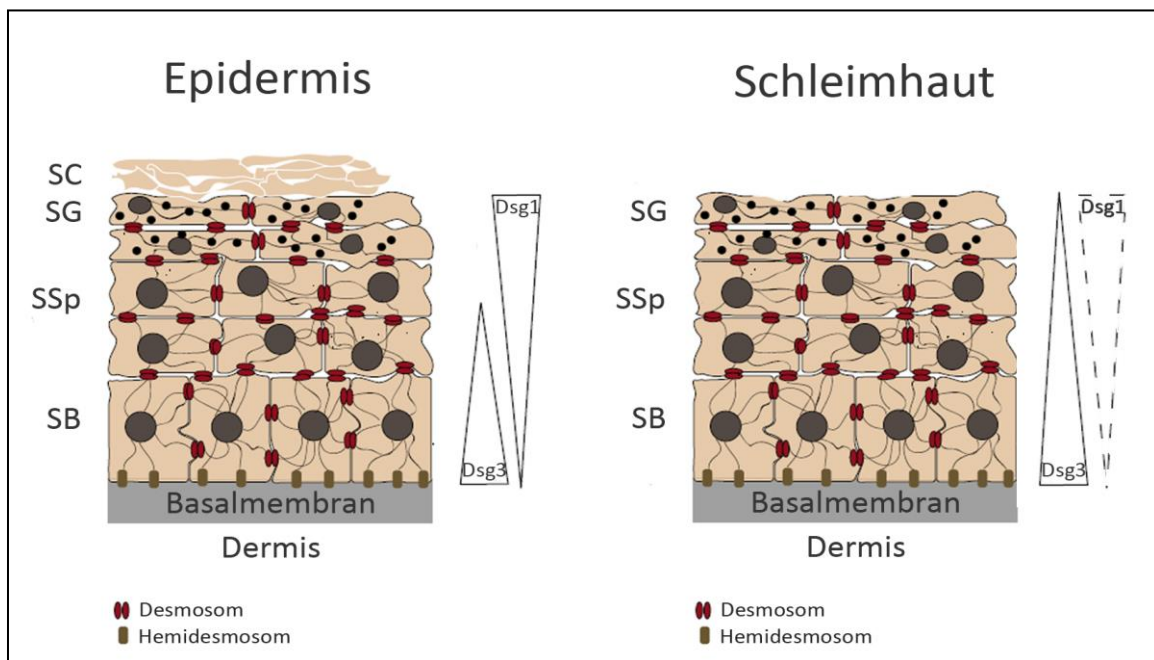


Abbildung 4: Expressionsmuster von Dsg1 und Dsg3 in der humanen Epidermis (links) und der Schleimhaut (rechts) [mit der Genehmigung des *Journal of Cell Science* verwendet und modifiziert nach Kottke et al., 2006]. SC = Stratum corneum, SG = Stratum granulosum, SSp = Stratum spinosum, SB = Stratum basale, Dsg = Desmoglein

Obwohl auch *in vivo* nachgewiesen wurde, dass AK23 zusammen mit PF-Antikörpern in Mäusen eine intraepidermale Spaltbildung induzierte (Shimizu et al., 2005; Tsunoda et al., 2003), ist die Kompensationstheorie unzureichend, um die klinische Manifestation der Blasen bei PV zu erklären. So gibt es keine Erklärung dafür, dass PV-Patienten mit Antikörpern gegen Dsg3 und Dsg1 nur suprabasale und nicht Blasen in allen Schichten der Epidermis entwickeln. Auch können atypische Pemphigus-Krankheitsverläufe, in denen z.B. die Autoantikörper nicht mit dem klinischen Phänotyp korrelieren, nicht durch diese Theorie beschrieben werden (Cirillo et al., 2012; Grando, 2012; Waschke, 2008). Des Weiteren wurden in PV- und PF-Seren Antikörper identifiziert, die

neben Dsg1 und Dsg3 gegen weitere Epitope gerichtet sind. Diese Antikörper können gegen Strukturen der Adhäsionskontakte wie E-Cadherin (Evangelista et al., 2008), PG (Korman et al., 1989) und Desmocolline (Dmochowski et al., 1995; Mao et al., 2010) oder gegen nicht-junktionale Antigene, wie bestimmte Acetylcholinrezeptoren (Nguyen et al., 2000a) und Moleküle der Mitochondrien (Chen et al., 2015; Marchenko et al., 2010) gerichtet sein. Obwohl über die Pathogenität dieser Antikörper bis heute recht wenig bekannt ist, zeigte zumindest eine Studie, dass IgG-Fractionen von PV-Patienten, aus denen Dsg1- und Dsg3-Antikörper entfernt wurden, in Dsg3<sup>-/-</sup> knockout Mäusen Blasenbildung induzieren können (Nguyen et al., 2000b). Zusammengefasst ist zwar allgemein akzeptiert, dass Dsg1- und Dsg3-Antikörper sowohl notwendig als auch ausreichend für den interzellulären Haftungsverlust sind, jedoch kann dies nicht alleine auf die sterische Inhibierung der beiden Moleküle zurückgeführt werden.

Dieser auf der reinen durch Blockade der Adhäsionsfunktion der Desmogleine basierenden Hypothese steht das Konzept des Signalwegs-induzierten Haftungsverlusts gegenüber (Müller et al., 2008; Sharma et al., 2007; Waschke, 2008; Waschke und Spindler, 2014).

### 1.4.2.2 Desmoglein-abhängige Signaltransduktion

In den letzten Jahren lieferten Forschungsgruppen weltweit entscheidende Hinweise dafür, dass PV-IgGs Signalwege auslösen, die relevant für die Pathogenese von Pemphigus sind (Getsios et al., 2010; Stahley und Kowalczyk, 2015; Waschke und Spindler, 2014). So zeigten Calkins *et al.* in Dissoziationsversuchen mit Keratinozyten, dass die Inkubation von PV-IgGs unter energetisch ungünstigen Bedingungen, d.h. unter niedrigen Temperaturen, keinen Haftungsverlust auslöste, obwohl die PV-IgGs an Dsg3 gebunden waren (Calkins et al., 2006). Es gibt Hinweise dafür, dass Cadherine außerhalb der Desmosomen (extradesmosomale Cadherine) das primäre Ziel von PV-Autoantikörper sind (Müller et al., 2008; Waschke und Spindler, 2014) (Abb. 5). Inkubation mit PV-IgGs oder AK23 führt zur Internalisierung und anschließenden Degradation der extradesmosomalen Dsg3-Moleküle binnen weniger Minuten, wohingegen der Abbau der desmosomalen Dsg3-Moleküle und damit der Haftungsverlust zwischen Keratinozyten erst nach mehreren Stunden einsetzt (Aoyama et al., 1999; Calkins et al., 2006; Sato et al., 2000; Yamamoto et al., 2007). Interessanterweise kann der PV-IgG-induzierte Haftungsverlust durch Überexpression von Dsg3 verhindert werden (Jennings et al., 2011). Obwohl die genaue Rolle der extradesmosomalen Cadherine bis heute nicht geklärt wurde, kann spekuliert werden, dass diese eine signalgebende Funktion haben, und die Bindung von PV-IgGs eine Aktivierung intrazellulärer Signalwegskaskaden auslöst (Grando, 2012; Müller et al., 2008; Waschke und Spindler, 2014). Schließlich kann der PV-IgG-induzierte Verlust interzellulärer Haftung *in vitro* und *in vivo* durch

den Einsatz pharmakologischer Substanzen, die gegen eine Vielzahl an intrazellulären Signalwegen gerichtet sind, abgeschwächt oder sogar vollständig beseitigt werden (Bektas et al., 2013; Berkowitz et al., 2005; Berkowitz et al., 2006; Chernyavsky et al., 2007; Kitajima et al., 1999; Mao et al., 2014; Seishima et al., 1999; Spindler et al., 2007; Waschke et al., 2006). Aufgrund der hohen Anzahl an Signalwegen, die bisher mit der Pathogenese von Pemphigus assoziiert werden, wird im Folgenden nur auf diejenigen eingegangen, die für die vorliegende Arbeit von Relevanz sind.

### Ca<sup>2+</sup> und PKC

In humanen Keratinozyten wurde gezeigt, dass die Bindung von PV-IgGs einen schnellen transienten Einstrom von Ca<sup>2+</sup>-Ionen induziert. Der Anstieg von intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Ionen wie auch von Inositol-1,4,5-Trisphosphat (kurz IP<sub>3</sub>) führte zu einer schnellen Aktivierung (Kitajima et al., 1999; Seishima et al., 1995) und Translokation der PKC vom Zytosol an die Zellmembran (Osada et al., 1997). PKC wurde mit der PV-Pathogenese in Verbindung gebracht, da der Zell-Zell-Haftungsverlust nach PV-IgG-Inkubation sowohl durch Chelation der freien intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Ionen als auch durch pharmakologische Inhibierung *in vivo* gehemmt werden konnte (Arredondo et al., 2005; Sanchez-Carpintero et al., 2004; Spindler et al., 2011). Neueren Studien zufolge können Keratinozyten durch die pharmakologische Inhibierung der PKC einen hyperadhäsiven Zustand einnehmen und sind somit weniger anfällig gegenüber einem PV-IgG-induzierten Haftungsverlust (Cirillo et al., 2010; Kimura et al., 2007; Spindler et al., 2011).

### p38MAPK

Eine Vielzahl an Studien lieferte Belege dafür, dass die aktivierte p38MAPK an der Pathogenese von Pemphigus beteiligt ist. In humanen Keratinozyten wurde zunächst gezeigt, dass p38MAPK und eines der Zielproteine (HSP27; engl. heat-shock protein) bereits 30 min nach PV-IgG-Applikation phosphoryliert werden (Berkowitz et al., 2005). Die Phosphorylierung von p38MAPK nach PV-IgG- und PF-IgG-Injektion wurde *in vivo* an Mäusen bestätigt und die Bildung von Blasen konnte durch pharmakologische Inhibierung von p38MAPK gehemmt werden (Berkowitz et al., 2008a; Berkowitz et al., 2006). Auch in Hautläsionen von PV-Patienten wurde eine erhöhte Aktivität von p38MAPK und HSP27 detektiert (Berkowitz et al., 2008b). Weiterhin wurde gezeigt, dass zentrale Merkmale der PV-Pathogenese, wie die Inaktivierung der RhoA-GTPasen, die Retraktion der Keratinfilamente und die Umorganisation des Actin-Stützgerüsts durch die spezifische Inhibierung von p38MAPK gehemmt werden (Berkowitz et al., 2005; Chernyavsky et al., 2007; Waschke et al., 2006). Obwohl die Mechanismen des p38MAPK-vermittelten Haftungsverlusts zwischen Keratinozyten nur unvollständig verstanden sind, könnten die Prozesse

der Retraktion des Keratin-Netzwerkes und der Umorganisation der Actinfilamente, die im Abschnitt 1.4.2.3 genauer dargestellt werden, von hoher Relevanz für die PV-IgG-induzierte Akantholyse der Keratinozyten sein. Auch wurde die erhöhte p38MAPK-Aktivität nach PV-IgG-Applikation mit der Internalisierung und dem anschließenden Abbau von Dsg3 in Verbindung gebracht (Jolly et al., 2010).

### Src

Die Tyrosinkinase Src wird ebenfalls nach Bindung der PV-Autoantikörper innerhalb von 30 min phosphoryliert und könnte über die Aktivierung von EGFR (engl. epidermal growth factor receptor) und p38MAPK den Zellhaftungsverlust auslösen (Chernyavsky et al., 2007). Auch wurde eine erhöhte Phosphorylierung direkt in Hautläsionen von PV-Patienten (Tsang et al., 2012b) und von Mäusen, die mit PV-IgGs behandelt wurden (Pretel et al., 2009), nachgewiesen. Sowohl *in vitro*- als auch *in vivo*-Studien zeigten, dass eine spezifische Inhibierung von Src die PV-IgG-induzierten Effekte, wie etwa den Haftungsverlust zwischen Keratinozyten, die Retraktion der Keratinfilamente, aber auch die Ausbildung von Blasen deutlich reduzierte (Chernyavsky et al., 2007; Sanchez-Carpintero et al., 2004). Neben der Aktivierung von EGFR und p38MAPK gibt es Hinweise, dass Src über die Phosphorylierung von p120-Catenin, das mit der Stabilität von Adhärenskontakten assoziiert ist, an der Pathogenese von PV beteiligt ist (Chernyavsky et al., 2008). Tsang *et al.* zeigten, dass extradesmosomale Dsg3-Moleküle die Aktivität von Src und darüber die Komplexbildung zwischen Src und E-Cadherin regulieren (Tsang et al., 2012b). Somit könnte der PV-Antikörper-induzierte Verlust der extradesmosomalen Dsg3-Moleküle ursächlich für die schnelle Aktivierung der Src-Kinase sein.

### Rho-GTPasen

Erste Hinweise auf eine Beteiligung der Rho-GTPasen an der PV-Pathogenese lieferten Versuche an einem *ex vivo*-Hautmodell und an kultivierten Keratinozyten. Die spezifische Toxin-induzierte Inaktivierung der Rho-GTPasen verursachte, vergleichbar mit der Applikation von PV-IgGs, in der humanen Epidermis suprabasale Spaltbildungen, den Haftungsverlust zwischen benachbarten Keratinozyten und den Abbau desmosomaler Cadherine (Spindler et al., 2007; Spindler und Waschke, 2011). Im gegenteiligen Fall konnten die pathogenen Effekte der PV-IgGs durch spezifische Aktivierung der Rho-GTPasen deutlich abgeschwächt werden (Gliem et al., 2010; Heupel et al., 2009a). Weitergehend wurde gezeigt, dass die Bindung von PV-IgG zu einer verminderten Aktivität der Rho-GTPasen führte, dies jedoch durch gezielte Inhibierung von p38MAPK verhindert wurde. Dieser Befund deutet an, dass die Aktivität der Rho-GTPasen in PV





wesentliche Rolle könnten dabei Veränderungen des Zytoskeletts spielen, die im Folgenden genauer beschrieben werden.

### 1.4.2.3 Das Zytoskelett und Pemphigus

In Hautschnitten von Pemphigus-Patienten und in kultivierten humanen Keratinozyten wurde gezeigt, dass die Bindung von PV-Autoantikörpern starke Veränderungen des Zytoskeletts auslöst. Wie bereits in Abschnitt 1.4.2.2 dargelegt, werden die Prozesse der zytoskelettalen Umorganisation mit Signalwegen assoziiert, die nach Bindung der PV-IgGs an die Zelle aktiviert werden. Die Retraktion des Keratin-Zytoskeletts, d.h. das Loslösen der Keratinfilamente von den Desmosomen und die anschließende Akkumulation im perinukleären Raum, setzt mindestens 4 h nach PV-IgG-Inkubation ein und ist nach 24 h sehr deutlich ausgeprägt (Berkowitz et al., 2005; Calkins et al., 2006; Chernyavsky et al., 2007). *In vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen zeigten, dass eine erhöhte Aktivität von p38MAPK (Berkowitz et al., 2005; Berkowitz et al., 2006; Spindler et al., 2014), eine p38MAPK-abhängige Verminderung der RhoA-Aktivierung (Waschke et al., 2006) und eine erhöhte Src-Aktivität (Chernyavsky et al., 2007) an der durch PV-IgG-induzierten Retraktion der Keratinfilamente beteiligt sind. In Untersuchungen konnte zumindest für das Zytokeratin 8 gezeigt werden, dass eine erhöhte Aktivität von p38MAPK zu dessen Phosphorylierung und anschließendem Abbau führte (Wöll et al., 2007). Obwohl die Verankerung mit den Keratinfilamenten wichtig für die mechanische Stabilität der Desmosomen ist (Getsios et al., 2004; Magin et al., 2007), ist bis heute nicht eindeutig geklärt, ob die Retraktion der Keratinfilamente in Reaktion auf PV-IgGs ein direkter Auslöser oder ein sekundäres Phänomen der Akantholyse ist (Bystryn und Grando, 2006; Saito et al., 2012; Waschke, 2008).

Neben einer Reorganisation der Keratinfilamente ist der Haftungsverlust von Zellen in Reaktion auf PV-Autoantikörper ebenfalls mit einer erhöhten Ausbildung von Stressfasern und der Fragmentierung der Actinfilament-Bündel assoziiert. Diese Umorganisation der Actinfilamente kann durch pharmakologische Inhibierung des PV-IgG-induzierten Haftungsverlusts gehemmt werden (Berkowitz et al., 2005; Spindler et al., 2007; Waschke et al., 2006). Die Bedeutung des Actin-Zytoskeletts in der Pathogenese von PV wurde mit einer Studie in humanen Keratinozyten weitergehend unterstrichen. Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung von Rho-GTPasen auf den Zell-Zell-Haftungsverlust nach PV-IgG-Inkubation keinen protektiven Effekt hatte, sobald die Polymerisation der Actinfilamente mittels Cytochalasin D gehemmt wurde (Gliem et al., 2010). Über die Mechanismen, wie das Actin-Zytoskelett in Prozesse der PV-IgG-induzierten Akantholyse mitwirkt, herrscht jedoch bis heute Unklarheit.

Somit verursacht die Bindung der PV-Autoantikörper an ihre Antigene eine starke Umorganisation des Zytoskletts. Jedoch ist bis zum heutigen Zeitpunkt unklar, ob diese zytoskelettalen Veränderungen direkt durch den Zell-Zell-Haftungsverlust induziert werden oder als Folge der nach Bindung der PV-IgGs ausgelösten Signaltransduktionskaskaden zu sehen sind.

### **1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

Die Stabilität und Integrität der Epidermis beruht zu großen Teilen auf der starken Interaktion zwischen desmosomalen Cadherinen und der Verankerung der Desmosomen an das Keratinfilament-Netzwerk. Zahlreiche Studien belegen, dass die Ausbildung intakter Desmosomen einer strengen Regulierung unterliegt und ein Zusammenspiel zwischen Adhärensjunktionen und dem Actin-Zytoskelett voraussetzt. Die lebensbedrohliche Autoimmundermatose PV gilt als Modellerkrankung zur Untersuchung der Auswirkungen einer fehlerhaften Regulierung der desmosomalen Assemblierung bzw. einer gesteigerten Destabilisierung der Desmosomen. Im Zellkulturmodell wird die PV-Pathogenese neben dem Haftungsverlust benachbarter Keratinozyten und der Depletion von Dsg3 auch mit der Umorganisation des Zellzytoskletts in Verbindung gebracht. Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es folglich, in humanen und murinen Keratinozyten die Mechanismen der Assemblierung und Disassemblierung der Desmosomen in Abhängigkeit vom Zytoskelett im Detail zu untersuchen. Dazu sollte zum einen unter physiologischen Bedingungen der Einfluss der Actin-bindenden Proteine Adducin und Cortactin auf die Assemblierung und Stabilisierung der Desmosomen untersucht werden. Zum anderen sollte E-Cadherin als Komponente der Adhärenskontakte im Zusammenhang mit der Ausbildung der Desmosomen analysiert werden. Die Erweiterung unseres Wissensstands über die physiologische Regulierung der Desmosomen könnte zum tieferen Verständnis der PV-Erkrankung und der Entwicklung neuer Therapieansätze dienen. Daher sollte auf der Untersuchung der dynamischen desmosomalen Assemblierungsprozesse aufbauend analysiert werden, ob die pathogenen Effekte der PV-Autoantikörper durch Adducin oder durch die Stabilisierung der Interaktion zwischen Dsg3-Molekülen moduliert werden können. Abschließend sollte die Reorganisation der Keratinfilamente genauer mit der Destabilisierung der Desmosomen in der PV-Pathogenese korreliert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zelllinien und Bakterienstämme

Tabelle 1: Auflistung der Zelllinien

Bezeichnung	Zellart, Gewebe, Spezies	Hersteller
HaCaT	Keratinocyten, Epidermis, Mensch	Petra Boukamp, Heidelberg, Deutschland (Boukamp et al., 1988)
MEK	Keratinocyten, Epidermis, Maus	selbst präpariert aus neonatalen Mäusen
A431 (GFP-DPwt oder GFP-DPS2849G)	Epithelzellen, Plattenepithelkarzinom, Mensch	zur Verfügung gestellt von K. Green, Northwestern University, Chicago, USA (Godsel et al., 2005)

Für die Amplifikation von Plasmid-DNA wurden zwei Stämme kompetenter E.coli Bakterien verwendet: DH5 $\alpha$  (Life Technologies, Carlsbad, USA) und XL1-blue (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Kompetente Zellen wurden bei -80°C in Glycerol gelagert und bei Bedarf verwendet.

#### 2.1.2 Oligonukleotide, Plasmid-DNA und siRNA

Tabelle 2: Auflistung der Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')
$\alpha$ -adducin <i>forward</i> (NM_176801.1)	TCTGGGCTACAGAACTGGCT
$\alpha$ -adducin <i>reverse</i> (NM_176801.1)	TCTTCGACTTGGGACTGCTT
$\beta$ -adducin <i>forward</i> (NM_016824.3)	CACCTCCTCTCAGTCTTGGC
$\beta$ -adducin <i>reverse</i> (NM_016824.3)	GCTGTTGCAAGGGTATGGAT
POLR2L <i>forward</i> (NM_021128.4)	CGAGTACACCGAGGGGA
POLR2L <i>reverse</i> (NM_021128.4)	GGTTTCAGCGTGGTCACTT
CTTN <i>forward</i> (Schnoor et al., 2011)	AGGGTCTGACCATCATGTCC
CTTN <i>reverse</i> (Schnoor et al., 2011)	GTGCTGTTCCATCCACAATGC

Tabelle 3: Auflistung der Plasmid-DNA

Konstrukt	Abkürzung	Resistenz	Quelle
pEGFP-N1	GFP-Leervektor	Kan <sup>R</sup>	Addgene Vector Database, Cambridge, USA
pEGFP-C1- $\alpha$ -Adducin	GFP-Addwt	Kan <sup>R</sup>	H.-C. Chen, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan (Chen et al., 2007)
pEGFP-C1- $\alpha$ -Adducin (S726A)	GFP-AddmutA	Kan <sup>R</sup>	H.-C. Chen, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan (Chen et al., 2007)
pEGFP-N1-Dsg3	GFP-Dsg3	Kan <sup>R</sup>	Y. Hanakawa, Ehime University, Ehime, Japan
pEGFP-C1-G5 $\alpha$	GFP-Äquorin	Amp <sup>R</sup>	A. Breit, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland (Baubet et al., 2000)

Tabelle 4: Auflistung der siRNA

Bezeichnung/Spezifikation	Hersteller
ON-TARGETplus SMARTpool L-009487-00-0005 siRNA $\alpha$ -Adducin, Human	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ON-TARGETplus SMARTpool L-008468-00-0005 siRNA $\gamma$ -Adducin, Human	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ON-TARGETplus SMARTpool L-003877-00-0005 siRNA E-Cadherin, Human	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ON-TARGETplus SMARTpool L-011646-00-0005 siRNA Dsg3, Human	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ON-TARGETplus SMARTpool D-001810-10-05 siRNA non-targeting	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

### 2.1.3 Antikörper und Mediatoren

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Anwendung/ Konzentration	Hersteller
anti- $\alpha$ -Adducin	Maus/ monoklonal	WB/ 1:200 IF/ 1:50	Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA
anti- $\gamma$ -Adducin	Maus/ monoklonal	WB/ 1:200 IF/ 1:50	Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA

## 2 Material und Methoden

Antikörper	Spezies	Anwendung/ Konzentration	Hersteller
anti-Claudin-1	Kaninchen/ polyklonal	IF/ 1:100	Life Technologies, Carlsbad, USA
anti-Cortactin	Maus/ monoklonal	WB/ 1:1000 IF/ 1:100	Merck Millipore, Billerica, USA
anti-DP	Kaninchen/ monoklonal	WB/ 1:1000	Epitomics, Burlingame, USA
anti-DP (NW6)	Maus/ monoklonal	IF/ 1:100	zur Verfügung gestellt von K. Green, Northwestern University, Chicago, USA
anti-Dsg3 (clone 5G11)	Maus/ monoklonal	IF/ 1:100	Life Technologies, Carlsbad, USA
anti-Dsg3 (clone H-145)	Kaninchen/ polyklonal	WB/ 1:1000 IF/ 1:100	Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA
anti-E-Cadherin (clone 36)	Maus/ monoklonal	WB/ 1:1000 IF/ 1:100	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
anti-EEA-1	Maus/ monoklonal	IF/ 1:100	Life Technologies, Carlsbad, USA
pEGFR (Y845)	Kaninchen/ polyklonal	WB 1:500	Abcam, Cambridge, England
anti-ERK 1/2	Maus/ polyklonal	WB/ 1:1000	Cell Signaling, Denver/Boston, USA
anti-GAPDH	Maus/ monoklonal	WB/ 1:200	Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA
anti-GFP	Maus/ monoklonal	WB/ 1:200	Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA
anti-pan-CK	FITC	Färbung der Zytokeratin- filamente	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
anti-phospho- S726-Adducin	Kaninchen/ polyklonal	WB/ 1:200	Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA
anti-phospho- ERK	Kaninchen/ polyklonal	WB/ 1:2000	Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA
anti-p38MAPK	Kaninchen/ polyklonal	WB/ 1:1000	Cell Signaling, Denver/Boston, USA
anti-phospho- p38MAPK	Kaninchen/ polyklonal	WB/ 1:1000	Cell Signaling, Denver/Boston, USA

## 2 Material und Methoden

Antikörper	Spezies	Anwendung/ Konzentration	Hersteller
anti-p-Tyr	Maus/ monoklonal	WB/ 1:500	Tebu-Bio, Offenbach, Deutschland
anti- $\alpha$ -Tubulin	Maus/ monoklonal	WB/ 1:5000	Abcam, Cambridge, England

WB: Westernblotanalyse, IF: Immunfluoreszenzdarstellung

Tabelle 6: Auflistung der Sekundärantikörper und Fluorophor-gekoppelten Substanzen

Antikörper/Substanzen	Konjugierte Fluorophore	Anwendung	Hersteller
Ziege-anti-Maus	Cy3	IF	Dianova, Hamburg, Deutschland
Ziege-anti-Kaninchen	Cy3	IF	Dianova, Hamburg, Deutschland
Ziege-anti-Kaninchen	Cy5	IF	Dianova, Hamburg, Deutschland
Ziege-anti-Maus	Cy2	IF	Dianova, Hamburg, Deutschland
Ziege-anti-Maus	pox	WB	Dianova, Hamburg, Deutschland
Ziege-anti-Kaninchen	pox	WB	Dianova, Hamburg, Deutschland
Phalloidin	Alexa 488	Färbung der Actinfilamente	Life Technologies, Carlsbad, USA

WB: Westernblotanalyse, IF: Immunfluoreszenzdarstellung

Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzdarstellung (Cy2-, Cy3- und Cy5-gekoppelt) wurden in einer 1:600 Verdünnung in PBS und für Westernblotanalysen (pox-gekoppelt) in einer 1:3000 Verdünnung in einer Milchpulverlösung (5% Milchpulver in TBST) eingesetzt. Für die Färbung der Keratin- oder Actinfilamente wurden die jeweiligen Farbstoffe 1:200 in PBS verdünnt.

Tabelle 7: Auflistung der Mediatoren

Mediator	Konzentration	Wirkung	Hersteller
CNF-1	1 mM	Aktivierung von RhoA, Rac1 und Cdc42	Cytoskeleton, Denver, USA
CNFy	1 mM	Aktivierung von RhoA	Cytoskeleton, Denver, USA
y27632	30 $\mu$ M	Inhibierung der Rho-kinase	Merck Millipore, Billerica, USA
SB202190	30 $\mu$ M	Inhibierung von p38MAPK	Merck Millipore, Billerica, USA
PMA	50 nM	Aktivierung der PKC	Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland
BIM-X	1 $\mu$ M	Inhibierung der PKC	Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland
Anisomycin	60 $\mu$ M	Aktivierung der p38MAPK	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BAPTA-AM	50 $\mu$ M	Ca <sup>2+</sup> -Chelation	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
TP	20 $\mu$ M	Transinteraktion mit Dsg1/Dsg3	Bachem GmbH, Weil am Rhein, Deutschland
AK23	0,75 $\mu$ g/ $\mu$ l	Interaktion mit Dsg3	Biozol, Eching, Deutschland

#### 2.1.4 Chemikalien

Tabelle 8: Auflistung der kommerziellen Reaktionssysteme

Reaktionssystem	Verwendung	Hersteller
RNeasy Mini Kit	RNA Isolierung	Qiagen, Venlo, Niederlande
NucleoSpin Mini Kit	Plasmid-DNA-Isolierung	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoBond Xtra Midi Kit	Plasmid-DNA-Isolierung	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Pierce BCA Protein Assay Kit	Bestimmung der Proteinkonzentration	ThermoScientific, Rockford, USA
G-LISA Rho Activation Assay Biochem Kit	ELISA	Cytoskeleton, Denver, USA



## 2 Material und Methoden

Reaktionssystem	Verwendung	Hersteller
Silencer siRNA Labeling Kit with Cy3 dye	siRNA Markierung	Life Technologies, Carlsbad, USA
Duolink in situ orange Kit Maus/Kaninchen	PLA	Olink Bioscience, Uppsala, Schweden

Tabelle 9: Auflistung der Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Accutase	CELLnTEC, Bern, Schweiz
Acrylamid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Agarose	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Amphotericin B	CELLnTEC, Bern, Schweiz
Ampicillin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Agar	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Aprotenin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
APS	Merck, Darmstadt, Deutschland
Aquabator-Clean	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DEPC	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dispase	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DMEM	Life Technologies, Carlsbad, USA
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DNA-Ladepuffer (6x)	Life Technologies, Carlsbad, USA
dNTP-Mix	Promega, Madison, USA
Doxycyclin	Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA
DTT	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

## 2 Material und Methoden

Chemikalie	Hersteller
EGTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Eisessig	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt, Deutschland
FKS	Merck Millipore, Billerica, USA
G418	Biochrom, Berlin, Deutschland
GeneRuler DNA Ladder (100 bp)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gentamycin	CELLnTEC, Bern, Schweiz
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
GoTaqPolymerase	Promega, Madison, USA
Green Puffer (5x)	Promega, Madison, USA
HbSS	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
HCl	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kanamycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
KCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Keratinocytenmedium 2	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Leupeptin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Luminol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
LB-Pulver	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MES	Biomol, Hamburg, Deutschland
MeOH	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
MgCl <sub>2</sub>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

## 2 Material und Methoden

Chemikalie	Hersteller
MMA	Serva, Heidelberg, Deutschland
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NaCl	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
NaF	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaOH	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NGS	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
NDS	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
NP-40	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NPG	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Oligo (dT) <sub>15</sub> Oligonukleotide	Promega, Madison, USA
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
n-Propylgallat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
PCA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin G	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Pepstatin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
PMSF	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PageRuler Prestained	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Phosphataseinhibitor-Cocktail	Roche, Basel, Schweiz
Proteaseinhibitor-Cocktail	Roche, Basel, Schweiz
SDS	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
siRNA Puffer (5x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Streptomycinsulfat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
SuperScript II Reverse Transkriptase	Life Technologies, Carlsbad, USA
TEMED	Merck, Darmstadt, Deutschland

## 2 Material und Methoden

Chemikalie	Hersteller
Tris	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Triton-X-100	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Trypsin	Serva, Heidelberg, Deutschland
TurboFect	Life Technologies, Carlsbad, USA
Tween 20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Zitronensäure-Monohydrat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 10: Auflistung der Agarosepartikel

Bezeichnung	Hersteller
Protein-A-Agarosepartikel	Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA
Protein-G-Agarosepartikel	Merck Millipore, Billerica, USA
Protein-G/A-Agarosepartikel	Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA

### 2.1.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 11: Auflistung der Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen	Verwendung	Zusammensetzung
BSA/NGS	IF	0,1% (v/v) Kälberserum 10% (v/v) Ziegenserum in PBS
Dispase II-Lösung	Dissoziationsversuche, MEK-Isolation	>2.4 U/ml Dispase II in HbSS
Einbettmedium (NPG)	IF	1% n-Propylgallat mit 60% Glycerin in PBS
Einfriermedium	Zellkultur	DMEM mit 20% FKS und 10% DMSO
Entwicklerlösung	WB	ECL I : 500 µl Luminol-Lösung, 220 µl PCA-Lösung, 5 ml 1 mol/l Tris-HCl ad 50 ml H <sub>2</sub> O  ECL II: 32 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 5 ml 1 mol/l Tris-HCl ad 50 ml H <sub>2</sub> O
Fixierlösung	IF	2% Paraformaldehyd in PBS

## 2 Material und Methoden

Puffer/Lösungen	Verwendung	Zusammensetzung
HbSS	allgemein	130 mM HbSS-Pulver 4 mM NaHCO <sub>3</sub>
KCM Puffer (5x)	Plasmid-DNA Transformation	0,5 M KCl 0,15 M CaCl <sub>2</sub> 0,25 M MgCl <sub>2</sub>
Laufpuffer	WB	1 M Glycin 124 mM Tris/HCl 17,3 mM SDS
LB Medium	Bakterienkultur	20 g/L LB Medium Pulver 5 g/L NaCl
LB Platten	Bakterienkultur	25 g/L LB Medium Pulver 15 g/L Agar
Luminol	WB	250 mM Luminol in DMSO
PBS	allgemein	0,68 M NaCl 13,4 mM KCl 48 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7,3 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBS/EDTA	Zellkultur	34,2 mM EDTA in PBS; steril
PCA	WB	90 mM Paracumaricacid in DMSO
Penicillin G/ Streptomycin	Zellkultur	18 mM Penicillin G 8,9 mM Streptomycinsulfat; steril
Phospho-RIPA-Puffer	IP	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 150 mM NaCl 1% Triton X-100 0,25% SDS 1% Natriumdeoxycholat   pH 7,2
Phospho-RIPA- Waschpuffer	IP	50 mM Tris 150 mM NaCl 0,1 mM EDTA 0,5% Tween 20
Probenpuffer (3x)	WB	0,19 M Tris/HCl 0,2 M SDS 4,1 M Glycerin 0,3 mM Bromphenolblau
RIPA-Puffer	IP	0,1 M Tris-HCl 0,3 M NaCl 2% SDS 1% NP-40 0,0001 M EDTA   pH 8,0

## 2 Material und Methoden

Puffer/Lösungen	Verwendung	Zusammensetzung
RIPA-Waschpuffer	IP	0,05 M Tris-HCL 0,15 M NaCl 0,1% SDS 1% NP-40
SDS-Lysepuffer	WB	25 mM HEPES 2 mM EDTA 25 mM NaF 1% SDS   pH 7,6
Stripping-Puffer	WB	25 mM Glycin 1% SDS   pH 2,0
TAE-Puffer (50x)	RNA-/DNA-Analyse	242 g Tris in 500 ml H <sub>2</sub> O. 100 ml 0,5 M Na <sub>2</sub> EDTA (pH 8,0) 57,1 ml Eisessig ad 1 l H <sub>2</sub> O
TBS 1M	WB	20 mM Tris/HCl 137 mM NaCl   pH 7,6
TBST	WB	0,05% Tween 20 in TBS
Transferpuffer (5x)	WB	25 mM Tris/HCl 195 mM Glycin 250 ml Methanol 3,5 mM SDS
Trypsin	Zellkultur	0,05% Trypsin, 0,02% EDTA in PBS pH 7,2; steril
0,1% Triton-X-100	IF	0,1% Triton X-100 in PBS
Triton-X100-Puffer	WB	1% Triton X-100 10 mM Tris/HCl 140 mM NaCl 5 mM EDTA 2 mM EGTA  + 20 µg/ml Leupeptin, 20 µg/ml Pepstatin, 20 µg/ml Aprotinin, 1 mM PMSF
TSB-Puffer (5x)	Transformation der Plasmid DNA	10% Polyethylenglycol 4000 5% DMSO 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub>

WB: Westernblotanalyse, IF: Immunfluoreszenzdarstellung, IP: Immunpräzipitationsanalyse

### **2.1.6 Verbrauchsmaterialien und Geräte**

Alle Verbrauchsmaterialien wurden, soweit nicht anders angegeben, von Greiner Bio One (Kremsmünster, Österreich), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), VWR (Radnor, USA), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Bio-Rad (München, Deutschland) oder Marienfeld (Lauda-Königshofen, Deutschland) bezogen. Abweichende Herstellerfirmen werden an entsprechender Textstelle genannt.

Die verwendeten Geräte mit entsprechendem Hersteller sind an den jeweiligen Stellen im Text vermerkt.

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Zellkultur

A431-Zellen und HaCaT-Zellen wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM) mit einer Konzentration von 1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$  sowie 4,5 g/L Glucose unter Zusatz von 50 U/ml Penicillin G und 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Streptomycin sowie 10% fetalem Kälberserum (FKS) gehalten. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Die selbst isolierten, primären Keratinozyten (MEK) aus der Epidermis neonataler Mäuse wurden in speziellem Keratinozyten-Medium (Keratinozytenmedium 2), das mit einer Antibiotikallösung aus Gentamycin (Endkonzentration: 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und Amphotericin B (Endkonzentration: 0,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) versetzt wurde, kultiviert. Alle Zellen wurden in konstanter Atmosphäre bei 37°C und einem  $\text{CO}_2$ -Gehalt von 5% gehalten. Für Versuchsaussaaten bzw. für das Passagieren wurden konfluente HaCaT-Zellen zunächst mit einer EDTA-Lösung für 20 min inkubiert, um durch Chelation der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen die Cadherin-Bindungen zu schwächen und folglich die Vereinzelung der Zellen zu erleichtern. A431-Zellen und HaCaT-Zellen wurden durch Zugabe einer Trypsinlösung für 3 min vom Flaschenboden gelöst, in DMEM Medium aufgenommen und mittels einer elektrischen Pipette resuspendiert. Die Zellzahl wurde unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) bestimmt. Für die Induktion der Expression der Konstrukte GFP-DPwt und GFP-DPmut wurden die A431-Zellen für 24 h mit DMEM Medium, das mit 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Doxycyclin versetzt wurde, inkubiert.

#### 2.2.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Konfluente HaCaT-Zellen und A431-Zellen wurden zur Lagerung über einen längeren Zeitraum eingefroren. Hierfür wurde der Zellrasen mit Trypsin vom Flaschenboden gelöst, in DMEM Medium aufgenommen und für 5 min bei 280 g und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium (DMEM mit 20% FKS und 10% DMSO) aufgenommen und in Einfriergefäße überführt. Um für die Zellen die Toxizität von DMSO zu minimieren, wurden die Einfriergefäße sofort im Anschluss in flüssigen Stickstoff eingefroren. Bei Bedarf konnten eingefrorene Zellen wieder in den Versuch genommen werden, indem der Inhalt der Einfriergefäße nach kurzem Antauen in DMEM aufgenommen und anschließend abzentrifugiert wurde. Nach Resuspension des Zellpellets wurden die Zellen auf Kulturgefäße verteilt.

#### 2.2.3 RNA-Expressionsuntersuchungen

Um Kontaminationen mit RNasen zu vermeiden, wurden für die Arbeiten mit RNA ausschließlich sterile, gestopfte Pipettenspitzen sowie sterile Reaktionsgefäße verwendet. Alle Apparaturen und



Gefäße wurden vor ihrer Nutzung mit einem Dekontaminationsmittel gereinigt. Alle Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O hergestellt und durch Autoklavieren oder Filtration sterilisiert. Dazu wurde 1 ml/L DEPC zugegeben, mindestens 12 h inkubiert und anschließend zur Inaktivierung der kanzerogenen Chemikalie autoklaviert.

### **2.2.3.1 Isolation der Gesamt-RNA**

HaCaT-Zellen wurden für die RNA-Isolierung mittels des RNeasy Mini Kits in Petrischalen ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurde das Kulturmedium sorgfältig entfernt und die Zellen nach Zugabe von 350 µl RLT-Puffer mit einem sterilen Zellschaber vom Boden des Kulturgefäßes gelöst. Das Lysat wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und mit einer G20-Spritzenkanüle (Terumo, Eschborn, Deutschland) homogenisiert. Die Isolierung und Aufreinigung der RNA wurde unter Verwendung des RNeasy Mini Reaktionssystems nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die präparierte RNA wurde in RNase-freiem Wasser (30-50 µl) aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **2.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von RNA**

Zur Bestimmung von Konzentration und Reinheit der isolierten RNA diente der Mikroplattenleser Infinite 200 der Firma Tecan (Männedorf, Schweiz). Es wurden 2 µl der RNA auf eine Nanoquantplatte pipettiert und in einem spektralen Bereich von 220 bis 300 nm gegen die Referenz (hier Wasser) gemessen. Die RNA-Konzentration wird durch Messung der Absorption bei der Wellenlänge 260 nm bestimmt. Eine OD von 1,0 entspricht bei einer Wellenlänge von 260 nm einer Konzentration von 40 µg/ml einzelsträngiger RNA (Sambrook J., 2001). Es wurde stets eine Doppelmessung durchgeführt und mit dem arithmetischen Mittel dieser Werte gearbeitet.

Der Quotient der Absorption bei 260 nm und 280 nm gibt Auskunft über die Reinheit der RNA. Das optimale Verhältnis OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> reiner RNA beträgt 2,0.

### **2.2.3.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)**

Für die Reverse Transkription wurden 1-4 µg der aufgereinigten RNA verwendet. Die cDNA-Synthese erfolgte mit Oligo (dT)<sub>15</sub> Oligonukleotiden und mit der SuperScript II Reversen Transkriptase nach Angaben des Herstellers. Die synthetisierte cDNA wurde bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

### 2.2.3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von cDNA wurde in einem C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) in sterilen 0,5 µl PCR-Reaktionsgefäßen der Firma Bio-Rad durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden nach folgendem Schema pipettiert:

Tabelle 12: Pipettierschema des PCR-Reaktionsansatzes

Volumen	Komponenten
1 µg	DNA
1 µl	10 mM dNTPs
1 µl	10 mM Primer <i>forward</i>
1 µl	10 mM Primer <i>reverse</i>
5 µl	5xPCR-Puffer
1 µl	GoTaq DNA Polymerase
ad 20 µl	H <sub>2</sub> O

Nach einem initialen Denaturierungsschritt von 2 min bei 95°C, folgten die zyklischen Amplifizierungsschritte der PCR-Reaktion. Das PCR-Programm umfasste die Schritte der Denaturierung bei 94°C für 30 s, der Anlagerung bei 55°C für 30 s und der Elongation, wobei die Elongationsdauer 60 s/kb betrug. Abschließend, nach 30 PCR-Zyklen, folgte eine Kettenverlängerung für 7 min bei 72°C.

### 2.2.3.5 Gelelektrophorese von DNA

Zur qualitativen und quantitativen Auswertung wurden die PCR-Produkte und DNA-Abschnitte mittels eines Agarosegels ihrer Größe nach aufgetrennt und durch den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Dazu wurden 0,8 bis 1,5% Agarosegele in 1xTAE-Puffer hergestellt, die Proben mit 6xDNA-Ladepuffer gemischt und gemeinsam mit einem Größenstandard (GeneRuler DNA Ladder 100 bp) bei konstanter Spannung aufgetrennt. Als Laufpuffer diente ebenfalls der 1xTAE-Puffer. Die Detektion der aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgte mittels UV-induzierter Fluoreszenz mit dem Gerät FluoChemE (ProteinSimple, Kalifornien, USA).

### 2.2.4 Amplifikation rekombinanter Fusionskonstrukte

Um Überexpressionsstudien durchzuführen, wurden die in Tabelle 3 aufgelisteten Fusionskonstrukte in lebende Zellen eingebracht. Die angeführten Plasmide enthalten cDNA

Abschnitte, welche für bestimmte Zellstrukturproteine kodieren. Beim Ablesen dieser exogenen cDNA Sequenzen wird zusätzlich das fluoreszierende Protein GFP (engl. green fluorescent protein) (Shimomura et al., 1962) exprimiert. In allen Überexpressionsexperimenten wurde der GFP-Leervektor als Kontrolle verwendet. Um sicherzustellen, dass die aufgelisteten Fusionskonstrukte die korrekte cDNA enthalten, wurden diese vor Gebrauch durch die Firma Eurofins Genomics, Ebersberg sequenziert.

### **2.2.4.1 Konzentrationsbestimmung von DNA**

Die Ermittlung des genauen DNA-Gehalts war für die anschließenden Schritte der Bakterientransformation und Transfektion humaner Zellen entscheidend. Analog zur photometrischen Konzentrationsbestimmung von RNA wurden 2 µl der DNA auf eine Nanoquantplatte gegeben und im spektralen Bereich von 220 bis 300 nm mit dem Mikroplattenleser Infinite 200 gemessen. Hier entspricht eine OD von 1,0 bei einer Wellenlänge von 260 nm einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA (Sambrook J., 2001). Der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  reiner DNA beträgt 1,8.

### **2.2.4.2 Herstellung und Transformation chemokompetenter E.coli**

Eine Bakterienkolonie wurde über Nacht in 3 ml LB<sub>0</sub>-Medium (ohne Antibiotikum) bei 37°C und 280 g im Inkubator (WiseCube, Firma Witeg, Wertheim, Deutschland) inkubiert. Mit dieser Übernachtskultur wurden 100 ml LB<sub>0</sub>-Medium angeimpft und bis zu einer OD von 0,6 kultiviert. Die anschließenden Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Nach Erreichen der optimalen OD wurde die Bakterienkultur für 10 min auf Eis gestellt und dann für 10 min bei 3500 g und 4°C zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden vorsichtig in 5 ml eiskalten TSB-Puffer aufgenommen und in 100 µl Portionen in vorgekühlte Reaktionsgefäße aufgeteilt. Abschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Hitzeschocktransformation wurden 100 µl der chemisch kompetenten Bakterien vorsichtig auf Eis aufgetaut, mit einem Gemisch aus DNA und 20 µl 5xKCM-Puffer für 30 min auf Eis inkubiert. Die eingesetzte Menge der DNA war abhängig von deren Qualität. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min bei RT und dann für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von LB<sub>0</sub>-Medium wurde der Ansatz für 1 h bei 37°C kräftig geschüttelt. In einer Tischzentrifuge wurden die Bakterien bei 6000 g für 3 min pelletiert, in 100 µl LB<sub>0</sub>-Medium resuspendiert und auf LB-Agarplatten (mit entsprechendem Antibiotikum) gleichmäßig ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C kultiviert. Positive Transformanten wurden mittels Restriktionsanalyse ermittelt.

### 2.2.4.3 Isolation von Plasmid-DNA aus E.coli

Für die Extraktion und anschließende Aufreinigung der Plasmid-DNA aus E.coli wurde zunächst eine Vorkultur steril mit einer einzelnen transformierten Bakterienkolonie beimpft und 8 h unter Schütteln bei 300 g und 37°C inkubiert. Die Vorkultur diente der Beimpfung einer Übernachtskultur (100 ml LB-Medium, das mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt war). Die Isolierung der in den Bakterien vermehrten Plasmid-DNA erfolgte mittels des NucleoXtra Midi Kits nach Angaben des Herstellers. Die extrahierte Plasmid-DNA wurde in Nuklease-freiem Wasser aufgenommen, deren Konzentration und Reinheit photometrisch gemessen und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

### 2.2.5 Transiente Transfektion von HaCaT-Zellen

Für Überexpressions- oder RNA-Interferenzstudien wurden  $1 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> in 24-Wellplatten, 8  $\mu$ -slide Zellkammern (Ibidi, Martinsried, Deutschland) oder 96-Well Mikroplatten (PerkinElmer, Waltham, USA) ausgesät. Die Transfektion mit dem Reagenz TurboFect erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers, sobald die Zellen zu 80% konfluent waren. Hierfür wurden entweder 1,2  $\mu$ g/ $\mu$ l der Plasmid-DNA oder 0,78  $\mu$ g/ $\mu$ l der siRNA mit 2  $\mu$ l TurboFect versehen und mit 100  $\mu$ l DMEM Medium ohne FKS und Antibiotika für 40 min bei RT inkubiert. In allen Versuchen dienten der GFP-Leervektor oder die n.t. (engl. non targeting)-siRNA als Kontrolle.

Direkt vor Zugabe des Transfektionsansatzes erhielten die Zellen frisches Medium mit FKS. Die Transfektion wurde nach 8 h (bei DNA) und 24 h (bei siRNA) durch Wechsel des Mediums beendet, und die Zellen wurden in der Regel nach 48 h in den Versuch genommen.

Für gewisse Fragestellungen wurde eine Fluoreszenzstoff-markierte siRNA verwendet. Diese wurde unter Verwendung des Silencer siRNA Labeling Kits mit Cy3-Farbstoff nach Vorgaben des Herstellers generiert.

### 2.2.6 Transgenes Cortactin-Mausmodell

Die transgenen Cortactin-Mäuse wurden von Prof. Klemens Rottner (Abteilung für Molekulare Zellbiologie, TU Braunschweig) zur Verfügung gestellt. Cortactin-defiziente Tiere weisen keinen sichtbaren Phänotyp auf, sind gesund und haben eine normale Lebenserwartung (Schnoor et al., 2011). Die Tiere wurden im Tierstall der Ludwig-Maximilians-Universität München gehalten.

#### 2.2.6.1 Genotypisierung mittels PCR

Nach Absetzen der Tiere wurden 2 mm der Schwanzspitze abgenommen und für die DNA-Isolierung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Schwanzspitzen wurden nach Zugabe von 75  $\mu$ l einer Natronlauge (25 mM NaOH; 0,2 mM EDTA) in einem Heizblock (Haep Labor Consult,

Bovenden, Deutschland) für 1 h bei 98°C erhitzt und nach Abkühlen auf RT mit 75 µl 40 mM Tris HCl (pH 5,5) versetzt. Nach Zentrifugation für 3 min bei 7000 g wurde der Überstand bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Für die Genotypisierung mittels PCR Amplifikation wurden 2 µl der isolierten DNA mit 5 µl 5xGreen-Puffer, 0,5 µl dNTP-Mix, 1 µl Primer *forward*, 1 µl Primer *reverse* und 0,13 µl Go Taq Polymerase versetzt und mit reinem Wasser auf 25 µl aufgefüllt.

Tabelle 13: PCR Programm der Genotypisierung

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

Die gelelektrophoretische Auftrennung und die anschließende Detektion der Proben erfolgten nach den Schritten aus Abschnitt 2.2.3.5.

### 2.2.6.2 Isolation und Kultivierung muriner primärer Keratinozyten

Für die Präparation von murinen primären Keratinozyten (MEKs) wurden neonatale Tiere (Tag 0 bis 3 nach Geburt) durch Dekapitation getötet, und die Haut wurde im Anschluss abpräpariert. Die Epidermis wurde von der Dermis durch Inkubation mit Dispase für 16 h (meist über Nacht) bei 4°C schonend abgetrennt. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde die Dispase-Lösung zuvor mit zwei Antibiotika (10 µg/ml Gentamycin und 0,25 µl/ml Amphotericin B) versetzt. Am Folgetag ließ sich die Epidermis leicht von der Dermis abziehen. Die Inkubation der Epidermis mit Accutase für 20 min bei RT ermöglichte die anschließende Dissoziation der Keratinozyten aus der Epidermis durch Herausschaben mit einer blauen Pipettenspitze. Nach Zentrifugation der so gewonnenen Zellsuspension für 3 min bei 280 g wurde das Pellet in Medium, das selektiv für Keratinozyten (Keratinozytenmedium 2) ist, aufgenommen, die Zellzahl ermittelt und  $1,8 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf die Kulturgefäße verteilt. Bei einer Konfluenz von 90% wurden die Zellen für 24 h in Medium mit 1,8 mM Ca<sup>2+</sup> kultiviert.

### 2.2.7 Proteinbiochemische Methoden

#### 2.2.7.1 Aufreinigung von Patienten-/Kontrollantikörpern

Es wurde Serum eines PV-Patienten verwendet, der sowohl orale als auch Hautläsionen aufwies. Die Erkrankung wurde klinisch, serologisch sowie histologisch nachgewiesen. Die mit ELISA (Euroimmun, Lübeck) gemessenen Antikörperwerte betragen für Dsg3 11.550 U/ml und für Dsg1 375 U/ml. Das Serum des Patienten wurde von Prof. Enno Schmidt, Universität Lübeck zur Verfügung gestellt. Als Kontrolle wurde Serum einer freiwilligen, gesunden Person verwendet. Im Experiment wurden die PV-IgG- wie auch Kontroll-IgG-Fractionen in einer Konzentration von 0,5 mg/ml eingesetzt.

Die Aufreinigung der IgG-Fractionen erfolgte mit Hilfe der Protein-A-Affinitätschromatographie. Hierzu wurden 500 µl Protein-A-Agarosepartikel in einer 5 ml Spritze zwischen zwei Fritten positioniert und mit 20 ml PBS gespült. Das Patientenserum wurde anschließend auf die Säule gegeben und mittels Rotation für mindestens 2 h mit dem Säulenmaterial vermischt. Nachdem das Serum vorsichtig über Nacht bei 4°C durch das Säulenmaterial diffundiert, wurden die IgGs, nach Spülen mit 20 ml PBS, durch Zugabe von 3 ml 20 mM Natriumcitratlösung (pH 2,4) eluiert. Das Eluat wurde in einem Reaktionsgefäß aufgefangen, in dem zuvor 60 µl einer 2 M Natriumcarbonatlösung vorgelegt wurden und mittels Amicon Ultra-4 Zentrifugalfilter (Merck Millipore, Billerica, USA) aufkonzentriert. Die IgG-Fractionen wurden auf einen pH-Wert von 7,0 bis 8,0 eingestellt, nach der Konzentrationsbestimmung mittels BCA-Messung (siehe Abschnitt 2.2.7.2) portioniert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### 2.2.7.2 Proteinkonzentrationsmessung

Die colorimetrische Bestimmung der Gesamtproteinmenge erfolgte mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit nach Protokoll des Herstellers. In einer 96-Wellplatte wurden die Proben im Verhältnis 1:5 mit 200 µl der BCA-Reagenz A+B versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach anschließendem Abkühlen der Proben auf RT für 20 min wurden die Proben bei einer Wellenlänge von 562 nm im Mikroplattenleser Infinite 200 ausgelesen. Die Probenmenge wurde anhand einer BSA-Standardgerade quantifiziert.

#### 2.2.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse der Gesamtproteinmenge wurden Zellen in SDS-Puffer unter Zugabe von Proteaseinhibitoren lysiert, homogenisiert und die Proteinmenge mittels Pierce BCA Protein Assay Kit bestimmt. Um zytoskelettal-gebundene Proteine von membranständigen zu separieren, wurde

die Methode der Triton-X-100 (TX-100)-Proteinextraktion verwendet. Hierfür wurden die Zellen 10 min auf Eis mit TX-100-Puffer inkubiert, bevor sie mit einem Zellschaber vom Plattenboden abgekratzt und in ein Reaktionsgefäß überführt wurden. Das anschließende Zentrifugieren bei 14000 g für 5 min bei 4°C (Kühlzentrifuge; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) diente dem Abtrennen des Überstandes, der den zytosolischen Proteinanteil enthielt, vom Pellet. Das Pellet, das die zytoskelettal-gebundenen Proteine beinhaltete, wurde in SDS-Puffer aufgenommen. In beiden Fraktionen wurden die Proteinmengen bestimmt.

Vor der elektrophoretischen Proteinauftrennung nach Laemmli (Laemmli, 1970) wurden die zu untersuchenden Proben mit 3x Probenpuffer gemischt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Nach Befüllung der Elektrophoresekammer von Bio-Rad mit Laufpuffer wurden gleiche Mengen des Proteingemisches durch das Anlegen einer elektrischen Spannung von 120 V zuerst in einem 5%igen Polyacrylamid-Gel gesammelt und dann über ein 7,5%iges bzw. 10%iges Gel entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Parallel zu den Proteinproben wurde ein Größenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder) aufgetragen, um das Proteingewicht zu determinieren.

### **2.2.7.4 Western-Blotting (WB) und Immunodetektion von Proteinen**

Um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine weitergehend immunchemisch zu untersuchen, wurden diese nach dem Standardprotokoll (Towbin et al., 1979) aus dem SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran (Amersham-Biosciences, Freiburg, Deutschland) übertragen. Hierfür wurde das Wet-Tank-Blotting-System von Bio-Rad mit Transferpuffer befüllt und die Proteinübertragung auf die Membran erfolgte durch konstanten Stromfluss von 850 mA für 1,5 h. Für die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran direkt nach dem Proteintransfer für 1 h bei RT in einem Absättigungspuffer (5% Milchpulver in TBS mit 0,05% Tween 20) inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der Primärantikörper in entsprechender Verdünnung über Nacht bei 4°C im Kühlrotor (Enviro-Genie, Scientific Industries, New York, USA). Am Folgetag, nach dreimaligen Waschen mit TBS mit 0,05% Tween 20 für 5 min, wurde die Membran für 2 h bei RT mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper, der in einem Verhältnis von 1:3000 eingesetzt wurde, inkubiert. Nach wiederholtem dreimaligen Waschen mit TBS mit 0,1% Tween 20 wurden die Antikörper-Antigen-Komplexe mit Hilfe der ECL (engl. enhanced chemiluminescence)-Methode und dem Gerät FluoChem E sichtbar gemacht. Die ECL-Lösungen I und II wurden vor Detektion frisch hergestellt.

Nach Detektion eines bestimmten Proteins wurde teilweise die Stripping-Methode angewandt, um die an das Antigen gebundenen Antikörper zu entfernen. Die Membran wurde dazu 20 min

bei 69°C in Stripping-Puffer inkubiert und nach erneutem Blocken mit Milchpulverlösung mit Primär- und anschließend Sekundärantikörper versetzt.

### **2.2.7.5 Immunpräzipitation**

Mit der Immunpräzipitationsmethode wurden spezifische Proteine angereichert und mögliche Interaktionspartner untersucht. Dafür wurden Zellen in T75-Zellkulturflaschen bis zur Konfluenz kultiviert und nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS für 30 min mit 1 ml RIPA-Puffer auf Eis inkubiert. Die Zellysate wurden für 5 min bei 14000 g und 4°C zentrifugiert und anschließend die Proteinkonzentration mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit ermittelt. Um unspezifische Bindungen zu reduzieren, wurden 600-1000 µg Protein zunächst mit vorgewaschenen G- oder G/A-Agarose-gebundenen Partikeln für 1 h bei 4°C in einem Rotor inkubiert. Anschließend wurden die Agarosepartikel durch Zentrifugation bei 8000 g und 4°C vom Zellysat getrennt und verworfen. Das geklärte Zellysat wurde zunächst für 3 h bei 4°C mit 1-2 µg des spezifischen Antikörpers versehen und anschließend wurde das Antigen-Antikörper-Konjugat mit 40 µl der vorgewaschenen Agarosepartikel über Nacht bei 4°C unter Rotation inkubiert. Am Folgetag wurde der Überstand nach Zentrifugation für 5 min bei 8000 g und 4°C verworfen und die Agarosepartikel mehrmals mit RIPA-Waschpuffer gewaschen. Der Antigen-Antikörper-Komplex und dessen assoziierte Bindungspartner wurden im letzten Schritt durch Zugabe von 30 µl 3xProbenpuffer bei 95°C voneinander gelöst und nach Abzentrifugation für 5 min bei 10300 g und RT mittels Westernblotverfahren analysiert.

Um phosphorylierte Proteine anzureichern, wurde diese Standardmethode etwas abgewandelt. So wurde ein spezieller Phospho-RIPA-Puffer, der mit Protease- und Phosphataseinhibitoren versehen wurde, verwendet. Gleiche Mengen der Zellysate wurden für 1 h bei 4°C mit 1 µl phospho-Tyrosin Antikörper in einem Rotor inkubiert. Anschließend wurde das Antigen-Antikörper-Konjugat für eine weitere Stunde mit 30 µl vorgewaschener Protein-G-Agarose-gebundener Partikel bei 4°C unter Rotieren inkubiert. Die Agarosepartikel wurden vor Zugabe des 3xProbenpuffers mit Phospho-RIPA-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die isolierten Tyrosin-phosphorylierten Proteine nach dem Westernblotverfahren analysiert.

### **2.2.8 Messung der RhoA-Aktivität mittels modifiziertem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Um die Effekte von AK23 und PV-IgG auf die Aktivierung von RhoA zu quantifizieren, wurde ein sogenannter RhoA-G-LISA nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen modifizierten ELISA, der aktives, GTP-verknüpftes RhoA der zu untersuchenden Zellen



bindet. Hierfür wurden HaCaT-Zellen in 24-Wellplatten kultiviert, mit PV-IgG oder AK23 inkubiert und nach dem Protokoll des Herstellers lysiert. Um die Aussagekraft des Assays zu optimieren, wurden nach Messung des Proteingehalts gleiche Mengen der Lysate eingesetzt und im Duplikat gemessen.

Die Versuchsansätze wurden mit dem Mikroplattenleser Infinite 200 bei einer Wellenlänge von 490 nm ausgelesen. Der Aktivitätsgrad der GTPasen wurde durch die Angleichung an aktiviertem (Positivkontrolle) und nicht-aktiviertem (Negativkontrolle) Lysat, die im Reaktionssystem enthalten sind, determiniert.

### **2.2.9 Indirekte Immunfluoreszenzdarstellung**

Die indirekte Immunfluoreszenzdarstellung gilt als Standardverfahren zur Sichtbarmachung spezifischer Zellstrukturen. Die Bindung von Primärantikörpern an Epitope der Zielstrukturen kann hierbei durch die Zugabe von Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern, die gegen den Fc-Teil der Primärantikörper gerichtet sind, sichtbar gemacht werden (Coons, 1958). Durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie mit einem TCS SP5-Konfokalmikroskop der Firma Leica, Mannheim wurde die Emission von sichtbarem Licht nach Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe detektiert.

Für die Fluoreszenzanalyse wurden HaCaT-Zellen auf Deckgläschen ( $\emptyset$  12 mm) ausgesät, transfiziert oder bei Erreichen der Konfluenz mit dem jeweiligen Versuchsagens behandelt. Nach Behandlungsabschluss wurden die auf den Deckgläschen gewachsenen Zellen für 10 min mit Fixierlösung (frisch aus PFA hergestellt) inkubiert und anschließend, nach dreimaligem Waschen mit PBS, für 5 min mit 0,1% TX-100 permeabilisiert. Nach erneuten Waschschritten mit PBS wurden die Deckgläschen auf Objektträger überführt und, um unspezifische Antikörperbindungen zu reduzieren, mit BSA/NGS für 40 min inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Behandlung mit spezifischen Primärantikörpern über Nacht bei 4°C. Am Folgetag wurden die Deckgläschen zunächst zur Entfernung des überschüssigen Antikörpers 3x mit PBS gewaschen und dann mit den entsprechenden Sekundärantikörpern für 1 h mit oder ohne Alexa488-Phalloidin, das der Detektion der Actinfilamente diente, versehen. Der FITC-gekoppelte pan-CK Antikörper benötigte keine zusätzliche Behandlung mit Sekundärantikörpern. Für Doppelfärbungen wurden Primär- bzw. Sekundärantikörper parallel inkubiert. Entscheidend hierbei war, dass die Primärantikörper aus unterschiedlichen Spezies stammten.

Nach Abschluss der Färbeschritte wurden die Deckgläschen erneut 3x mit PBS gewaschen und dann mit der Zellseite nach unten mit einem Tropfen NPG auf einem Objektträger platziert und im Dunkeln bei 4°C gelagert.

### 2.2.10 Proximity-Ligation-Assay (PLA)

Mit dieser *in situ*-Methode können Interaktionen endogener Proteine detektiert werden. Die Technik basiert auf der Ligation und Amplifikation von DNA-Oligonukleotiden, die an Sekundärantikörper gebunden sind. Befinden sich zwei Proteine in unmittelbarer räumlicher Nähe (<40 nm), so kann dies als Fluoreszenzsignal detektiert werden. Entscheidend für die spezifische Reaktion ist jedoch, dass die zwei eingesetzten Primärantikörper aus unterschiedlichen Spezies stammen (Soderberg et al., 2006). Für die Detektion der Interaktion zwischen Dsg3 und Cortactin wurden HaCaT-Zellen, die bis zur Konfluenz auf Deckgläschen kultiviert wurden, nach dem Standardprinzip (Abschnitt 2.2.9) fixiert und mit den Primärantikörpern anti-Dsg3 (Kaninchen) und anti-Cortactin (Maus) inkubiert. Die weiteren Schritte erfolgten unter Verwendung des Duolink *in situ* orange Kits Maus/Kaninchen nach Angaben des Herstellers. Um die Spezifität der Fluoreszenzsignale zu ermitteln, wurden parallel Negativkontrollen, die nur mit einem der angezeigten Primärantikörper inkubiert wurden, angefertigt. Die Detektion der Fluoreszenzsignale erfolgte nach der Eindeckung der Deckgläschen mit dem TCS SP5-Konfokalmikroskop.

### 2.2.11 Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP)

FRAP stellt eine Technik dar, mit der dynamische Prozesse wie z.B. die laterale Diffusion von fluoreszenzmarkierten Proteinen in lebenden Zellen untersucht werden können. Hierbei werden fluoreszierende Proteine durch kurze Bestrahlung mit einem Laser hoher Intensität in einem bestimmten Bereich (engl. region of interest, ROI) ausgebleicht. Die Diffusion der umliegenden nichtgebleichten Fluoreszenzproteine wird in der sogenannten „Post-Bleaching“-Phase mit einem Laser geringer Intensität über die Zeit aufgenommen. Die Messung der Regenerationszeit der Fluoreszenz innerhalb einer ROI erlaubt durch vergleichende Messungen einen Rückschluss auf die Dynamik des untersuchten Proteins (Snapp et al., 2003).

Mit dieser Methode wurde die Diffusionsdynamik von GFP-gekoppelten Dsg3-Molekülen in HaCaT-Zellen untersucht, die defizient für  $\alpha$ -Adducin waren. Hierfür wurden  $1 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> in 8  $\mu$ -slide Zellkammern mit Glasboden aufgeteilt, mit GFP-Dsg3 und siRNA  $\alpha$ -Adducin sequenziell transfiziert. Um  $\alpha$ -Adducin defiziente Zellen eindeutig identifizieren zu können, wurde hier mit Cy3-markierter siRNA gearbeitet. Vor Messung wurden die Zellen mit DMEM Medium ohne Phenolrot versetzt, da dieser pH-induzierende Farbstoff die Fluoreszenzanalyse stört.

Nach einer Transfektionszeit von 48 h wurden die FRAP-Experimente in einem beheizbaren Inkubator (INU stage top incubator, Tokai Hit, Shizuoka-Ken, Japan) bei konstanten 37°C und 5% CO<sub>2</sub> am TCS SP5-Konfokalmikroskop durchgeführt. Das Bleichen des Fluoreszenzsignals erfolgte nach Festlegung der ROIs mit einer Laserleistung von 100% bei einer Wellenlänge von 488 nm. In

der „Post-Bleaching“-Phase wurde die Fluoreszenzintensität alle 10 s gemessen. Alle Schritte der FRAP-Analyse sowie die anschließende Quantifizierung wurden unter Verwendung der FRAP-Wizard-Software von Leica (Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Für die graphische Darstellung wurden die ermittelten Fluoreszenzintensitäten auf Werte vor dem Bleichen („Pre-Bleaching“-Phase) normiert.

### 2.2.12 Zelldissoziationsversuche

Mit dieser etablierten auf Dispase-basierten Methode kann die interzelluläre Haftungsstärke quantifiziert werden (Ishii et al., 2005). Hierfür wurden HaCaT-Zellen in 24-Wellplatten bis zur Konfluenz kultiviert und mit den entsprechenden Testreagenzien oder Antikörpern behandelt. Durch die Inkubation mit 150 µl Dispase II bei 37°C wurden die adhärenen Zellen als intakter Zellrasen vom Reaktionsgefäßboden gelöst. Nach 20 min wurde die Dispase II entfernt und gegen 350 µl HbSS ausgetauscht. Um die Haftungsstärke zwischen den Zellen zu bewerten, wurden die abgelösten Zellrasen einem definierten mechanischen Stress ausgesetzt. Durch das sogenannte „Scheren“ des Zellverbandes mit Hilfe einer 1 ml elektrischen Pipette (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) entstanden Zellfragmente, deren Anzahl als Maß für die interzelluläre Haftungsstärke gilt. Die resultierenden Zellfragmente wurden mit einem Binokular-Mikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) in gleicher Vergrößerung ausgezählt und es wurden repräsentative Fotos erstellt. Jedes Experiment wurde im Duplikat bzw. Triplikat ausgeführt.

### 2.2.13 Biolumineszenz-basierte Messung von intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Ionen

Um intrazelluläre Konzentrationen freier Ca<sup>2+</sup>-Ionen in lebenden Zellen zu messen, wurde die Äquorintechnik angewandt. Hierbei nutzt man das biolumineszente Protein Äquorin aus der Leuchtqualle *Aequoia victoria* als Calciumsensor, indem es über seine prosthetische Gruppe Coelenterazin intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Ionen cheliiert. Die Bindung der Ca<sup>2+</sup>-Ionen bewirkt eine Lichtemission bei einer Wellenlänge von 466 nm, die proportional zur Ca<sup>2+</sup>-Konzentration ist. Durch Inkubation mit Coelenterazin kehrt das Ca<sup>2+</sup>-bindende Apoäquorin unter Kohlenstoffdioxidfreisetzung wieder in die aktive Form zurück (Creton et al., 1999).

HaCaT-Zellen wurden in 96-Well Mikroplatten (PerkinElmer, Waltham, USA) kultiviert, mit GFP-gekoppelten Plasmid G5α (Baubet et al., 2000) transfiziert und nach 48 h in den Versuch genommen. Die Bindung an GFP ermöglichte es, eine möglichst optimale Expressionsrate von Äquorin fluoreszenzmikroskopisch nachzuweisen. Änderungen der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen nach Applikation bestimmter Stimuli wurden in einem FLUOstar Omega Plattenleser der Firma BMG Labtech, Ortenburg bei 37°C gemessen. Hierfür wurden die Zellen

zunächst mit Coelenterazin H (Biaffin, Kassel, München) markiert und dann mit HbSS als Kontrolle, Kontroll- oder PV-IgGs durch automatische Injektion behandelt. Die Lichtemission wurde bei einer maximalen Wellenlänge von 509 nm alle 2 s gemessen.

### **2.2.14 Grafische Darstellung und statistische Auswertung der Datensätze**

Westernblotbanden wurden mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogrammes ImageJ ausgewertet und mittels Excel (Microsoft, Redmond, USA) grafisch dargestellt. Angegebene Fehlerbalken repräsentieren die ermittelten Werte für den Standardfehler (SEM). Auf statistische Signifikanz (p) wurde entweder mit dem t-Test oder mittels ANOVA, gefolgt von einer Bonferroni-Korrektur für Probengruppen, bei denen sich mehrere Gruppen auf eine Kontrollgruppe beziehen, geprüft. Eine statistische Signifikanz wurde für alle Werte für  $p < 0,05$  festgelegt. Der Pearson-Korrelationskoeffizient wurde mittels des JACoP-Plugins für ImageJ (Bolte und Cordelieres, 2006) bestimmt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Rolle des Actin-Zytoskeletts und der Adhärenskontakte bei der Assemblierung von Desmosomen

Für die Assemblierung der Desmosomen translozieren kontinuierlich synthetisierte desmosomale Cadherine an die Zellmembran, gruppieren sich dort zu zunächst losen Konjugaten und reifen in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zu stabilen Zellkontakten heran (Green und Simpson, 2007; Nekrasova und Green, 2013). Allerdings sind die Vorgänge, wie desmosomale Proteine an die Zellgrenzen gelangen und anschließend in die Desmosomen eingebaut werden, bis heute nur unzureichend erforscht. Es wird angenommen, dass dabei Adhärenskontakte im Zusammenspiel mit Actinfilamenten eine wesentliche Rolle einnehmen (Adams et al., 1998; Vasioukhin et al., 2000; Yonemura et al., 1995). Um die Prozesse der desmosomalen Assemblierung in Keratinozyten zu untersuchen, wurde daher der Fokus auf die Actin-bindenden Proteine Adducin und Cortactin gelegt. Weiterhin wurde E-Cadherin untersucht, da dieses als Vertreter der adhärensjunktional-lokalisierten Cadherine für die Desmosomenbildung relevant und mit dem Actin-Zytoskelett verbunden ist.

#### 3.1.1 Bedeutung von Adducin für das kortikale Actin-Zytoskelett

Um die Funktionen von Adducin in humanen Keratinozyten der HaCaT-Zelllinie (engl. human adult low  $\text{Ca}^{2+}$  high temperature) (Boukamp et al., 1988) zu analysieren, sollte zunächst die Expression der zwei ubiquitären Isoformen von Adducin,  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Adducin, untersucht werden. Die Expression beider Adducin-Isoformen wurden sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene nachgewiesen (Abb. 6a und b), und in Immunfluoreszenzversuchen wurde eine deutliche Kolo-kalisierung mit dem kortikalen Actinring detektiert (Abb. 7a). Für weiterführende Funktionsuntersuchungen wurde die Proteinexpression von Adducin mittels siRNA-Interferenz gezielt reduziert. Dazu wurden HaCaT-Zellen mit siRNA, die spezifisch gegen das Zielgen gerichtet ist ( $\alpha$ -Adducin-siRNA oder  $\gamma$ -Adducin-siRNA), transient transfiziert. Als Kontrolle wurde unspezifische n.t.-siRNA (engl. non-targeting) unter ansonsten gleichen Konditionen eingesetzt. Die effektive Reduktion der Expression von  $\alpha$ - bzw.  $\gamma$ -Adducin wurde 48 h nach Transfektion auf Proteinebene detektiert (Abb. 6b).

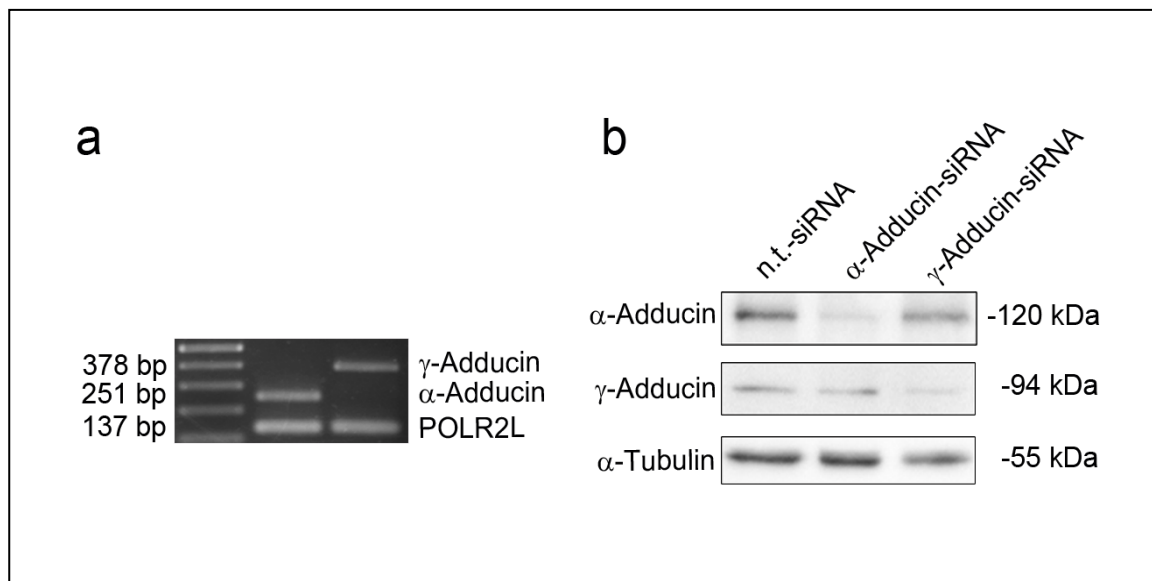


Abbildung 6: Untersuchung der Adducin-Expression in HaCaT-Zellen

(a) Detektion der Isoformen  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Adducin mittels PCR-Amplifikation (n=4). (b) Nachweis der spezifischen Reduktion der Proteinexpression nach Transfektion von  $\alpha$ - oder  $\gamma$ -Adducin-siRNA auf Proteinebene mittels Westernblotanalyse. Um die Depletionseffizienz zu ermitteln, wurden Zellen parallel mit n.t.-siRNA transfiziert. POLR2L und  $\alpha$ -Tubulin dienten als interne Ladekontrollen (n=4) [mit der Genehmigung des *Journal of Biological Chemistry* verwendet und modifiziert nach Rötzer et al., 2014]. bp = engl. base pair, kDa = Kilodalton

Da Adducin als Actin-Bindeprotein an der Organisation des Actin-Zytoskeletts beteiligt ist (Kuhlman et al., 1996; Taylor und Taylor, 1994), wurden zu Beginn der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen des Funktionsverlusts von  $\alpha$ - bzw.  $\gamma$ -Adducin auf die Actin-Filamente in HaCaT-Zellen untersucht (Abb. 7).

Nach Erreichen der Konfluenz wurden HaCaT-Zellen, die entweder mit n.t.-siRNA oder  $\alpha$ - bzw.  $\gamma$ -Adducin-siRNA transfiziert wurden, gegen die jeweilige Adducin-Isoform und gegen F-Actin gefärbt. Unter Kontrolltransfektion zeigte sich, dass sowohl  $\alpha$ -Adducin als auch  $\gamma$ -Adducin an der Zellmembran mit dem kortikalen Actinring kolokalisierte. Die siRNA-vermittelte Depletion der zwei Adducin-Isoformen bewirkte eine deutliche Fragmentierung des F-Actins (Abb. 7a). Zur genauen Quantifizierung der Fragmentierung wurde ein sogenannter Fragmentierungsindex etabliert, der die Länge des kortikalen Actinrings bezogen auf den Zellumfang angibt (Abb. 7b). Nach Auswertung von 24 Zellen je Kondition zeigte sich, dass die Länge des kortikalen Actinrings nach  $\alpha$ - bzw.  $\gamma$ -Adducin-Depletion gegenüber der n.t.-siRNA-Kontrolle signifikant verkürzt war. Der Fragmentierungsindex für  $\alpha$ -Adducin betrug  $0,4 \pm 0,1$  (Zellen mit sichtbarer Depletion) gegenüber  $0,8 \pm 0,1$  (Zellen ohne sichtbare Depletion) und  $0,8 \pm 0,1$  (n.t.-siRNA). Der Fragmentierungsindex

für  $\gamma$ -Adducin betrug  $0,3 \pm 0,1$  (Zellen mit sichtbarer Depletion) gegenüber  $0,8 \pm 0,1$  (Zellen ohne sichtbare Depletion) und  $0,7 \pm 0,1$  (n.t.-siRNA).

Zusammenfassend induzierte die Depletion beider Adducin-Isoformen, die in HaCaT-Zellen gleichermaßen exprimiert werden, eine starke Fragmentierung der kortikalen Actinbündel.

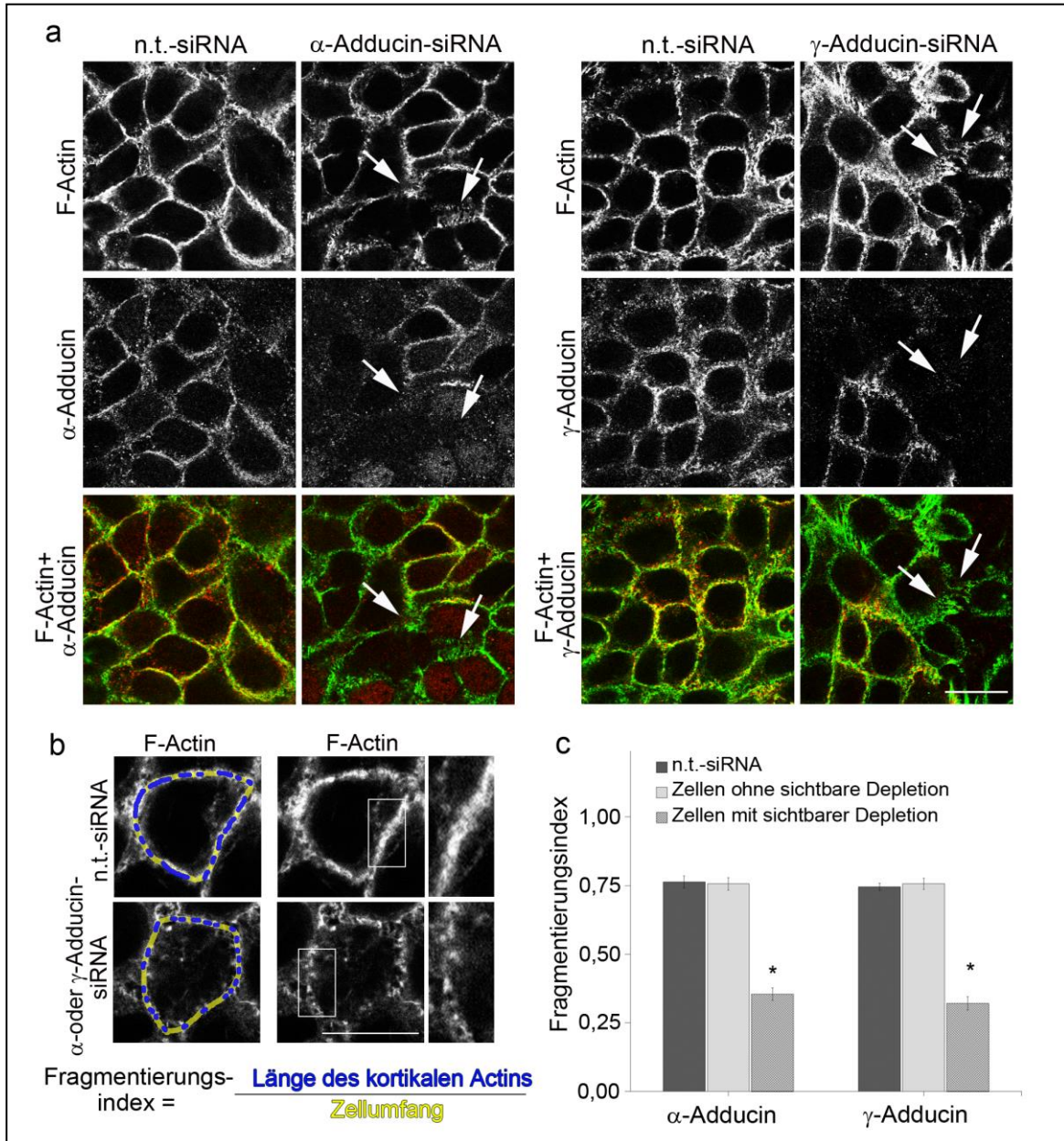


Abbildung 7: Fragmentierung des kortikalen Actinrings nach  $\alpha$ - bzw.  $\gamma$ -Adducin-siRNA-Transfektion (a) Darstellung der Immunfärbung gegen  $\alpha$ - bzw.  $\gamma$ -Adducin und der F-Actin-Färbung (Alexa Phalloidin 488). In den Doppelfärbungen ist  $\alpha$ - bzw.  $\gamma$ -Adducin in rot und das F-Actin in grün dargestellt. Unter Kontrollkonditionen (n.t.-siRNA) kolokalisierte  $\alpha$ - bzw.  $\gamma$ -Adducin an der Zellmembran mit dem F-Actin. Die spezifische Depletion von  $\alpha$ - bzw.  $\gamma$ -Adducin führte zu einer starken Fragmentierung des kortikalen F-Actins (Pfeile). Maßstab: 20  $\mu$ m, n=4. (b) Darstellung zur Berechnung der Fragmentierungsindex. Maßstab: 20

µm. (c) Grafische Darstellung der Fragmentierungsindexes von HaCaT-Zellen, die entweder mit n.t.-siRNA oder  $\alpha$ - bzw.  $\gamma$ -Adducin-siRNA transfiziert wurden oder keine sichtbare Depletion aufwiesen (n=3; gemessene Zellen=24; \* p<0,05 im Vergleich zur n.t.-siRNA-Kontrolle) [mit der Genehmigung des *Journal of Biological Chemistry* verwendet und modifiziert nach Rötzer et al., 2014].

### 3.1.2 Wirkung der siRNA-vermittelten Depletion von Adducin und E-Cadherin auf die interzelluläre Haftung

Da ein intaktes Zytoskelett essentiell für die interzellulären Adhäsionskräfte ist (Huen et al., 2002; Vasioukhin und Fuchs, 2001), wurde im nächsten Schritt untersucht, ob der Funktionsverlust der Adducin-Isoformen die Zellhaftung der HaCaT-Zellen veränderte. Dazu wurden konfluente HaCaT-Zellen nach Isoform-spezifischer Depletion von Adducin als intakter Zellrasen mittels Dispase vom Gefäßboden gelöst und einem definierten mechanischen Scherstress ausgesetzt (Abb. 8).

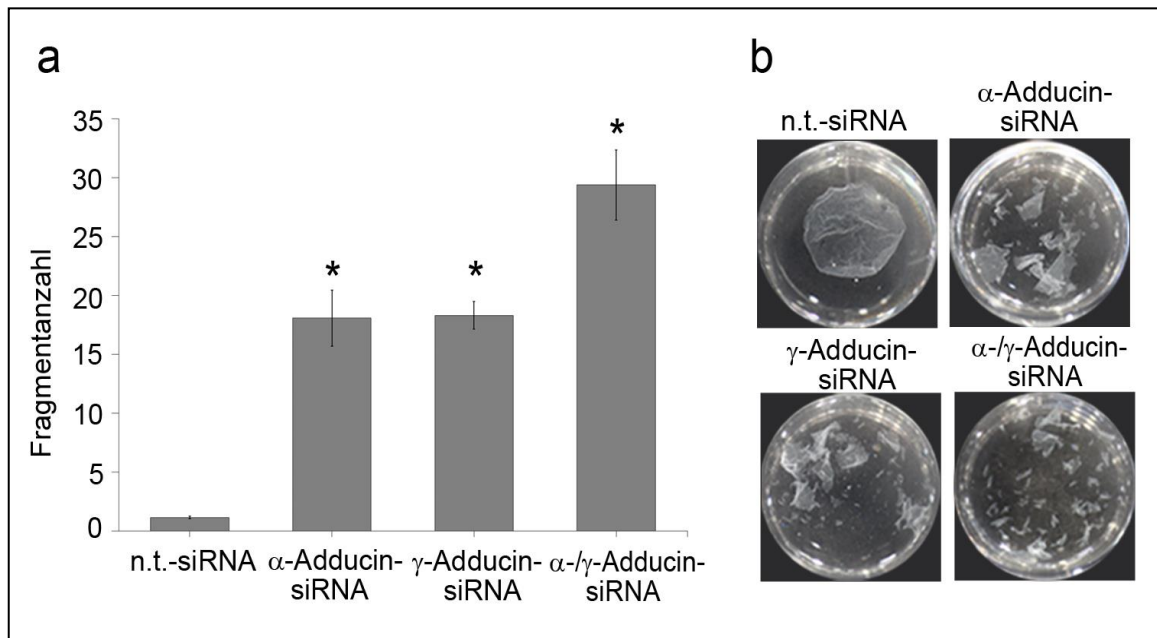


Abbildung 8: Verlust von  $\alpha$ - bzw.  $\gamma$ -Adducin reduziert die interzelluläre Haftung

(a) Fragmentzahlen nach Durchführung der Dissoziationsversuche mit  $\alpha$ - bzw.  $\gamma$ -Adducin-depletierten HaCaT-Zellen. Verlust beider Adducin-Isoformen führte zu einer signifikanten Erhöhung der Fragmentzahlen (n $\geq$ 14; \* p<0,05 im Vergleich zur n.t.-siRNA-Kontrolle). (b) Repräsentative Bilder der Reaktionsgefäße nach Durchführung des Dissoziationsversuchs [mit der Genehmigung des *Journal of Biological Chemistry* verwendet und modifiziert nach Rötzer et al., 2014].

Es zeigte sich, dass die interzellulären Haftungskräfte durch n.t.-siRNA-Transfektion kaum verändert wurden (Fragmentanzahl: 1  $\pm$  0), wohingegen die Fragmentzahlen nach  $\alpha$ - bzw.  $\gamma$ -



Adducin auf  $18 \pm 2$  bzw.  $18 \pm 1$  deutlich anstiegen. Die gleichzeitige Depletion beider Adducin-Isoformen induzierte eine noch stärkere Zelldissoziation (Fragmentanzahl:  $29 \pm 3$ ).

In einer Studie mit SK-CO15 Zellen, einer humanen Zelllinie aus dem Darmepithel, wurde Adducin mit der Umorganisation von Adhärenskontakten und Verschlusskontakten in Verbindung gebracht (Naydenov und Ivanov, 2010). Da die Daten mit HaCaT-Zellen einen interzellulären Haftungsverlust nach siRNA-induzierter Depletion von Adducin demonstrierten, wurden im Folgenden die Effekte der Adducin-Depletion auf Komponenten der Desmosomen und weiterer Interzellularkontakte untersucht (Abb. 9).

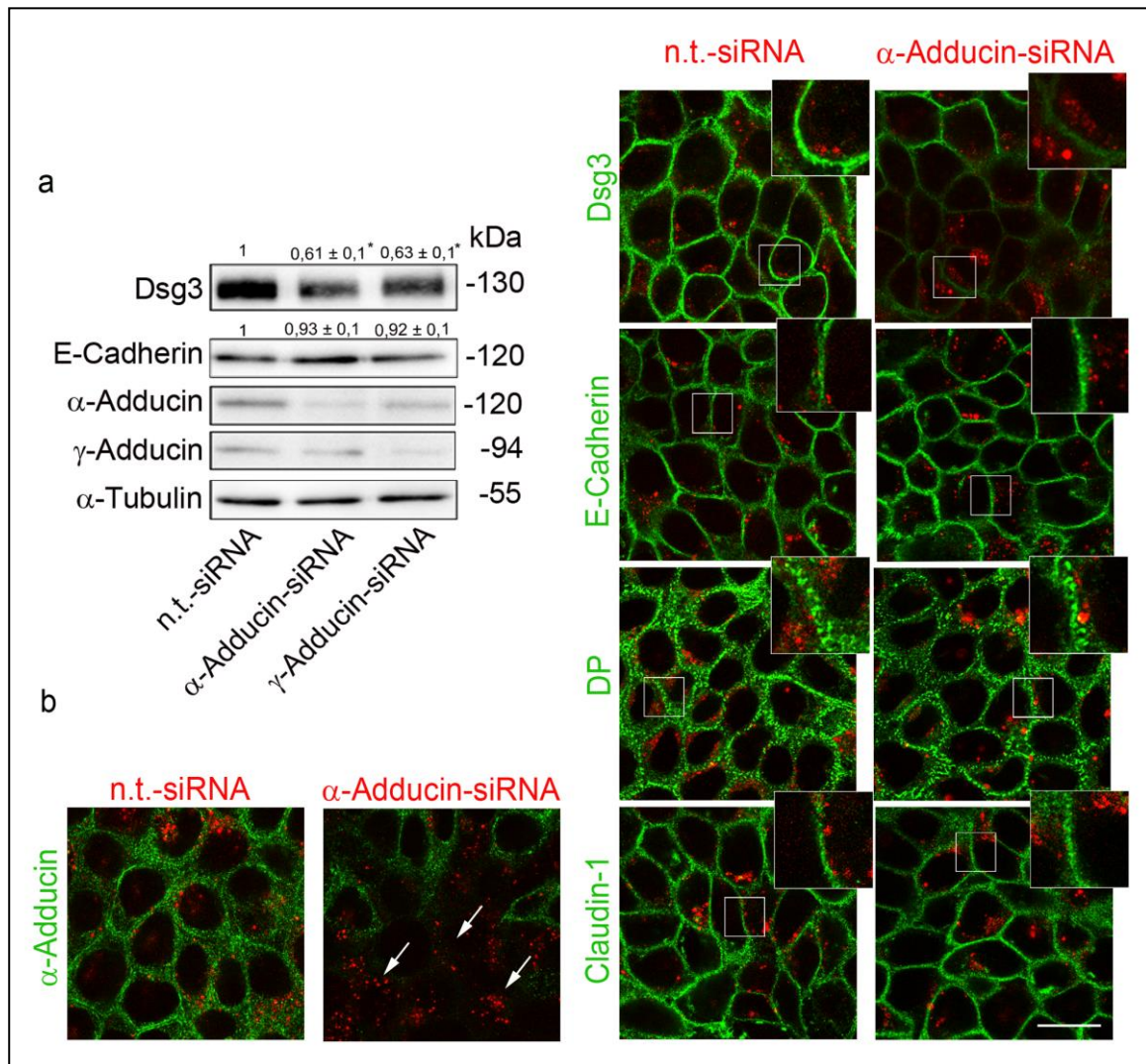


Abbildung 9: siRNA-induzierte Adducin-Depletion reduziert die Expression von desmosomalem Dsg3, nicht aber von Proteinen weiterer Interzellularkontakte

(a) Westernblotanalysen zeigten reduzierte Dsg3-Gesamtproteinmengen nach Isoform-spezifischer Depletion von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Adducin.  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladekontrolle ( $n=5$ ; \*  $p<0,05$  im Vergleich zu n.t.-siRNA-Kontrolle). (b) In Immunfluoreszenzversuchen wiesen Zellen mit Cy3-markierter  $\alpha$ -Adducin-siRNA (rot, Pfeile) im Vergleich zu n.t.-siRNA eine diffuse Verteilung sowie eine Reduktion von Dsg3 auf,

wohingegen die Lokalisation von E-Cadherin, DP und Claudin-1 (grün) nicht verändert wurde (Maßstab: 20 µm, hervorgehobene Zellareale: 2,5-fache Vergrößerung der angezeigten Bereiche, n=4) [mit der Genehmigung des *Journal of Biological Chemistry* verwendet und modifiziert nach Rötzer et al., 2014].

Die gezielte Depletion der zwei Adducin-Isoformen mittels siRNA-Interferenz führte zu einer signifikanten Reduktion des Dsg3-Proteingehalts in HaCaT-Zellen. Die Mengen von Dsg3, einem desmosomalen Cadherin mit hoher Relevanz für die Vermittlung der Zelladhäsion in Keratinozyten (Hartlieb et al., 2013), wurden im Vergleich zu n.t.-siRNA-Kontrollen auf  $61 \pm 9\%$  ( $\alpha$ -Adducin-siRNA) und  $63 \pm 5\%$  ( $\gamma$ -Adducin-siRNA) verringert (Abb. 9a). Aufgrund der Tatsache, dass alle bisherigen Depletionsversuche mit beiden Adducin-Isoformen vergleichbare Ergebnisse lieferten, wurden die folgenden Daten mit Fokus auf  $\alpha$ -Adducin erhoben. Um transfizierte Zellen in Immunfluoreszenzstudien eindeutig identifizieren zu können, wurde die siRNA vor Gebrauch mit einem Cy3-Fluoreszenzfarbstoff markiert (Abb. 9b, Pfeile). In Einklang mit Ergebnissen der Westernblotanalyse zeigten Immunfärbungen gegen Dsg3 eine schwächere Fluoreszenzintensität und eine diffuse Verteilung von Dsg3 entlang der Zellmembran nach Transfektion von  $\alpha$ -Adducin-siRNA. Interessanterweise veränderte die Depletion von  $\alpha$ -Adducin weder die Proteinmengen (Abb. 9a) noch die Lokalisation (Abb. 9b) von E-Cadherin. Auch wurden keine Veränderungen in der Immunfärbung gegen das desmosomale Plaqueprotein DP oder Claudin-1 als Molekül der Tight Junctions detektiert (Abb. 9b).

Um zu untersuchen, in welchem Ausmaß E-Cadherin die Vermittlung der Adhäsion zwischen Keratinozyten beeinflusste, wurde die Haftung von HaCaT-Zellen nach Transfektion mit E-Cadherin-siRNA oder Dsg3-siRNA in Dispase-basierten Dissoziationsversuche überprüft. Die siRNA-induzierte Depletion von E-Cadherin führte zu einem erhöhten Haftungsverlust, der mit dem von Dsg3-depletierten Zellen vergleichbar war (Abb. 10a). Während die Haftung der Kontrollzellen (n.t.-siRNA) durch mechanischen Scherstress kaum verändert wurde (Fragmentanzahl:  $8 \pm 1$ ), stiegen die Fragmentzahlen nach Transfektion von E-Cadherin-siRNA auf  $22 \pm 1$  bzw. von Dsg3-siRNA auf  $23 \pm 1$  an. Parallel durchgeführte Westernblot-untersuchungen zeigten eine signifikante Depletion von E-Cadherin bzw. Dsg3 unter diesen Konditionen (Abb. 10b). Hier verursachte die siRNA-vermittelte Depletion von E-Cadherin jedoch, im Gegensatz zu Versuchen nach  $\alpha$ -Adducin-siRNA-Transfektion (Abb. 9a), keine Reduktion der Dsg3-Proteinmengen. Im umgekehrten Fall führte die Dsg3-siRNA-Transfektion auch nicht zu Veränderungen der Mengen an E-Cadherin.

Somit wurde mittels siRNA-Interferenzstudien gezeigt, dass in HaCaT-Zellen sowohl Adducin als auch E-Cadherin wichtig für die Vermittlung der interzellulären Haftung sind. Des Weiteren führte die siRNA-vermittelte Depletion von  $\alpha$ -Adducin zu einer spezifischen Reduktion des desmosomalen Cadherins Dsg3, wohingegen Komponenten der Verschlusskontakte sowie der Adhärenskontakte unverändert blieben.

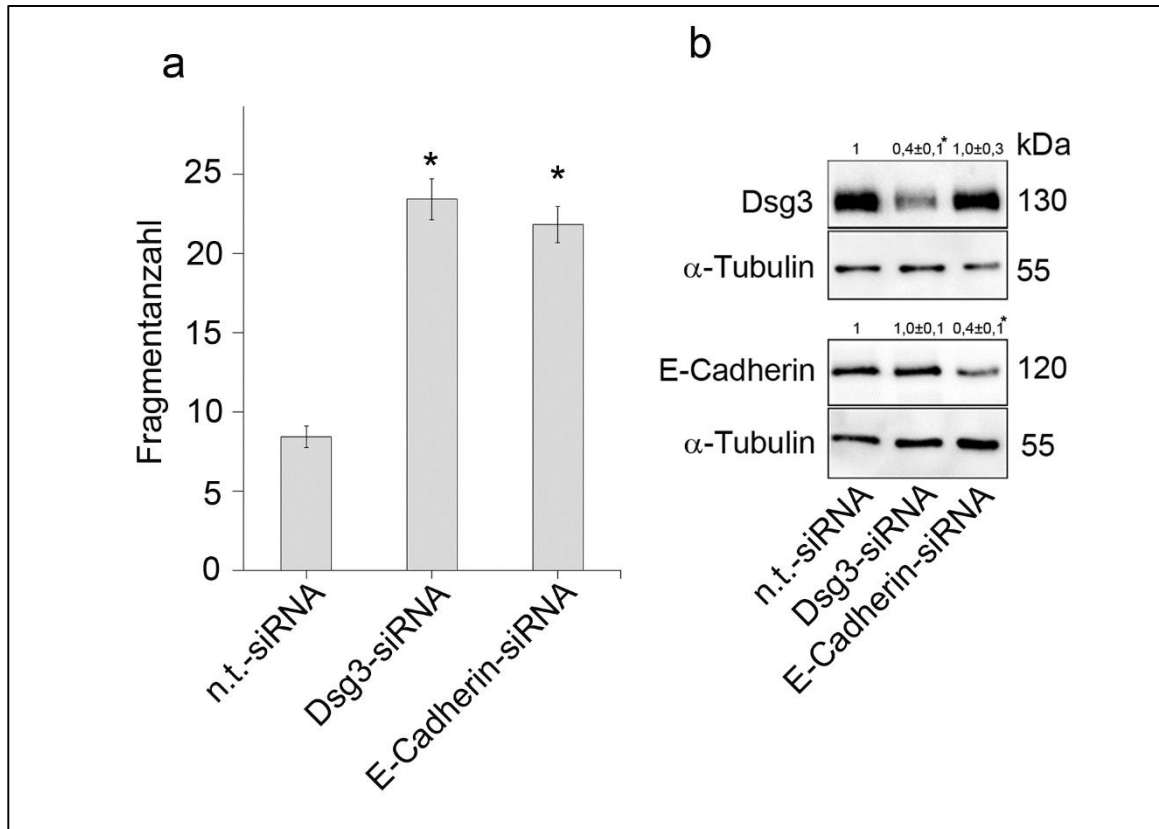


Abbildung 10: siRNA-vermittelte E-Cadherin-Depletion führt zum Zell-Zell-Haftungsverlust

(a) Darstellung der Fragmentanzahl der Dispase-basierten Dissoziationsversuche nach siRNA-vermittelter Depletion von Dsg3 und E-Cadherin. Vergleichbar mit Dsg3, führte der Funktionsverlust von E-Cadherin zu einer signifikanten Erhöhung der Fragmentzahlen im Vergleich zu n.t.-siRNA-Kontrollen ( $n \geq 8$ ; \*  $p < 0,05$ ). (b) In Westernblotexperimenten wurde die effektive siRNA-vermittelte Depletion von E-Cadherin und Dsg3 nachgewiesen.  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladekontrolle ( $n=4$ ; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur n.t.-siRNA-Kontrolle) [mit der Genehmigung des Springer Verlages verwendet und modifiziert nach Rötzer et al., 2015].

### 3.1.3 Effekte der siRNA-induzierten Depletion von Adducin auf die Lokalisation von Dsg3

Im folgenden Schritt sollte der Mechanismus untersucht werden, über den Adducin die zellulären Proteinmengen von Dsg3 reguliert. Dsg3-Moleküle liegen in der Zellmembran entweder frei oder mit dem Zytoskelett verankert vor (Aoyama und Kitajima, 1999; Caldelari et al., 2001) und können mittels Triton-X-100 (TX-100)-Zellfraktionierung aufgetrennt werden. Dabei löst das Detergens TX-

100 die nicht mit dem Zytoskelett-verankerten Proteine aus den Zellen. DP dient dabei als Marker für die zytoskelettale Fraktion, da dieses Protein vorwiegend Zytoskelett-gebunden vorkommt. GAPDH wird zur Detektion der löslichen Proteinfraction verwendet. Um die Verteilung von Dsg3 nach  $\alpha$ -Adducin-siRNA-Transfektion zu untersuchen, wurden die Zelllysate nach TX-100-basierter Fraktionierung mit Hilfe des Westernblotverfahrens analysiert (Abb. 11). Hierbei wiesen Zellen, die mit  $\alpha$ -Adducin-siRNA transfiziert wurden, eine signifikante Reduktion der zytoskelettal-gebundenen Dsg3-Proteinmengen auf ( $69 \pm 9\%$  im Vergleich zur n.t.-siRNA-Kontrolle). Der Proteingehalt von TX-100 löslichem Dsg3 wurde hingegen nicht verändert ( $106 \pm 6\%$  im Vergleich zur n.t.-siRNA-Kontrolle).

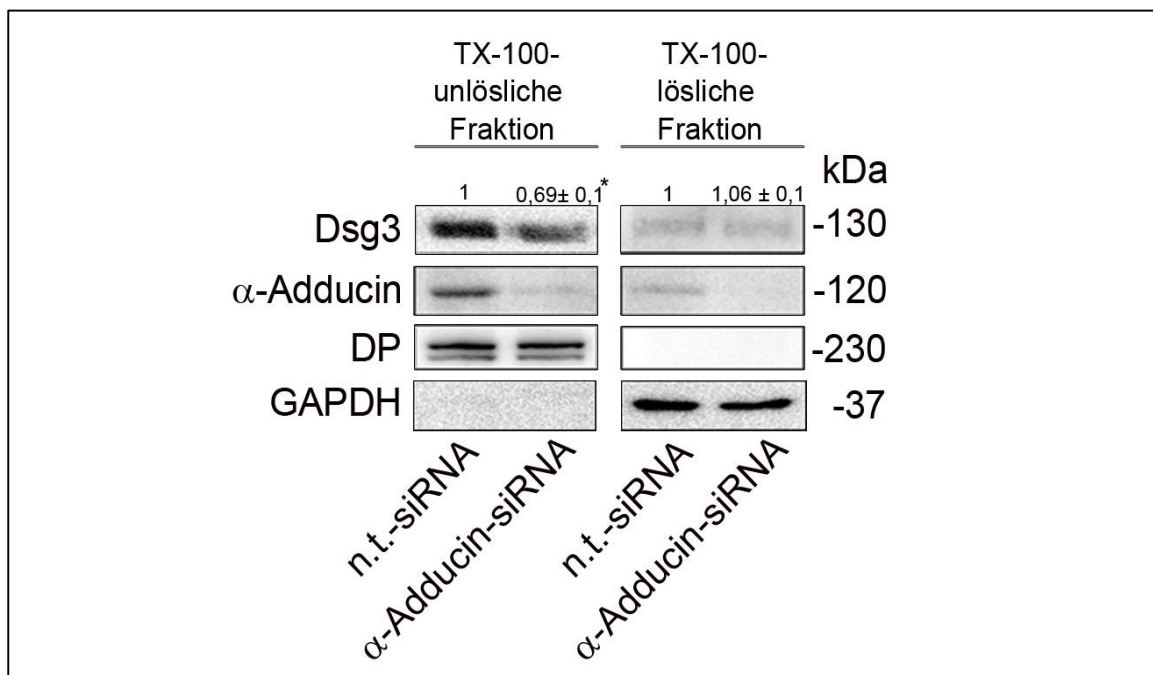


Abbildung 11: siRNA-vermittelte  $\alpha$ -Adducin-Depletion reduziert den zytoskelettal-gebundenen Dsg3-Proteingehalt

Nach TX-100-Proteinseparation wurde in HaCaT-Zellen eine Depletion von Dsg3 nach  $\alpha$ -Adducin-siRNA-Transfektion in der unlöslichen (zytoskelettalen) Fraktion und nicht in der löslichen (zytoskelettal-ungebundenen) Fraktion detektiert. Die Verteilung von DP bzw. GAPDH diente der Indikation der unlöslichen bzw. löslichen Fraktion ( $n=5$ , \*  $p<0,05$  im Vergleich zur n.t.-siRNA-Kontrolle) [mit der Genehmigung des *Journal of Biological Chemistry* verwendet und modifiziert nach Rötzer et al., 2014]. GAPDH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

Aus der Literatur ist bekannt, dass Desmosomen einem ständigen Umsatz unterworfen sind (Demlehner et al., 1995; Godsel et al., 2005; Windoffer et al., 2002) und dass Änderungen des Gleichgewichts zwischen Einbau und Abbau der desmosomalen Komponenten innerhalb der

Desmosomen mit zahlreichen Erkrankungen assoziiert sind (Desai et al., 2009; Kitajima, 2002; Nekrasova und Green, 2013). Die auf den siRNA-Interferenzstudien basierenden Daten geben Hinweise darauf, dass Adducin an der Regulierung des dynamischen Umsatzes von Dsg3 in Keratinozyten beteiligt ist. Um einen möglichen Mechanismus zu etablieren, wie Adducin den Dsg3-Gehalt in Keratinozyten reguliert, wurde zunächst die endosomale Internalisierung von Dsg3 nach Depletion von  $\alpha$ -Adducin untersucht (Abb. 12). Dazu wurden HaCaT-Zellen nach Transfektion mit Cy3-markierter n.t.-siRNA bzw.  $\alpha$ -Adducin-siRNA gegen Dsg3 und EEA-1 (engl. early endosome antigen-1), einem Marker für frühe Endosomen (Calkins et al., 2006; Delva et al., 2008), immungefärbt (Abb. 12a). Jedoch wurden bereits in n.t.-siRNA-transfizierten Zellen nur wenige Kollokalisationsereignisse zwischen Dsg3 und EEA-1 detektiert und es konnten nach Depletion von  $\alpha$ -Adducin keine Änderungen der Dsg3-Internalisierung ermittelt werden (Abb. 12b).

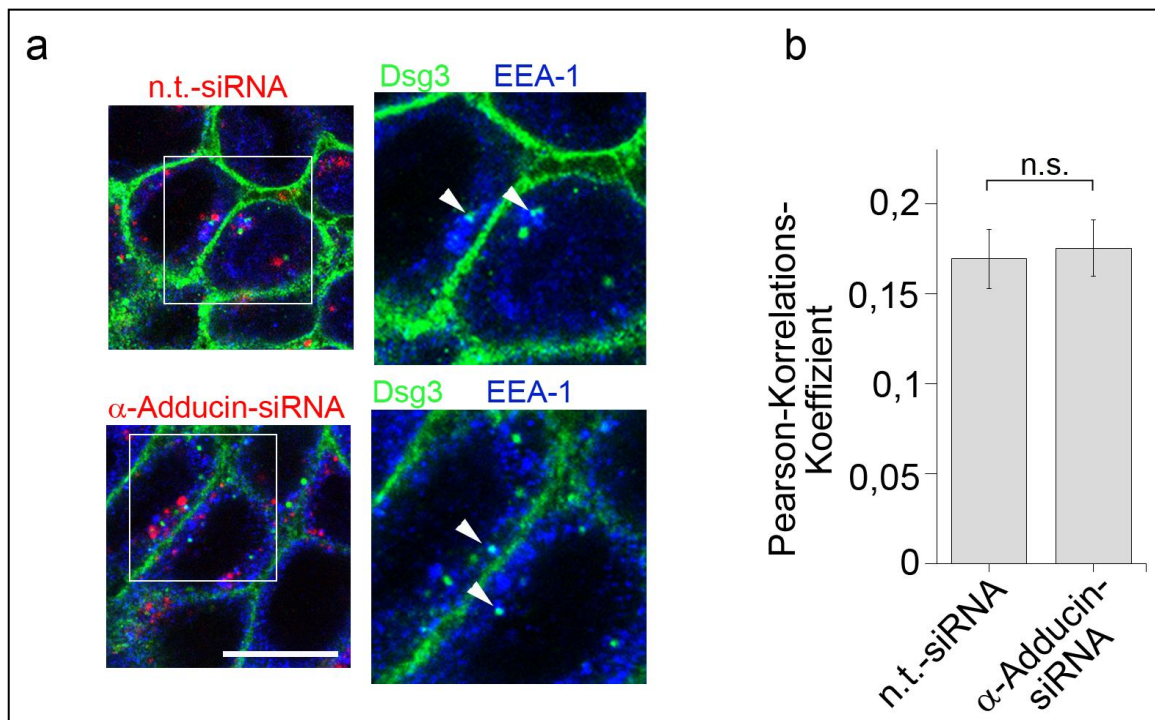


Abbildung 12: Endosomaler Abbau der Dsg3-Moleküle wird nicht durch Transfektion von  $\alpha$ -Adducin-siRNA moduliert

(a) In Immunfluoreszenzversuchen wurde die Kollokalisierung von Dsg3 (grün) und dem Marker für frühe Endosomen EEA-1 (blau) in Zellen nach Transfektion mit Cy3-markierter n.t.- oder  $\alpha$ -Adducin-siRNA (rot) detektiert (Pfeilköpfe, Maßstab: 20  $\mu$ m, hervorgehobene Zellareale: 1,8-fache Vergrößerung der angezeigten Bereiche, n=4). (b) Die Berechnung der Kollokalisierungsrate von immungefärbten Dsg3 und EEA-1 mittels des Pearson-Korrelationskoeffizienten ergab keinen Unterschied zwischen siRNA-induzierter  $\alpha$ -Adducin-Depletion im Vergleich zu n.t.-siRNA-Kontrollen (n=4, Anzahl der ausgewerteten Zellen  $\geq$ 21) [mit der Genehmigung des *Journal of Biological Chemistry* verwendet und modifiziert nach Rötzer et al., 2014]. n.s. = nicht signifikant

In einer Studie mit humanen Plattenepithelkarzinom-Zellen wurde gezeigt, dass die laterale Mobilität der Dsg3-Moleküle innerhalb der Membran wichtig für deren Inkorporation in Desmosomen sei (Sato et al., 2000). Um demzufolge eine mögliche Rolle von Adducin für den Einbau der Dsg3-Moleküle in die Membran zu untersuchen, wurden FRAP-Messungen durchgeführt (Abb. 13). Dabei handelt es sich um eine fluoreszenzbasierte Technik, mit der in lebenden Zellen dynamische Prozesse, wie die laterale Diffusion fluoreszenzmarkierter Proteine detektiert werden können. Die Zeit, die in der „Post-Bleaching“-Phase benötigt wird, um ausgebleichene Moleküle innerhalb einer ROI (engl. region of interest) durch neue Moleküle zu ersetzen, gibt Rückschlüsse auf die Dynamik der fluoreszierenden Proteine. Um die Dynamik der Dsg3-Moleküle an der Zellmembran zu messen, wurden HaCaT-Zellen sowohl mit fluoreszierendem GFP-Dsg3 als auch mit Cy3-markierter n.t.-siRNA bzw.  $\alpha$ -Adducin-siRNA transfiziert (Abb. 13a). Interessanterweise war das GFP-Dsg3-Signal in  $\alpha$ -Adducin-siRNA-depletierten Zellen bereits vor Beginn der Messung („Pre-Bleaching“-Phase) im Vergleich zu n.t.-siRNA-Kontrollen um ca.  $42 \pm 4\%$  reduziert (Abb. 13b). Weitergehend zeigten die Intensitätsmessungen über die Zeit („Post-Bleaching“-Phase), dass die Wiederherstellung des GFP-Dsg3-Signals in Bereichen, die mit einem Laser hoher Leistung gebleicht wurden, nach Depletion von  $\alpha$ -Adducin signifikant verzögert war (Abb. 13c und d). Zusammenfassend kann anhand dieser Daten festgehalten werden, dass die Regulierung der desmosomalen Dsg3-Proteinmengen zumindest partiell über Adducin erfolgte. In diesem Zusammenhang war Adducin nicht am endosomalen Abbau, sondern vielmehr an der Inkorporation und/oder der lateralen Mobilität der Dsg3-Moleküle innerhalb der Membran beteiligt. Dies legt nahe, dass Adducin wichtig für die Assemblierung und folglich für die Stabilisierung der Desmosomen ist.

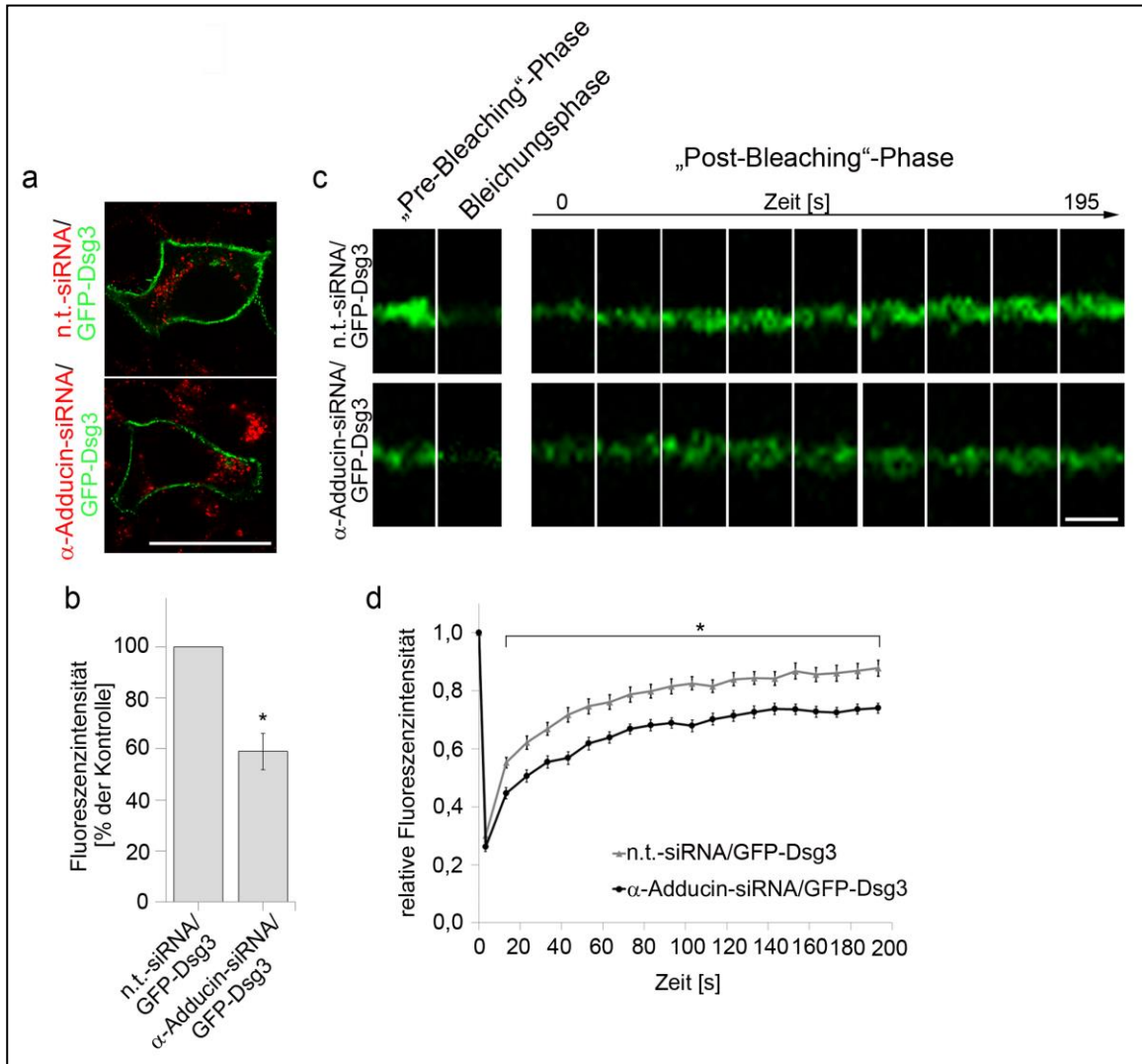


Abbildung 13: siRNA-induzierte  $\alpha$ -Adducin-Depletion reduziert die Mobilität der Dsg3-Moleküle in der Membran

(a) Repräsentative Bilder von Zellen, die für FRAP-Messungen sowohl mit GFP-Dsg3 (grün) als auch mit Cy3-markierter n.t.-siRNA bzw.  $\alpha$ -Adducin-siRNA (rot) transfiziert wurden (Maßstab: 20  $\mu$ m). (b) Messungen der Fluoreszenzintensität vor Beginn der FRAP-Messung zeigten, dass das GFP-Dsg3-Signal in  $\alpha$ -Adducin-siRNA-depletierten Zellen signifikant reduziert war (\*  $p < 0,05$  im Vergleich zu n.t.-siRNA). (c) Repräsentativer Verlauf der FRAP-Messung über die Zeit (Maßstab: 2,5  $\mu$ m). (d) Grafische Darstellung der relativen Fluoreszenzintensität von GFP-Dsg3 der FRAP-Messung. Intensitätsmessungen zeigten in der „Post-Bleaching“-Phase eine verzögerte Wiederherstellung des GFP-Dsg3-Signals nach siRNA-induzierter  $\alpha$ -Adducin-Depletion (\*  $p < 0,05$  im Vergleich zu n.t.-siRNA, Anzahl der gemessenen Zellen: 15, in jeder Zelle wurden  $\geq 5$  ROIs gemessen,  $n=3$ ) [mit der Genehmigung des *Journal of Biological Chemistry* verwendet und modifiziert nach Rötzer et al., 2014].

### 3.1.4 Einfluss von E-Cadherin auf die zelluläre Verteilung von Dsg3

Der Nachweis, dass E-Cadherin ebenfalls für die Assemblierung der Desmosomen benötigt wird (Lewis et al., 1994; Michels et al., 2009; Yin und Green, 2004) diente als Grundlage für weitere Experimente. Um die Effekte der siRNA-vermittelten Depletion von E-Cadherin auf die zelluläre Lokalisierung von Dsg3 zu untersuchen, wurden HaCaT-Zellen nach erfolgter siRNA-Transfektion zunächst gegen Dsg3 immungefärbt (Abb. 14a). In Zellen mit n.t.-siRNA-Transfektion kolokalisierte E-Cadherin teilweise mit Dsg3 am Zellkortex. In Zellen mit deutlicher E-Cadherin-Depletion war jedoch auch die Dsg3-Immunfärbung an der Zellmembran reduziert (Abb. 14a, Pfeile).

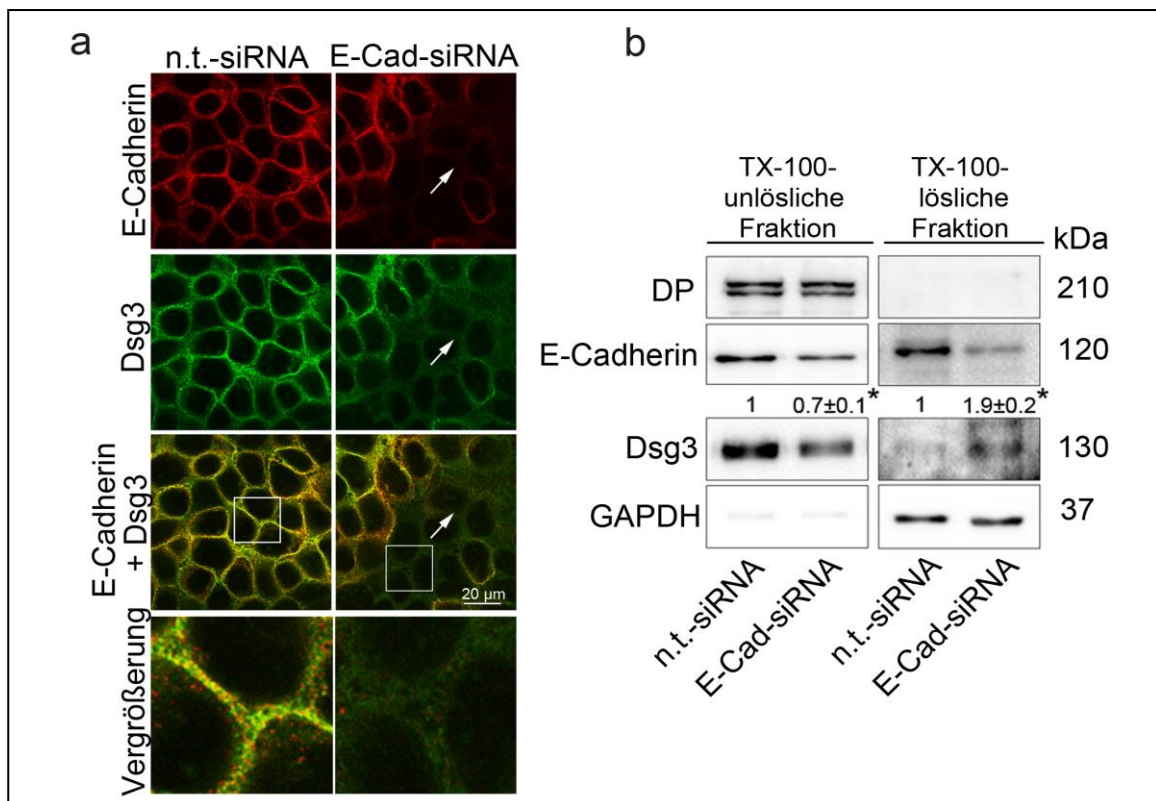


Abbildung 14: siRNA-induzierte E-Cadherin-Depletion reduziert die zytoskelettale Verankerung von Dsg3

(a) Darstellung der spezifischen Immunfärbung gegen E-Cadherin (rot) und Dsg3 (grün). In n.t.-siRNA-Kontrollen kolokalisierte E-Cadherin mit Dsg3 an der Zellmembran. Zellen mit effizienter siRNA-induzierter Depletion von E-Cadherin (Pfeile) wiesen eine reduzierte Dsg3-Immunfärbung am Zellkortex auf. (Maßstab: 20 µm, hervorgehobene Zellareale: 4-fache Vergrößerung der angezeigten Bereiche, n=4). (b) Repräsentativer Westernblot nach TX-100-Proteinauftrennung. Durch siRNA-induzierter E-Cadherin-Depletion wurde die Dsg3-Proteinmenge in der löslichen Fraktion signifikant erhöht und in der zytoskelettalen Fraktion reduziert (n=4, \* p<0,05 im Vergleich zu n.t.-siRNA-Kontrollen). GAPDH diente der Detektion der löslichen Fraktion, DP als Marker der unlöslichen Fraktion [mit der Genehmigung des Springer Verlages verwendet und modifiziert nach Rötzer et al., 2015]. E-Cad = E-Cadherin



Somit konnte eine Depletion von Dsg3 nach Unterdrückung der E-Cadherin-Expression zwar in Immunfluoreszenzuntersuchungen, jedoch nicht in der Westernblotanalyse nachgewiesen werden (Abb. 10b). Daher sollte im folgenden Schritt die Verteilung von Dsg3 nach TX-100-basierter Proteinfractionierung untersucht werden (Abb. 14b). Dabei zeigte sich, dass die siRNA-induzierte Depletion von E-Cadherin eine Reduktion der Dsg3-Proteinmengen innerhalb der zytoskelettalen, Triton-unlöslichen Fraktion im Vergleich zu n.t.-siRNA-Kontrollen verursachte. Im Gegensatz dazu wurden die Proteinmengen von Dsg3 innerhalb der löslichen TX-100-Fraktion nahezu verdoppelt. Diese Daten deuten an, dass E-Cadherin essentiell für die Verankerung von Dsg3 am Zytoskelett ist. Dabei verursachte die siRNA-vermittelte Depletion von E-Cadherin keine direkte Reduktion der Dsg3-Gesamtproteinmengen, sondern vielmehr eine Umverteilung der desmosomal-gebundenen Dsg3-Moleküle in die membranständige lösliche Fraktion.

Ausgehend von der partiellen Kolo-kalisierung von E-Cadherin und Dsg3, die ebenfalls durch eine andere Forschungsgruppe gezeigt wurde (Tsang et al., 2010), sollte im Weiteren untersucht werden, ob es eine direkte Interaktion zwischen E-Cadherin und Dsg3 gibt. Nach TX-100-Proteinfractionierung wurden sowohl E-Cadherin als auch Dsg3 in der TX-100-unlöslichen (TX-100-I) bzw. TX-100-löslichen (TX-100-S) Fraktion mittels Immunpräzipitation angereichert (Abb. 15). Die Komplexbildung zwischen E-Cadherin und Dsg3 konnte für beide Proteine in der TX-100-unlöslichen, jedoch nicht in der TX-100-löslichen Fraktion nachgewiesen werden (Abb. 15a). Als weitere Interaktionspartner von Dsg3 wurden p38MAPK und PG detektiert. Im Gegensatz dazu war E-Cadherin mit  $\beta$ -Catenin und PG, jedoch nicht mit p38MAPK assoziiert. Die korrekte Proteinauftrennung wurde durch Detektion von DP und GAPDH angezeigt.

Die Detektion einer Interaktion von E-Cadherin mit Dsg3, die ausschließlich in der zytoskelettalen Proteinfractionierung nachgewiesen wurde, legte eine Lokalisation dieses Komplexes innerhalb der interzellulären Junctionen nahe. Um zu untersuchen, ob die Interaktion von E-Cadherin und Dsg3 nun innerhalb der Adhärenskontakte oder der Desmosomen stattfand, wurden weitere Immunpräzipitationsversuche in den zytoskelettalen Proteinfractionierungen durchgeführt (Abb. 15b). Durch Immunpräzipitation von  $\beta$ -Catenin, einer Komponente der Adhärenskontakte, konnte der Komplex zwischen E-Cadherin und Dsg3 nachgewiesen werden. Mit diesem Komplex waren ebenfalls Src und PG assoziiert. Untersuchte man die Anreicherung des desmosomalen Plaqueproteins DP, so konnten die Interaktionspartner Dsg3, p38MAPK und PG identifiziert werden. Es wurde jedoch keine Assoziation von E-Cadherin mit diesem Komplex detektiert.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass ein Komplex zwischen E-Cadherin, Dsg3, Src und PG detektiert wurde, der zwar junktional, jedoch außerhalb der Desmosomen lokalisiert war.

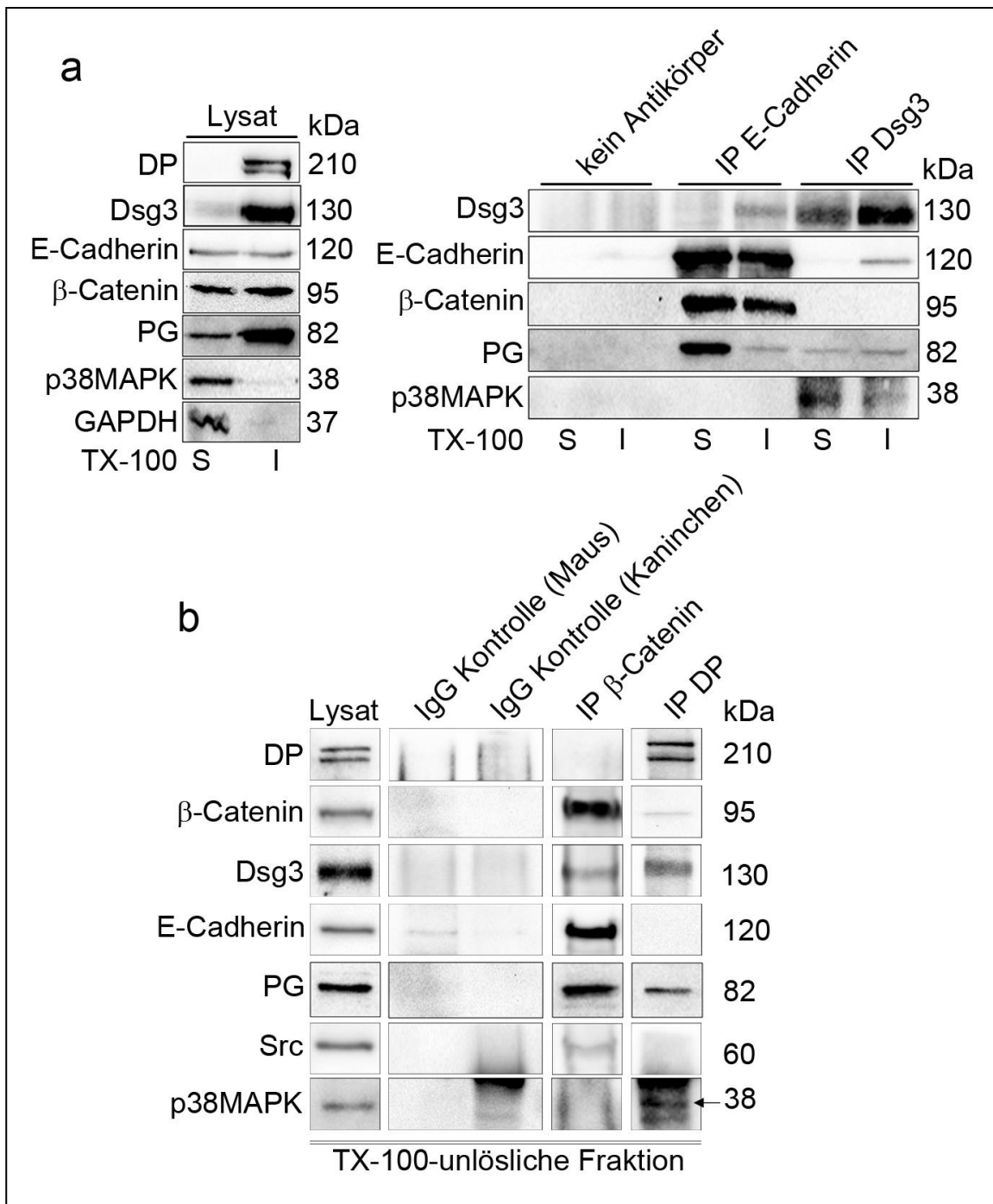


Abbildung 15: E-Cadherin interagiert mit Zytoskelett-gebundenem Dsg3

Repräsentative Westernblots nach Durchführung von Immunpräzipitationversuchen. (a) Die Proteinanreicherung nach TX-100-vermittelter Proteinfractionierung zeigte eine Komplexbildung zwischen E-Cadherin und Dsg3 in der zytoskelettalen Fraktion. p38MAPK und PG waren in beiden Fraktionen an Dsg3 gebunden. Als weitere Interaktionspartner von E-Cadherin wurden  $\beta$ -Catenin und PG detektiert (n=3). Detektion von DP und GAPDH diente der Identifikation der unlöslichen (TX-100-I, engl. insoluble) bzw.

löslichen (TX-100-S, engl. soluble) Fraktion. (b). In der zytoskelettalen Proteinfraction wurde der Komplex zwischen E-Cadherin und Dsg3 nach Immunpräzipitation von  $\beta$ -Catenin und nicht von DP detektiert. Weitere Bindungspartner von  $\beta$ -Catenin waren PG und Src (n=4) [mit der Genehmigung des Springer Verlages verwendet und modifiziert nach Rötzer et al., 2015].

#### **3.1.5 Abhängigkeit der Regulierung der desmosomalen Assemblierung von Src**

Nach Identifikation der junctionalen, extradesmosomalen Interaktion zwischen Dsg3, E-Cadherin und Src sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob die Ausbildung dieses Komplexes durch Src reguliert wurde. Um die Aktivität von Src zu modulieren, wurde der spezifische Src-Inhibitor pp2 eingesetzt. Nach Detektion einer Kolo-kalisierung von Dsg3 und Src entlang der Zellmembran in Immunfluoreszenzstudien (Abb. 16a) wurden die Effekte der pp2-induzierten Src-Inhibierung auf den extradesmosomalen Komplex zwischen Dsg3 und E-Cadherin untersucht. Es zeigte sich in Immunpräzipitationsexperimenten innerhalb der zytoskelettalen Proteinfraction, dass die Inkubation von pp2 für 2 h zu einer verminderten Bindung von Dsg3 an  $\beta$ -Catenin und E-Cadherin führte (Abb. 16b). Da Src eine Tyrosinkinase ist (Roskoski, 2004; Thomas und Brugge, 1997), wurde im Folgeschritt untersucht, ob Dsg3 und E-Cadherin durch Src phosphoryliert werden. Dazu wurden Proteine innerhalb der zytoskelettalen Fraktion angereichert, die an Tyrosinresten phosphoryliert waren (Abb. 16c). Hierbei wiesen HaCaT-Zellen nach Behandlung mit pp2 für 2 h im Vergleich zur Kontrollbehandlung reduzierte Spiegel an Tyrosin-phosphoryliertem Dsg3, E-Cadherin und PG auf. Da die Menge an Tyrosin-phosphoryliertem DP unverändert blieb, konnte der Nachweis erbracht werden, dass die Proteine Dsg3, E-Cadherin und PG spezifisch durch Src phosphoryliert wurden. Die Detektion von pEGFR (Y845) diente in diesem Ansatz als Positivkontrolle für die erfolgreiche Immunpräzipitation von Tyrosin-phosphorylierten Proteinen.

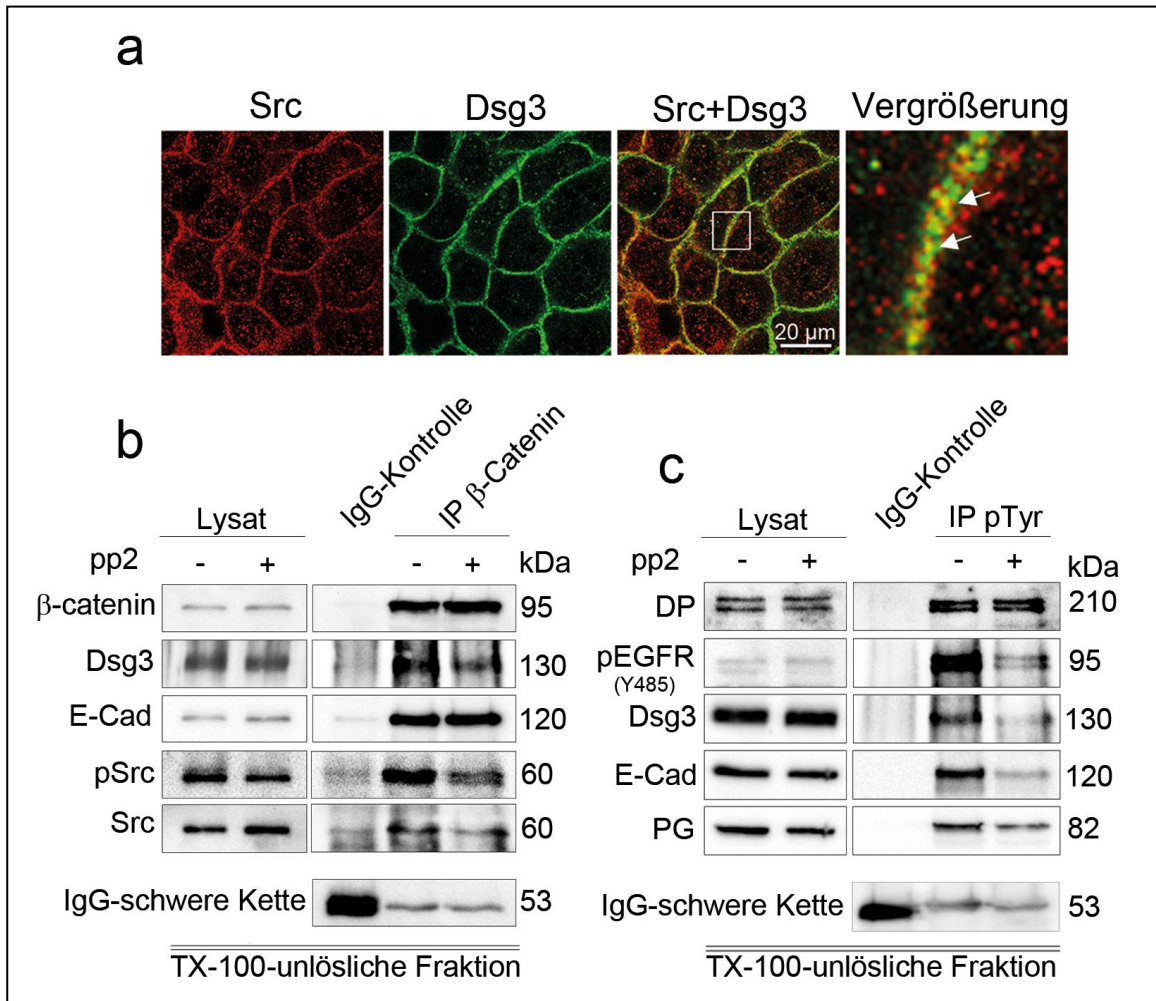


Abbildung 16: Src reguliert die Komplexbildung zwischen E-Cadherin und Dsg3

(a) Immunfärbungen gegen Src (rot) und Dsg3 (grün) zeigten eine partielle Kolokalisierung entlang der Zellmembran (Pfeile, Maßstab: 20  $\mu$ m, hervorgehobene Zellareale: 6-fache Vergrößerung der angezeigten Bereiche, n=4). (b) Nach Immunpräzipitation von  $\beta$ -Catenin in der zytoskelettalen Fraktion führte die Inhibition von Src durch pp2-Inkubation für 2 h zu einer reduzierten Assoziation von Dsg3 mit E-Cadherin und Src (n=4). (c) Immunpräzipitationsversuche innerhalb der zytoskelettalen Proteinfraction zeigten reduzierte Spiegel an Tyrosin-phosphoryliertem Dsg3, E-Cadherin und PG nach Applikation von pp2 für 2 h. Die Mengen an Tyrosin-phosphoryliertem DP blieben unverändert. Die Detektion von pEGFR (Y845) diente als Positivkontrolle (n=3) [mit der Genehmigung des Springer Verlages verwendet und modifiziert nach Rötzer et al., 2015]. Tyr = Tyrosin, EGFR = engl. epidermal growth factor receptor

Somit wurde gezeigt, dass die Stabilität des extradesmosomalen Komplexes zwischen Dsg3 und E-Cadherin abhängig von der Aktivität der Src-Kinase war. Zusammen mit dem Nachweis, dass der siRNA-vermittelte Funktionsverlust von E-Cadherin zu einer verminderten zytoskelettalen Verankerung von Dsg3 führte, sollte im Folgenden die Rolle von Src bei der Assemblierung der Desmosomen untersucht werden.

In kultivierten Keratinozyten können Vorgänge des Auf- und Abbaus von Zellkontakten durch Veränderungen der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in sogenannten  $\text{Ca}^{2+}$ -Wechsel-Experimenten (engl.  $\text{Ca}^{2+}$  switch) moduliert werden (Hennings und Holbrook, 1983; O'Keefe et al., 1987). Um die Disassemblierung der Desmosomen zu induzieren, wurden HaCaT-Zellen zunächst für 1 h extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch Inkubation mit Medium, das 5 mM EGTA enthielt, entzogen ( $\text{Ca}^{2+}$ -Depletion). Die anschließende  $\text{Ca}^{2+}$ -Repletion, d.h. die Inkubation von Medium mit 1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$  für weitere 5 h, führte zur Wiederherstellung der Zellkontakte. Zellen, die konstant in Medium mit 1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$  kultiviert wurden, dienten als Kontrollen. DMSO als Lösungsmittel für pp2 wurde als Kontrollbehandlung verwendet. Nach Immunfärbung gegen Dsg3 konnte für DMSO-behandelte HaCaT-Zellen gezeigt werden, dass die membranständige Dsg3-Färbung der Kontrollen durch eine einstündige Depletion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen reduziert wurde. Im Gegensatz dazu führte die anschließende  $\text{Ca}^{2+}$ -Repletion für 5 h zur vollständigen Wiederherstellung der Dsg3-Färbung an der Zellmembran (Abb. 17a, obere Reihe). Weiterführend konnten keine Effekte der pp2-Inkubation für 2 h auf Zellen, die entweder unter physiologischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration oder für 1 h einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Entzug erfuhren, detektiert werden. Nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Repletion war die Färbung von Dsg3 in Zellen, die gleichzeitig mit pp2 behandelt wurden, im Vergleich zu DMSO-behandelten Kontrollen aufgelockert und fragmentiert (Abb. 17a, untere Reihe, Pfeile). Damit einhergehend zeigte die Analyse der Dsg3-Proteinverteilung nach TX-100-vermittelter Fraktionierung, dass die Verschiebung der Dsg3-Moleküle von der löslichen in die unlösliche TX-100-Fraktion während der  $\text{Ca}^{2+}$ -Repletion durch parallele Inhibierung von Src behindert wurde. Im Vergleich zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Repletion ohne pp2-Behandlung führte die Inkubation von pp2 für 2 h zu reduzierten zytoskelettalen Dsg3-Proteinmengen und zu einer signifikanten Erhöhung in der löslichen Fraktion (Abb. 17b). Zusammengefasst legen diese Ergebnisse eine essentielle Bedeutung der Src-Aktivität für die Assemblierung der Desmosomen nahe.

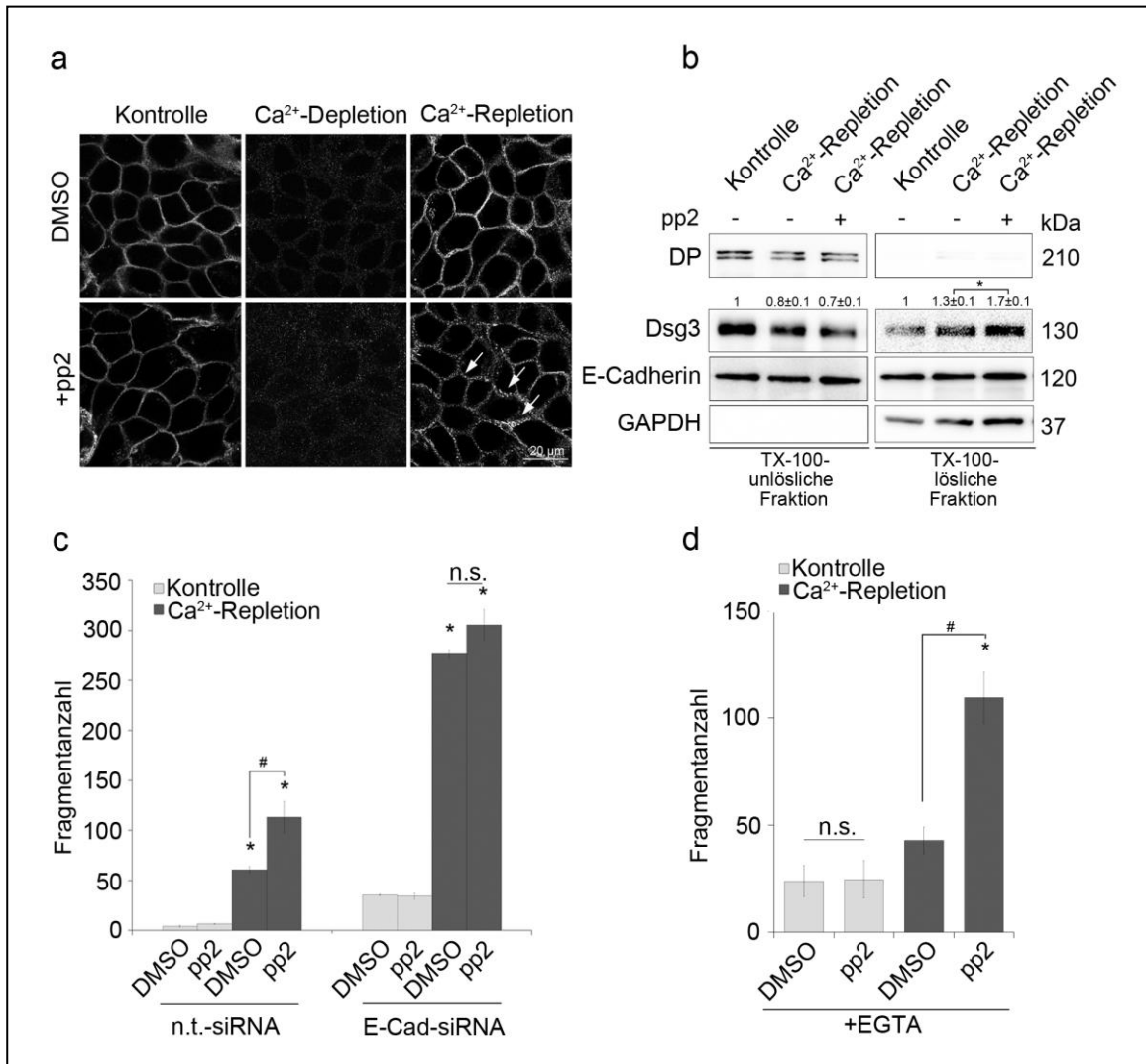


Abbildung 17: Src-Aktivität ist für die Verankerung von Dsg3 am Zytoskelett notwendig

(a) Detektion der Immunfärbung gegen Dsg3 nach Ca<sup>2+</sup>-Wechsel-Experimenten. Kontrollen (konstante Ca<sup>2+</sup>-Zufuhr) wiesen nach pp2-Inkubation keine Veränderung des membranständigen Dsg3 im Vergleich zu Kontrollen nach DMSO-Inkubation auf. pp2-vermittelte Src-Inhibierung verursachte in Zellen nach Ca<sup>2+</sup>-Repletion eine Fragmentierung der Dsg3-Färbung entlang der Zellmembran (Pfeile). Immungefärbtes Dsg3 war nach Ca<sup>2+</sup>-Depletion nicht detektierbar (Maßstab: 20 µm, n=4). (b) Nach TX-100-Proteinfractionierung wurden für die Kombination von Ca<sup>2+</sup>-Repletion und pp2-Inkubation reduzierte Dsg3-Proteinmengen innerhalb der unlöslichen Fraktion und signifikant erhöhte Dsg3-Spiegel innerhalb der löslichen Fraktion detektiert (n=4; \* p<0,05 im Vergleich zu DMSO-behandelten Kontrollen nach Ca<sup>2+</sup>-Repletion der löslichen bzw. unlöslichen Fraktion). (c) Darstellung der Mittelwerte der Dispase-basierten Dissoziationsversuche nach Ca<sup>2+</sup>-Wechsel-Experimenten. Nach Ca<sup>2+</sup>-Repletion führte die simultane pp2-Inkubation in n.t.-siRNA-Kontrollen zu erhöhten Fragmentzahlen. Unter diesen Bedingungen hatte die Inhibierung von Src jedoch keinen weiteren Effekt auf mit E-Cadherin-siRNA-transfizierte Zellen (n=10, \* p<0,05 gegenüber der entsprechenden DMSO-Kontrolle, # p<0,05 gegenüber der entsprechenden Kontrolle nach pp2-Behandlung). (d) Dissoziationsversuche zeigten, dass HaCaT-Zellen während der Ausbildung von

Desmosomen durch pp2-vermittelte Src-Inhibierung an der Erlangung eines hyperadhäsiven Status signifikant behindert wurden (n=12; \* p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle unter konstanter Ca<sup>2+</sup>-Zugabe; # p<0,05 im Vergleich zu DMSO-Kontrollen) [mit der Genehmigung des Springer Verlages verwendet und modifiziert nach Rötzer et al., 2015].

Um eine mögliche Rolle von E-Cadherin in der Src-abhängigen Assemblierung von Dsg3 zu etablieren, wurde die siRNA-vermittelte Depletion von E-Cadherin mit Ca<sup>2+</sup>-Wechsel-Experimenten kombiniert und die interzelluläre Haftung der HaCaT-Zellen unter diesen Konditionen untersucht (Abb. 17c). Auffällig war, dass die Anzahl der Fragmente von n.t.-siRNA-transfizierten Zellen nach Ca<sup>2+</sup>-Repletion immer noch erhöht war, obwohl in Immunfluoreszenzversuchen die vollständige Wiederherstellung der membranständigen Dsg3-Färbung gezeigt wurde (Abb. 17a). Die Fragmentzahlen der n.t.-siRNA-transfizierten Zellen, die in Medium mit physiologischen Ca<sup>2+</sup>-Gehalt kultiviert wurden, wurden durch simultane Inkubation mit pp2 nicht verändert. Allerdings verdoppelte sich in diesen Zellen die Anzahl der Fragmente nahezu durch Kombination der Ca<sup>2+</sup>-Repletion und der Inhibierung von Src im Vergleich zu entsprechenden DMSO-behandelten Kontrollen (113 ± 16 Fragmente im Vergleich zu 61 ± 1). Dass pp2 einen drastischen Haftungsverlust nach Ca<sup>2+</sup>-Repletion induzierte, stand im Einklang mit dem Befund des verminderten Einbaus von Dsg3 in die Desmosomen unter diesen Konditionen. Die siRNA-vermittelte Stilllegung von E-Cadherin verursachte höhere Fragmentzahlen, die nicht durch Inkubation von pp2 für 2 h erhöht wurden im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen (34 ± 3 Fragmente im Vergleich zu 36 ± 1). Jedoch wurde unter Ca<sup>2+</sup>-Repletion der Effekt von pp2 abgeschwächt. Es wurde gezeigt, dass sich die Anzahl der Fragmente nicht signifikant von denen der entsprechenden DMSO-Kontrollen unterschied (276 ± 4 gegenüber 306 ± 16 Fragmente je Reaktionsansatz).

Während der Reifung von Zellkontakten unterziehen sich Desmosomen einem Prozess, in dem sie letztendlich einen sogenannten hyperadhäsiven Zustand einnehmen, d.h. die Zellen können dem Entzug extrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Ionen standhalten und sind nach wie vor adhäsiv (Garrod und Kimura, 2008). Im folgenden Schritt sollte die Rolle von Src im Hinblick auf die Hyperadhäsivität der HaCaT-Zellen untersucht werden (Abb. 17d). Dafür wurden HaCaT-Zellen, die entweder unter konstanter Ca<sup>2+</sup>-Zufuhr gehalten wurden oder einen Ca<sup>2+</sup>-Entzug erfuhren, durch Dispase-Inkubation vom Boden der Reaktionsgefäße gelöst. Anschließend wurden die Zellrasen für weitere 2 h in HbSS mit 5 mM EGTA inkubiert und einem definierten mechanischen Scherstress ausgesetzt (Garrod, 2013). In Kontrollzellen (konstante Ca<sup>2+</sup>-Zufuhr) konnte keine Veränderung der Zell-Zell-Haftung nach pp2-vermittelter Src-Inhibierung im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen detektiert werden (24

$\pm 7$  gegenüber  $25 \pm 9$  Fragmente je Reaktionsansatz). Im Gegensatz dazu induzierte die parallele pp2-Inkubation unter Konditionen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Repletion einen signifikanten interzellulären Haftungsverlust im Vergleich zu den entsprechenden DMSO-behandelten Kontrollen ( $109 \pm 12$  gegenüber  $43 \pm 6$  Fragmente je Reaktionsansatz).

Zusammengenommen konnte gezeigt werden, dass Src in Abhängigkeit von E-Cadherin die Assemblierung von Dsg3 in den Desmosomen sowie die Zellkohäsion regulierte. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Erlangung eines  $\text{Ca}^{2+}$ -unempfindlichen Zustands im Reifungsprozess der Zellkontakte durch die Inhibition von Src behindert wurde.

#### **3.1.6 Einfluss von Cortactin auf die Dsg3-vermittelte interzelluläre Haftung**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde neben Adducin ebenfalls die Funktion von Cortactin, einem weiteren Actin-Bindeprotein, für die Zell-Zell-Haftung von HaCaT-Zellen analysiert. Erste Experimente zeigten, dass die siRNA-induzierte Depletion von Cortactin die interzelluläre Haftung signifikant reduzierte (Abb. 18a). In Dispase-vermittelten Dissoziationsversuchen stieg die Fragmentanzahl nach Transfektion von Cortactin-siRNA auf  $24 \pm 1$  im Vergleich zu  $3 \pm 1$  Fragmenten der n.t.-siRNA-transfizierten Zellen. Die effektive Depletion von Cortactin durch siRNA-Interferenz wurde in der Westernblotanalyse nachgewiesen (Abb. 18b).

Vergleichbare Ergebnisse wurden mit primären Keratinozyten aus Cortactin-defizienten Mäusen ( $\text{CTTN}^{-/-}$ ) erzielt. Die Genotypen der Tiere wurden mittels PCR-Amplifikation nachgewiesen (Abb. 18c). Zur Untersuchung der Zell-Zell-Haftung wurden primäre Keratinozyten (MEKs) aus der Epidermis neonataler Mäuse isoliert und bis zu einer Konfluenz von 90% kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h in Medium mit  $1,8 \text{ mM Ca}^{2+}$  gehalten und dann in Dispase-basierten Dissoziationsversuchen analysiert (Abb. 18d). Im Vergleich zu murinen Wildtyp-Zellen induzierte der Cortactin-Verlust einen signifikanten Zell-Zell-Haftungsverlust (Fragmentanzahl der  $\text{CTTN}^{-/-}$ -Zellen:  $9 \pm 2$  im Vergleich zu Wildtyp-Zellen:  $2 \pm 1$ ).



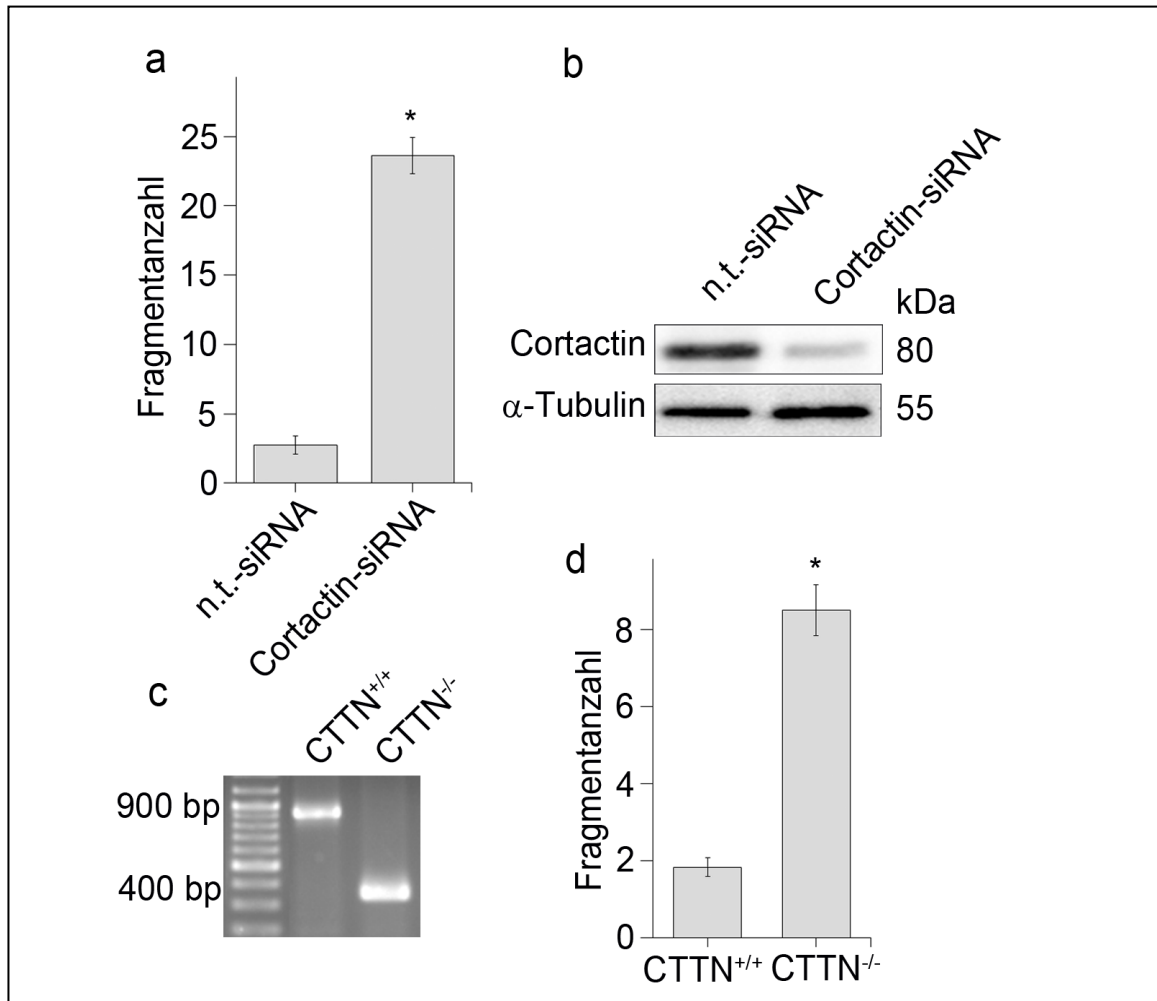


Abbildung 18: Cortactin-Defizienz verursacht einen interzellulären Haftungsverlust

(a) Darstellung der Fragmentzahlen der Dispase-basierten Dissoziationsversuche in HaCaT-Zellen nach siRNA-vermittelter Depletion von Cortactin. Die Transfektion der Cortactin-siRNA induzierte einen signifikanten Zell-Zell-Haftungsverlust ( $n=7$ , \*  $p<0,05$  im Vergleich zu n.t.-siRNA-Kontrollen). (b) Repräsentative Darstellung der effektiven siRNA-vermittelten Depletion von Cortactin mittels Westernblotanalyse ( $n=3$ ). (c) PCR-Analyse zur Genotypisierung einer Wildtyp-Maus (CTTN<sup>+/+</sup>) und einer Cortactin-defizienten Maus (CTTN<sup>-/-</sup>). (d) Darstellung der Fragmentzahlen von Dispase-basierten Dissoziationsversuchen in murinen primären Keratinozyten (MEKs). Der komplette Verlust von Cortactin führte zu signifikant erhöhten Fragmentzahlen ( $n=8$ , \*  $p<0,05$  im Vergleich zu Wildtyp-MEKs). CTTN = Bezeichnung des Cortactin-Gens

Ausgehend von der reduzierten interzellulären Haftung nach siRNA-vermittelter Cortactin-Depletion sollte in HaCaT-Zellen getestet werden, ob Cortactin mit Komponenten der Desmosomen assoziiert war. Dafür wurde zum einen in sogenannten Proximity-Ligation-Assay (PLA)-Studien die räumliche Nähe zwischen Cortactin- und Dsg3-Molekülen untersucht. Die PLA-Methode basiert auf der Verstärkung von Fluoreszenzsignalen, die nur entstehen, wenn sich die

zwei zu detektierenden Moleküle in unmittelbarer Nähe zueinander (Abstand <40 nm) befinden. In HaCaT-Zellen konnten mit dieser Methode positive Signale, d.h. eine enge räumliche Nähe zwischen Cortactin und Dsg3, detektiert werden (Abb. 19a). Interessanterweise zeigten XZ-Schnitte, dass die positiven Signale vorwiegend an der Zelloberfläche der Keratinozyten lokalisiert waren (untere Abbildung, rote Pfeile). Kontrollen, die nur gegen einen der Antikörper gefärbt wurden, wiesen keine unspezifischen Signale auf. Bestätigend wurde nach Immunpräzipitation von Dsg3 eine direkte Interaktion mit Cortactin detektiert (Abb. 19b). Auffallend hierbei war, dass Cortactin lediglich in der TX-100-löslichen und nicht in der TX-100-unlöslichen Fraktion an Dsg3 assoziiert vorlag.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse eine wichtige Funktion von Cortactin in der Zell-Zell-Haftung von Keratinozyten. Basierend auf zwei unterschiedlichen molekularbiologischen Methoden wurde eine direkte Interaktion zwischen Dsg3 und Cortactin nachgewiesen.

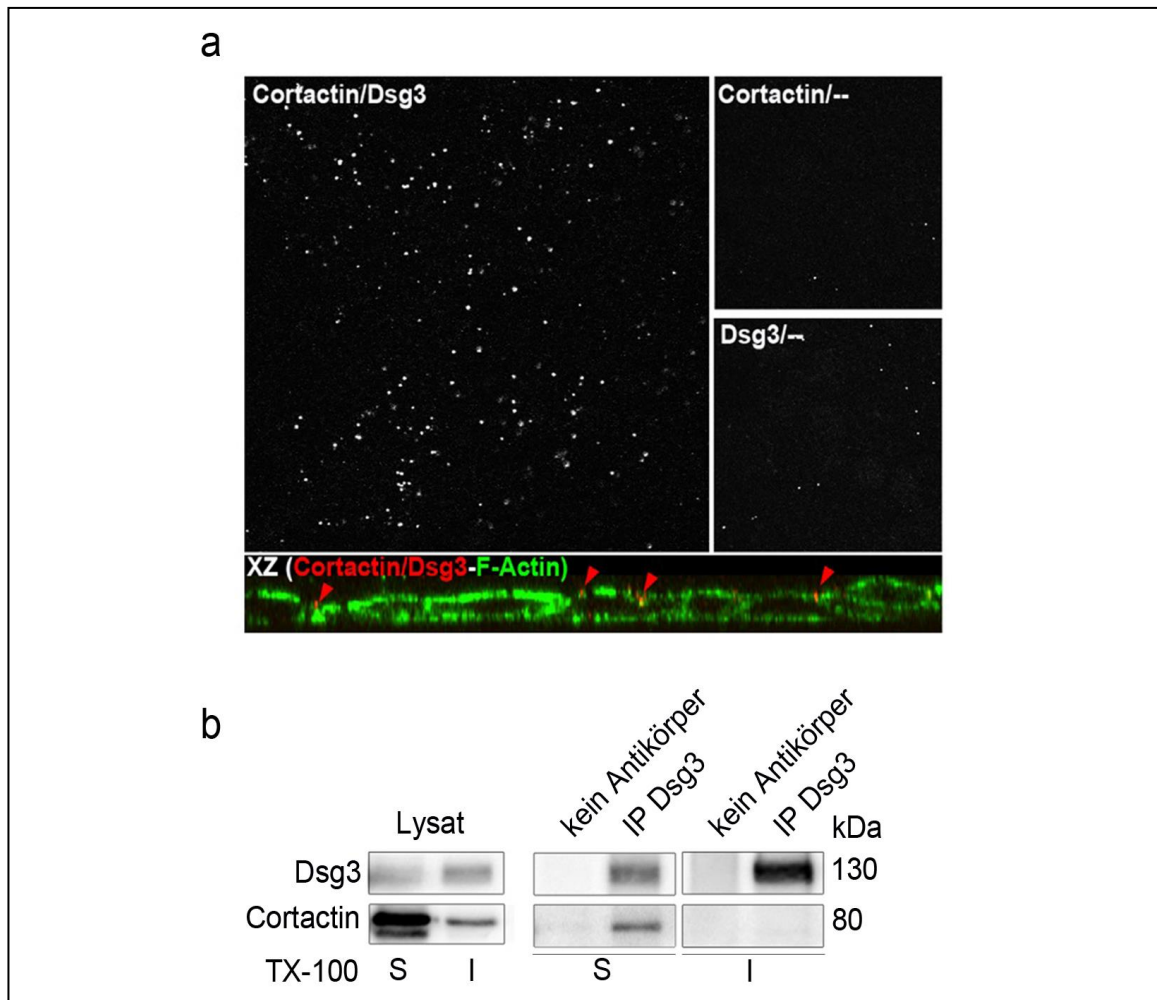


Abbildung 19: Cortactin liegt als Komplex mit Dsg3 in HaCaT-Zellen vor

Detektion der Interaktion zwischen Cortactin und Dsg3 mittels PLA- und Immunpräzipitationsexperimenten.

(a) In PLA-Untersuchungen wurden positive Signale detektiert, die eine enge räumliche Nähe zwischen

Cortactin und Dsg3 anzeigten. Diese Konjugate waren vorwiegend an der Zelloberfläche der HaCaT-Zellen lokalisiert (rote Pfeile in der XZ-Darstellung). Die Kontrollen, die nur mit einem Primärantikörper behandelt wurden, zeigten keine unspezifischen Signale (n=3). (b) Immunpräzipitation von Dsg3 nach TX-100-Proteinseparation zeigte eine Komplexbildung zwischen Dsg3 und Cortactin in der TX-100-löslichen (S) Fraktion. In der TX-100-unlöslichen (I) Fraktion wurde keine Interaktion mit Cortactin detektiert (n=2).

### **3.2 Mechanismen des desmosomalen Abbaus am Beispiel Pemphigus**

Die Bedeutung der desmosomalen Haftung spiegelt sich in vererbaren oder autoimmunen Erkrankungen wider, die mit dem Funktionsverlust der Desmosomen in Verbindung gesetzt werden. Pemphigus vulgaris zählt als autoimmune Hautdermatose zu diesen Erkrankungen und wird durch Bindung von Autoantikörpern an die desmosomalen Cadherine Dsg1 und Dsg3 verursacht. Seit vielen Jahren dient PV als etablierte Modellerkrankung für die *in vitro*-Erforschung desmosomaler Adhäsionsveränderungen. Hierbei nutzt man PV-IgGs, die aus Patientenseren isoliert werden (Amagai und Stanley, 2012). Die Bindung der PV-IgGs verursacht einen Verlust epithelialer Zell-Zell-Haftung, eine Depletion von Dsg3 innerhalb und außerhalb der Desmosomen und eine Aktivierung zahlreicher Signalwege (Müller et al., 2008; Sharma et al., 2007; Waschke, 2008).

#### **3.2.1 Bedeutung von Adducin bei der durch PV-Autoantikörper verursachten Destabilisierung der Desmosomen**

In den bisherigen Studien der vorliegenden Arbeit wurde für  $\alpha$ -Adducin eine essentielle Rolle in der Aufrechterhaltung der Desmosomen nachgewiesen, indem gezeigt wurde, dass der Funktionsverlust von  $\alpha$ -Adducin in HaCaT-Zellen mit dem verminderten Einbau von Dsg3 in die Desmosomen korreliert. Um die Funktion von  $\alpha$ -Adducin im Zusammenhang mit den pathogenen Effekten der PV-IgGs zu untersuchen, wurden HaCaT-Zellen mit diesen inkubiert und anschließend sowohl die Verteilung von  $\alpha$ -Adducin innerhalb der Zelle als auch dessen Phosphorylierungsgrad untersucht. Die Färbung gegen  $\alpha$ -Adducin entlang des Zellkortex wies nach 24 h PV-IgG-Applikation eine starke Fragmentierung auf (Abb. 20a). Diese trat, obwohl  $\alpha$ -Adducin noch mit F-Actin assoziiert war, überwiegend an Stellen mit interzellulärer Lückenbildung (Abb 20a, Pfeile) auf. Des Weiteren zeigte sich, dass PV-IgGs die Phosphorylierung von  $\alpha$ -Adducin an Serin726, einer der Hauptphosphorylierungsstellen am C-Terminus von Adducin (Matsuoka et al., 2000), induzierten (Abb. 20b). Dazu wurden konfluente HaCaT-Zellen in einer Zeitspanne von 5 min bis 24 h mit PV-IgG (mittlere Reihe) bzw. mit AK23 (untere Reihe), einem pathogenen monoklonalen Antikörper aus einem Pemphigus Mausmodell (Tsunoda et al., 2003) oder mit Kontroll-IgGs von

einem gesunden Freiwilligen behandelt (obere Reihe). In der Westernblotanalyse wurde keine Veränderung der  $\alpha$ -Adducin-Gesamtproteinmengen detektiert. Im Gegensatz dazu konnte, im Vergleich zu Kontroll-IgGs, ein signifikanter Anstieg der  $\alpha$ -Adducin-Phosphorylierung nach 10 min sowohl durch PV-IgG auf  $171 \pm 12\%$  bzw. durch AK23 auf  $185 \pm 17\%$  gemessen werden. Die Phosphorylierung von  $\alpha$ -Adducin blieb zwar in einzelnen Versuchen bis 6 h bei PV-IgG- und bis 24 h bei AK23-Applikation nachweisbar, erreichte aber aufgrund der Variabilität der Ergebnisse zu späteren Zeitpunkten keine statistische Signifikanz.

Um die Bedeutung der schnellen Phosphorylierung von  $\alpha$ -Adducin nach Behandlung mit PV-IgG zu analysieren, sollte im nächsten Schritt die Rolle der Rho-GTPasen in diesem Zusammenhang untersucht werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass Mitglieder der Rho-GTPasen sowohl mit der Signaltransduktion nach Bindung von PV-IgG an ihre Zielantigene als auch mit der Induktion der Adducin-Phosphorylierung assoziiert sind (Matsuoka et al., 2000; Spindler und Waschke, 2011). Ferner wurde in humanen Keratinozyten gezeigt, dass die pharmakologische Aktivierung der Rho-GTPasen nicht nur den Zell-Zell-Haftungsverlust sondern auch die Fragmentierung des kortikalen Actin-Zytoskeletts nach PV-IgG-Inkubation verhinderte (Gliem et al., 2010; Spindler et al., 2007; Waschke et al., 2006). Für die Aktivierung der Rho-GTPasen standen die Bakterientoxine CNF-1 (Aktivierung von RhoA, Rac1 und Cdc42) und CNF $\gamma$  (spezifische Aktivierung von RhoA) zur Verfügung. Wie PV-IgG und AK23, induzierte auch die Behandlung mit CNF-1 und CNF $\gamma$  eine schnelle Phosphorylierung von  $\alpha$ -Adducin nach 10 min (Abb. 20c). Zusammen mit den reduzierten Phosphorylierungsspiegeln nach Inkubation mit dem Rho-Kinase Inhibitor  $\gamma$ 27632 deuten die Daten an, dass  $\alpha$ -Adducin in Abhängigkeit von RhoA phosphoryliert wurde. In ELISA-basierten Aktivitätsmessungen wurde anschließend untersucht, ob die PV-IgG-induzierte Phosphorylierung von  $\alpha$ -Adducin über die Aktivierung von RhoA erfolgte (Abb. 20d). Jedoch reduzierte die 10 minütige Inkubation von PV-IgG bzw. AK23 in HaCaT-Zellen, wie bereits für die 2 h PV-IgG-Behandlung gezeigt (Waschke et al., 2006), die Aktivität von RhoA.

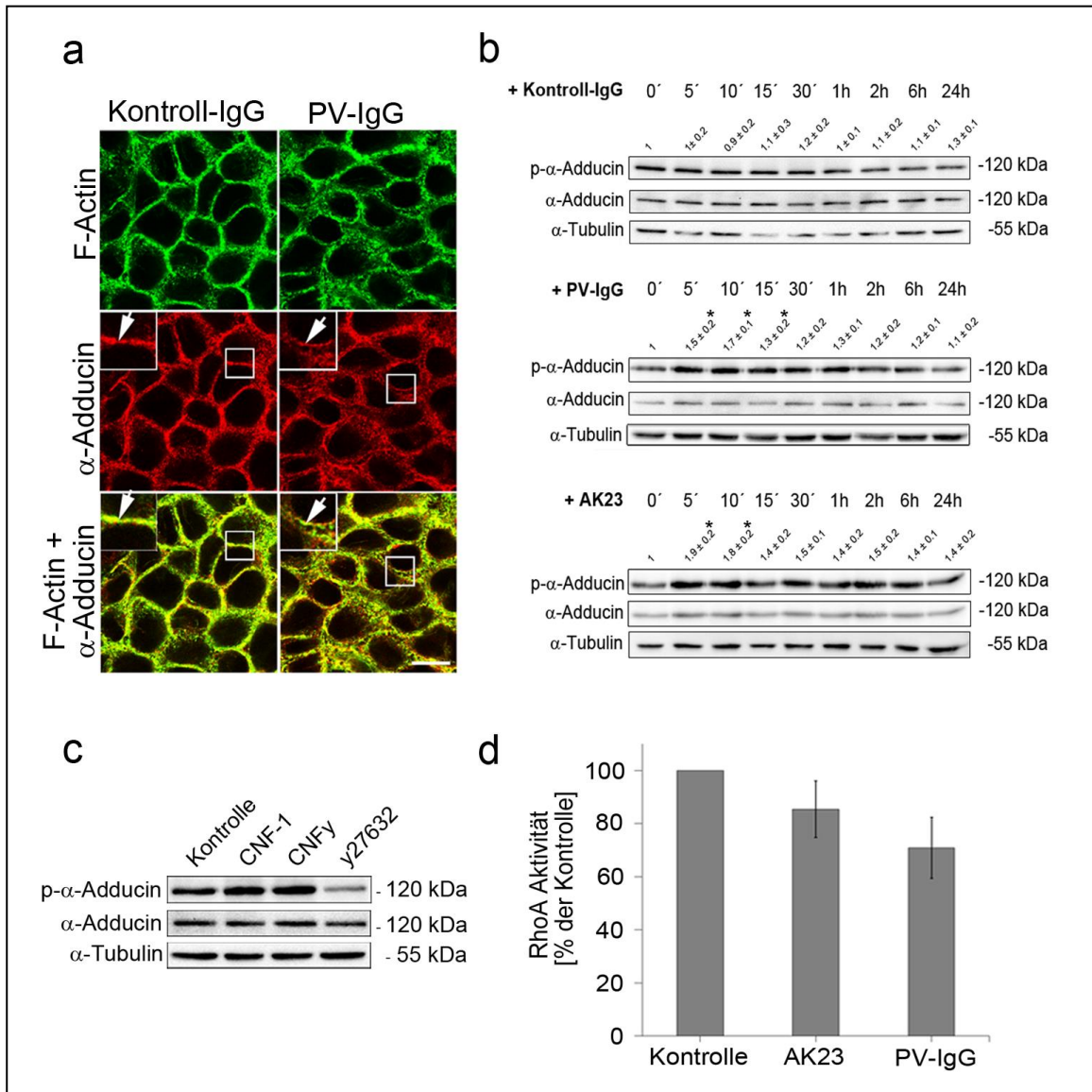


Abbildung 20: Effekte von PV-Antikörpern auf die Verteilung und Phosphorylierung von  $\alpha$ -Adducin sowie die Aktivität von RhoA

(a) In Immunfluoreszenzversuchen verursachte die Inkubation von PV-IgG für 24 h eine starke Fragmentierung sowie einen Verlust der Färbung von  $\alpha$ -Adducin (rot) und F-Actin (grün) entlang der Zellmembran (Pfeile, Maßstab: 20  $\mu$ m, hervorgehobene Zellareale: 2-fache Vergrößerung der angezeigten Bereiche, n=5). (b) Repräsentativer Westernblot zur Detektion der Phosphorylierung von  $\alpha$ -Adducin an Serin726 nach Inkubation mit AK23 und PV-IgG. Zeitreihenversuche zeigten eine signifikante Erhöhung der Phosphorylierungslevel von  $\alpha$ -Adducin nach AK23- und PV-IgG-Gabe innerhalb von 5 bis 10 min. Die Inkubation mit Kontroll-IgGs hatte keinen Effekt. Die Bandenintensität von p- $\alpha$ -Adducin wurde densitometrisch bestimmt und als relativer Wert der  $\alpha$ -Adducin-Gesamtproteinmenge über der entsprechenden Bande angegeben (n=4, \* p<0,05 im Vergleich zur Kontroll-IgG-Behandlung) (c) In Westernblotversuchen wurde die Phosphorylierung von  $\alpha$ -Adducin durch CNF-1 (Aktivierung von RhoA, Rac1 und Cdc42) und CNF $\gamma$  (spezifische Aktivierung von RhoA) nach 10 min detektiert. Im Gegensatz dazu

reduzierte die Inkubation mit dem für die Rho-Kinase spezifischen Inhibitor y27632 die  $\alpha$ -Adducin-Phosphorylierung (n=4). (d) ELISA-basierte Messungen zeigten eine reduzierte RhoA-Aktivität nach Inkubation mit PV-IgG bzw. AK23 für 10 min (n=3) [mit der Genehmigung des *Journal of Biological Chemistry* verwendet und modifiziert nach Rötzer et al., 2014].

Zusammengefasst wurde gezeigt, dass  $\alpha$ -Adducin zwar gleichermaßen durch PV-Antikörper und RhoA-aktivierende bakterielle Toxine innerhalb einer kurzen Zeitspanne an Serin726 phosphoryliert wurde, dies jedoch über unterschiedliche Mechanismen erfolgte. Die ELISA-Messungen der RhoA-Aktivität implizieren, dass die PV-Antikörper-induzierte Adducin-Phosphorylierung unabhängig von RhoA war.

Um weitergehend die Wirkung der pharmakologischen RhoA-Aktivierung zu untersuchen, wurden Zellen nach Transfektion von  $\alpha$ -Adducin-siRNA mit CNFy in Kombination mit AK23 inkubiert. In n.t.-siRNA-Kontrollen konnte der bereits beschriebene protektive Effekt der exogenen RhoA-Aktivierung auf den AK23-induzierten Haftungsverlust nachgewiesen werden (Abb. 21a). In Dispase-basierten Dissoziationsversuchen reduzierte die parallele CNFy-Inkubation die erhöhten Fragmentzahlen ( $21 \pm 2$  Fragmente pro Reaktionsgefäß), die nach AK23-Behandlung für 24 h entstanden, signifikant auf  $10 \pm 1$  Fragmente. In diesem Versuchsansatz unterschieden sich die Fragmentzahlen nach CNFy-Behandlung nicht signifikant von denen der Kontrollbehandlung. Inkubation von AK23 für 24 h induzierte in Zellen nach  $\alpha$ -Adducin-siRNA-Transfektion einen deutlich erhöhten Zell-Zell-Haftungsverlust (Anzahl der Fragmente:  $53 \pm 6$ ), der durch CNFy nicht signifikant vermindert wurde (Anzahl der Fragmente:  $43 \pm 3$ ). Die Anzahl der Fragmente in diesen Zellen war nach simultaner Behandlung mit AK23 und CNFy im Vergleich zur entsprechenden  $\alpha$ -Adducin-siRNA-Kontrolle signifikant erhöht.

In weiteren Versuchen sollte die RhoA-induzierte Phosphorylierung von  $\alpha$ -Adducin hinsichtlich der pathogenen Effekte der PV-IgGs analysiert werden. Für die Experimente standen uns GFP-markierte Überexpressionskonstrukte von  $\alpha$ -Adducin zur Verfügung (Abb. 21b). Es handelte sich hierbei um Konstrukte, die entweder den wildtypischen  $\alpha$ -Adducin-Genabschnitt (GFP-Addwt) oder eine Punktmutation (Serin→Alanin) an der Stelle 726 (GFP-Addmut) enthielten. Die Transfektionseffizienz der Konstrukte und das Fehlen der phosphorylierten GFP- $\alpha$ -Adducin-Bande nach Expression der phosphorylierungsdefizienten Adducin-Variante wurden mittels Westernblotverfahren detektiert (Abb. 21c).

Um die Effekte der Überexpression von  $\alpha$ -Adducin zu untersuchen, wurden HaCaT-Zellen nach Transfektion der GFP-markierten Konstrukte mit AK23 bzw. einer Kombination aus AK23 und CNFy

für 24 h inkubiert und anschließend in Dispase-basierten Dissoziationsversuchen untersucht (Abb. 21d). Unter Kontrollbedingungen modulierte die Expression weder von GFP-Addwt noch von GFP-Addmut die Zell-Zell-Haftung im Vergleich zur Expression des GFP-Leervektors. Im Weiteren induzierte die Behandlung mit AK23 in GFP-Addwt-transfizierten Zellen vergleichbare Fragmentzahlen wie in Kontrollzellen (GFP-Leervektor), die durch simultane CNFy Inkubation auf Kontrollniveau reduziert wurden. Im Gegensatz dazu verursachte die Applikation von AK23 für 24 h einen drastischen Haftungsverlust zwischen Zellen, die das Konstrukt GFP-Addmut exprimierten (Anzahl der Fragmente:  $45 \pm 3$ ), der im Vergleich zur GFP-Addwt Expression (Anzahl der Fragmente:  $27 \pm 2$ ) deutlich erhöht war. In GFP-Addwt-transfizierten Zellen wurde der Verlust der Zellkohäsion nur partiell durch parallele Behandlung mit CNFy gehemmt (Anzahl der Fragmente:  $38 \pm 2$ ).

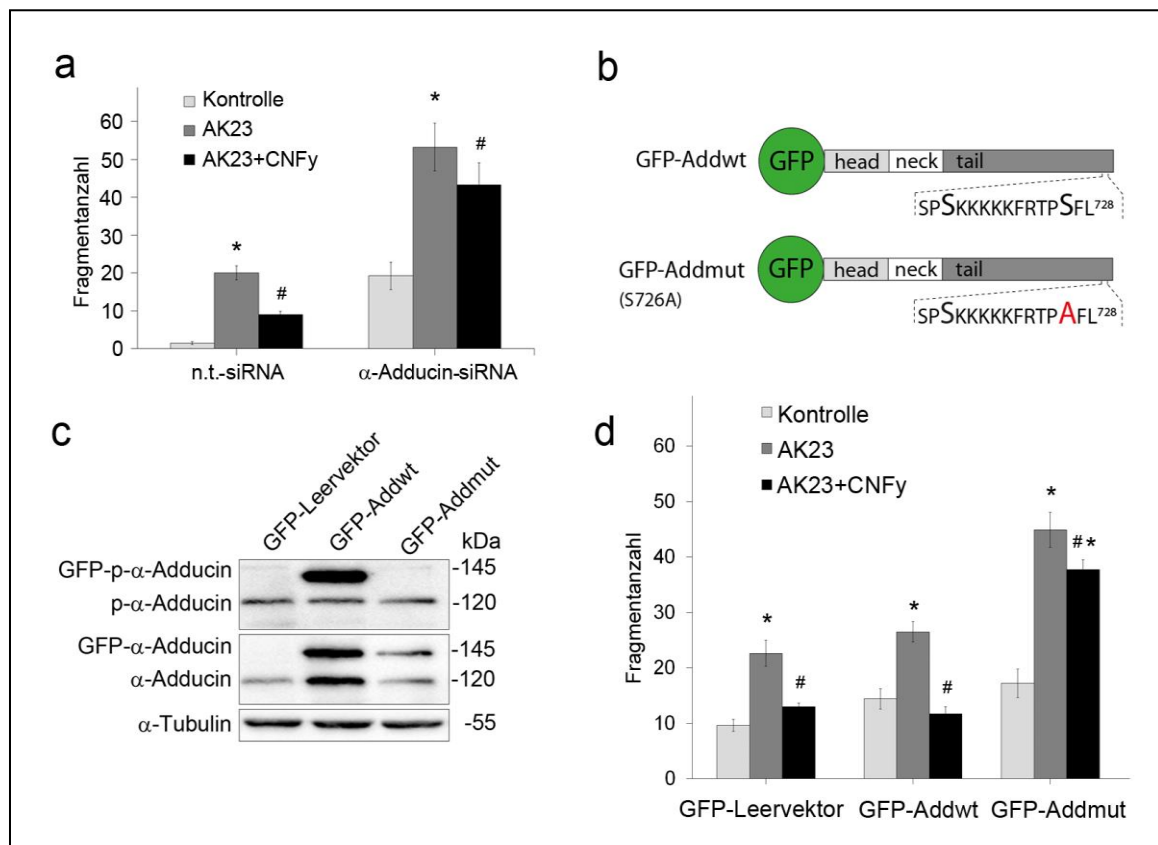


Abbildung 21: RhoA verhindert den PV-IgG-induzierten Haftungsverlust abhängig von der Phosphorylierung von  $\alpha$ -Adducin an Serin726

(a) Darstellung der Fragmentanzahl der Dispase-basierten Dissoziationsversuche nach  $\alpha$ -Adducin-siRNA-Transfektion. In n.t.-siRNA-Kontrollen wurde ein protektiver Effekt der simultanen CNFy-Behandlung auf den durch AK23-induzierten Zell-Zell-Haftungsverlust detektiert. Nach  $\alpha$ -Adducin-siRNA-Transfektion wurde der durch AK23-induzierte Haftungsverlust im Vergleich zur entsprechenden  $\alpha$ -Adducin-siRNA-Kontrolle nicht durch parallele CNFy-Inkubation gehemmt ( $n > 10$ , \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrollbehandlung, #

$p < 0,05$  im Vergleich zur AK23-Inkubation). (b) Schematische Darstellung der verwendeten Überexpressionskonstrukte GFP- $\alpha$ -Adducin-Wildtyp (GFP-Addwt) und GFP- $\alpha$ -Adducin-S726A (GFP-Addmut). (c) Repräsentativer Westernblot nach Expression von GFP-Addwt bzw. GFP-Addmut in HaCaT-Zellen. Die Expression des GFP-Leervektors diente als Kontrolle. (d) In Dissoziationsversuchen wurde die interzelluläre Haftung der Keratinozyten weder durch Überexpression von GFP-Addwt noch von GFP-Addmut moduliert. Inkubation mit AK23 für 24 h induzierte sowohl in Zellen mit GFP-Leervektor als auch mit GFP-Addwt einen signifikanten Verlust der Zelladhäsion, der durch parallele Behandlung mit CNFy geblockt wurde. Im Gegensatz dazu erhöhte die AK23-Inkubation nach Transfektion der GFP-Addmut die Anzahl der Fragmente im Vergleich zu GFP-Leervektor und GFP-Addwt drastisch und wurde durch gleichzeitige Inkubation mit CNFy nur geringfügig vermindert ( $n=12$ , \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrollbehandlung, #  $p < 0,05$  im Vergleich zur AK23-Inkubation) [mit der Genehmigung des *Journal of Biological Chemistry* verwendet und modifiziert nach Rötzer et al., 2014].

Im folgenden Schritt wurden die Auswirkungen der Überexpression der GFP-Addwt- bzw. GFP-Addmut-Konstrukte auf die Dsg3-Verteilung in HaCaT-Zellen nach Inkubation von AK23 untersucht (Abb. 22a). Dazu wurden HaCaT-Zellen mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert und nach Behandlung mit AK23 für 24 h gegen Dsg3 immungefärbt. Zellen, die den GFP-Leervektor exprimierten, zeigten nach AK23-Applikation eine Fragmentierung bzw. Auflockerung der membranständigen Dsg3-Färbung (d-f) im Vergleich zur Kontrollkondition (a-c). Die fragmentierte Färbung von Dsg3, ein Phänomen das auch als ‚lineare Streifung‘ (engl. linear streaks) bezeichnet wird, wurde bereits in HaCaT- und DJM-1-Zellen für PV-IgG (Heupel et al., 2008; Spindler et al., 2007) und AK23 (Spindler et al., 2013; Yamamoto et al., 2007) beschrieben und konnte durch gleichzeitige CNFy-Inkubation verhindert werden (g-i). GFP-Addwt kolokalisierte an der Membran mit Dsg3 und wurde ebenfalls im Zellkern detektiert (j-l). GFP-Addwt exprimierende Zellen zeigten im Gegensatz zu den umliegenden nicht-transfizierten Zellen keine Fragmentierung der Dsg3-Färbung (m-o) und die simultane CNFy-Applikation hatte keinen weiteren Effekt (p-r). In Zellen mit effizienter GFP-Addmut-Expression erschien die Dsg3-Färbung bereits unter Kontrollkonditionen geschwächt (s-u). Inkubation mit AK23 verstärkte die Fragmentierung der Dsg3-Färbung noch zusätzlich (v-x) und konnte im Gegensatz zur Transfektion mit dem GFP-Leervektor nicht durch CNFy vermindert werden (y-aa). Um diese Beobachtungen zu quantifizieren, wurde die Breite der membranständigen Dsg3-Färbung gemessen (Abb. 22c) und als Maß für die Veränderung von Dsg3 an der Zellmembran angegeben (Abb. 22d).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Adducin sowohl durch PV-IgGs als auch durch pharmakologische Aktivierung von RhoA phosphoryliert wurde. Dies erfolgte jedoch auf unterschiedlichen Wegen, da die Phosphorylierung von Adducin in Reaktion auf PV-IgG



unabhängig von RhoA induziert wurde. Die protektive Wirkung der exogenen RhoA-Aktivierung auf den interzellulären Haftungsverlust nach PV-Antikörper-Applikation beruhte dennoch sowohl auf der Anwesenheit als auch der Phosphorylierung von Adducin. Ferner zeigen die Daten, dass der Verlust der Adducin-Phosphorylierung die Effekte der PV-Antikörper verstärkte.

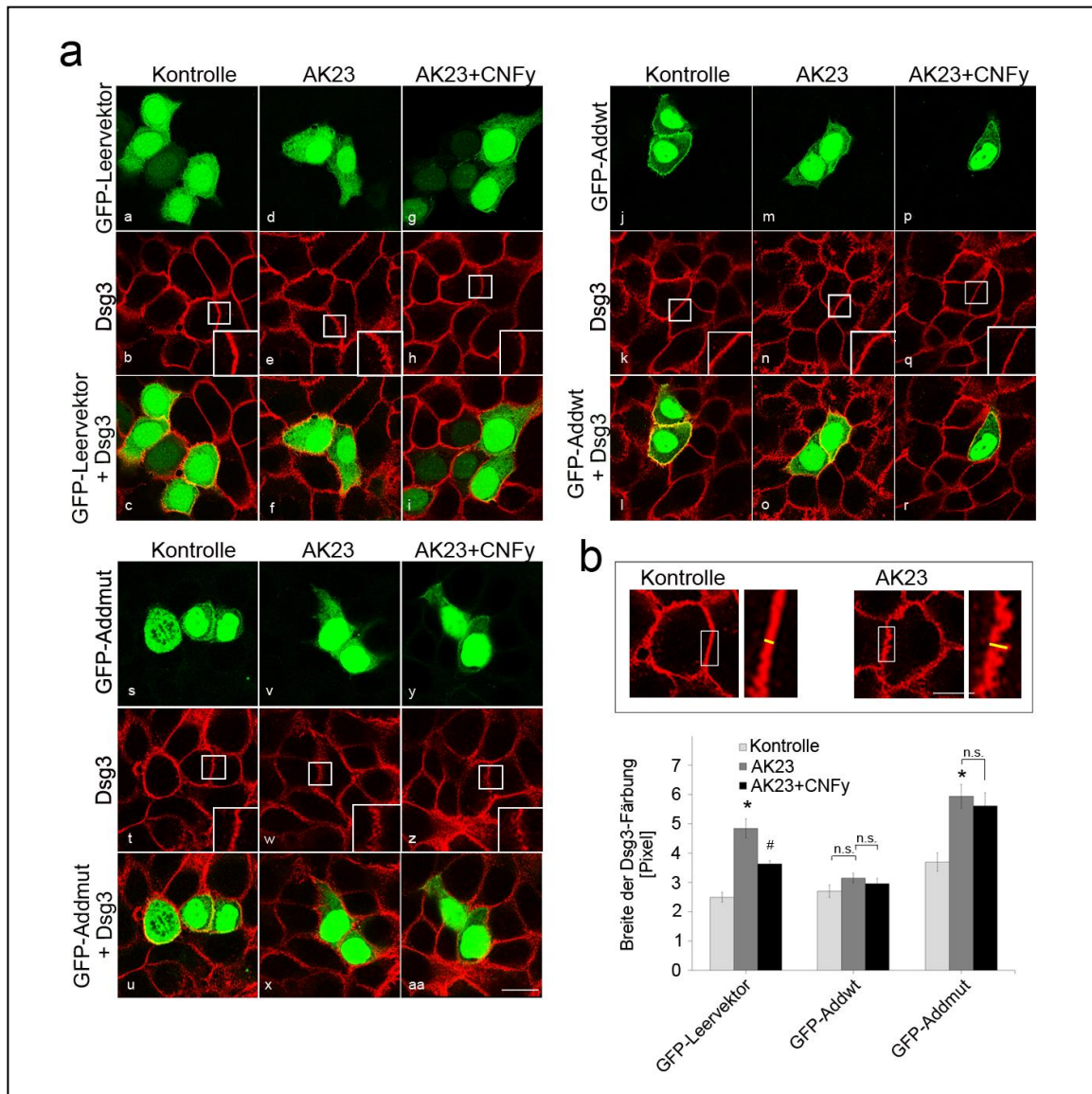


Abbildung 22: Phosphorylierungsdefizientes  $\alpha$ -Adducin verstärkt die pathogenen Effekte von AK23 auf die Fragmentierung von Dsg3

(a) Immunfluoreszenzfärbungen gegen Dsg3 (rot) in Zellen mit transienter GFP-Addwt- bzw. GFP-Addmut-Transfektion. Zellen, die den GFP-Leervektor exprimierten, wiesen nach AK23-Inkubation für 24 h im Vergleich zur Kontrollbehandlung (a-c) eine Fragmentierung der membranständigen Dsg3-Färbung auf (d-f). Koinkubation mit CNFy blockierte die AK23-induzierten Effekte (g-i). GFP-Addwt an der Zellmembran (j) kolokalisierte mit der Dsg3-Färbung (k,l) und blockierte die AK23-induzierte Fragmentierung der Dsg3-Färbung (m-o). Parallele Inkubation von CNFy hatte keinen weiteren Effekt (p-r). Inkubation von AK23

steigerte die Fragmentierung der Dsg3-Färbung in Addmut-transfizierten Zellen zusätzlich (v-x) und wurde durch parallele CNF $\gamma$ -Behandlung nicht blockiert (y-aa) (Maßstab: 20  $\mu$ m, hervorgehobene Zellareale: 2-fache Vergrößerung der angezeigten Bereiche, n=4). (b) Darstellung zur Quantifizierung der Dsg3-Verteilung entlang der Zellmembran (obere Abbildung). Die Breite der Dsg3-Färbung (gelbe Balken, hervorgehobene Zellareale: 3-fache Vergrößerung der angezeigten Bereiche) wurde an vier Seiten der transfizierten Zelle unter den angegebenen Behandlungskonditionen bestimmt. Für die Quantifizierung wurden die Zellen unter der stets gleichen Vergrößerung und Einstellung aufgenommen (Maßstab: 20  $\mu$ m). Die untere Abbildung zeigt die graphische Darstellung der Bildauswertung (n=4, Anzahl der quantifizierten Zellen  $\geq 16$  pro Kondition, \* p<0,05 im Vergleich zur Kontrollbehandlung, # p<0,05 im Vergleich zur AK23-Inkubation) [mit der Genehmigung des *Journal of Biological Chemistry* verwendet und modifiziert nach Rötzer et al., 2014].

#### **3.2.2 PKC-vermittelte Phosphorylierung von Adducin in der Pathogenese von PV**

Die obigen Versuche zeigten, dass der protektive Effekt von RhoA abhängig von Adducin ist. Es ist allerdings unklar, welche Kinase für die Phosphorylierung von Adducin verantwortlich ist. Um Signalwege zu identifizieren, die direkt an der PV-IgG-vermittelten Phosphorylierung von Adducin beteiligt sind, wurde der Fokus auf p38MAPK und PKC gelegt. In vielen Studien wird p38MAPK mit der Pathogenese von PV und insbesondere mit der Umorganisation der Actinfilamente assoziiert (Berkowitz et al., 2005; Chernyavsky et al., 2007; Waschke et al., 2006). Jedoch konnten in HaCaT-Zellen unter Ruhebedingungen keine Unterschiede zwischen dem Phosphorylierungsgrad von  $\alpha$ -Adducin nach spezifischer Inhibierung von p38MAPK durch SB202190-Inkubation für 30 min und der Kontrollbehandlung detektiert werden (Abb. 23a).

Ebenfalls hatte die Hemmung von p38MAPK keinen Effekt auf die durch AK23-induzierte Phosphorylierung von  $\alpha$ -Adducin. Im umgekehrten Fall zeigte die Detektion der p38MAPK-Phosphorylierung an der Position Threonin180/Tyrosin182, die eine Aktivierung dieser Kinase anzeigt, dass die siRNA-induzierte Depletion von  $\alpha$ -Adducin keine modulierende Wirkung auf die p38MAPK-Aktivität hatte (Abb. 23b). Parallel durchgeführte Dissoziationsversuche bestätigten, dass p38MAPK keine Rolle in der Regulierung der  $\alpha$ -Adducin-abhängigen Zell-Zell-Haftung hatte. Zwar erhöhte die Inkubation von AK23 für 24 h in Zellen mit  $\alpha$ -Adducin-Depletion die Fragmentanzahl, jedoch wurde diese durch parallele Inhibition von p38MAPK auf das Niveau der n.t.-siRNA-Kontrolle reduziert (Abb. 23c).

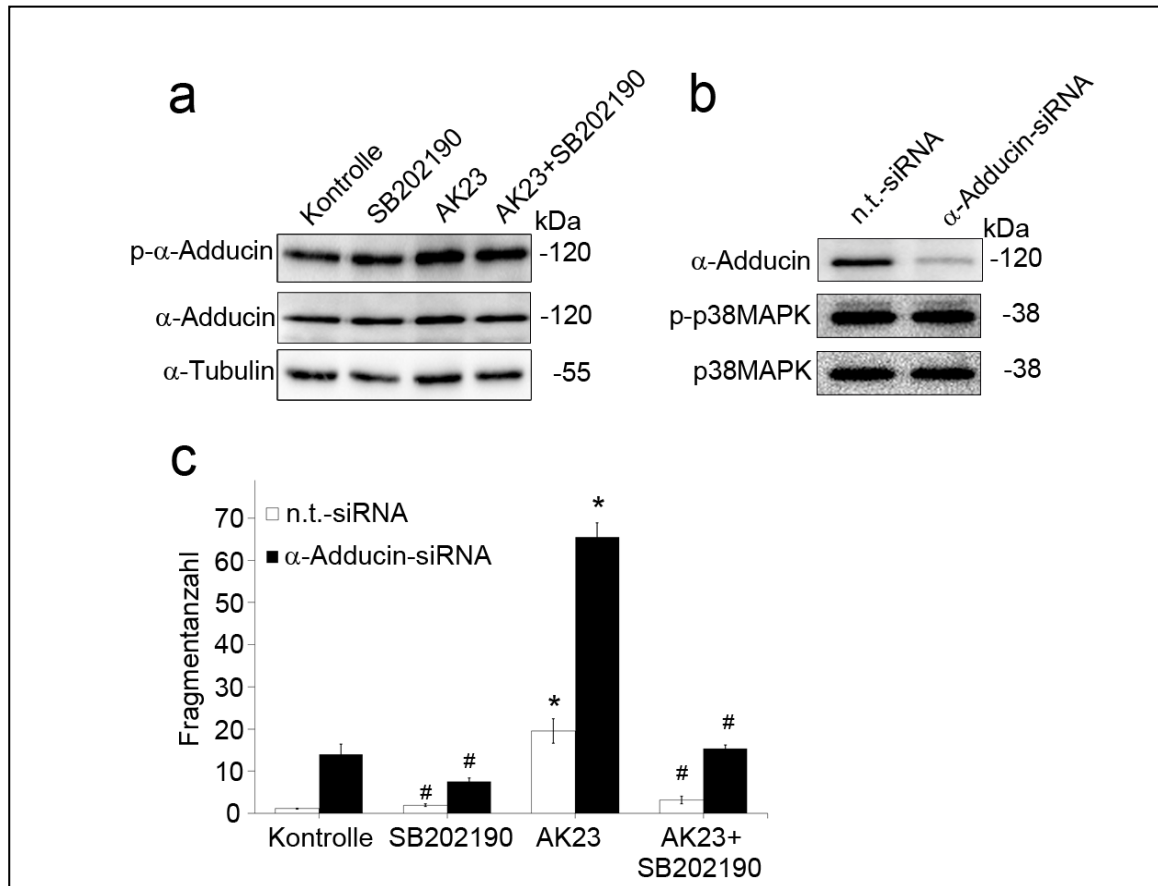


Abbildung 23: Die Rollen von  $\alpha$ -Adducin und p38MAPK bei den AK23-induzierten Effekten sind unabhängig voneinander

(a) In Westernblotanalysen wurde kein Einfluss der Inkubation des spezifischen p38MAPK-Inhibitors SB202190 für 30 min auf die Phosphorylierung von  $\alpha$ -Adducin im Vergleich zur Kontrollbehandlung detektiert. Die AK23-induzierte Phosphorylierung von  $\alpha$ -Adducin wurde nicht durch SB202190 gehemmt (n=4). (b) Nach siRNA-induzierter Depletion von  $\alpha$ -Adducin wurde im Vergleich zu n.t.-siRNA-Kontrollen keine Veränderung der p38MAPK-Phosphorylierung detektiert (n=4). (c) In Dissoziationsversuchen reduzierte die parallele Inkubation von SB202190 den Anstieg der Fragmentzahlen nach 24 h Behandlung sowohl in Zellen mit n.t.-siRNA als auch nach  $\alpha$ -Adducin-siRNA-Transfektion (n=16, \* p<0,05 im Vergleich zur Kontrollbehandlung, # p<0,05 im Vergleich zur AK23-Inkubation) [mit der Genehmigung des *Journal of Biological Chemistry* verwendet und modifiziert nach Rötzer et al., 2014].

Im Weiteren wurde der Einfluss von PKC auf die Phosphorylierung von  $\alpha$ -Adducin nach PV-IgG-Behandlung untersucht. In Keratinozyten wurde gezeigt, dass PKC nach PV-IgG-Bindung aktiviert wurde (Kitajima et al., 1999; Seishima et al., 1999) und dass die pathogenen Effekte der PV-IgG-Inkubation durch PKC-Inhibierung abgeschwächt wurden (Sanchez-Carpintero et al., 2004; Spindler et al., 2011). Es konnte durch pharmakologische Modulation der PKC-Aktivität mittels Westernblotanalyse bestätigt werden, dass  $\alpha$ -Adducin ebenfalls ein Substrat von PKC ist

(Matsuoka et al., 1998) (Abb. 24a). Um die Wirksamkeit des PKC-spezifischen Aktivators PMA bzw. Inhibitors BIM-X zu testen, wurde der Phosphorylierungsstatus von ERK 1/2, einem weiterem Substrat der PKC (Schonwasser et al., 1998), ermittelt. Die Inkubation von PMA für 10 min induzierte eine starke Phosphorylierung von  $\alpha$ -Adducin, die durch simultane Behandlung mit BIM-X reduziert wurde. Damit einhergehend wurde die PV-IgG-vermittelte Phosphorylierung von  $\alpha$ -Adducin durch gleichzeitige Applikation des PKC-spezifischen Inhibitors reduziert (Abb. 24b). Die Phosphorylierung von  $\alpha$ -Adducin in Reaktion auf die PV-IgG-Inkubation wurde durch parallele Inkubation mit BIM-X reduziert. Da konventionelle PKC-Isoformen durch freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aktiviert werden (Mochly-Rosen et al., 2012), wurde in diesem Zusammenhang auch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in HaCaT-Zellen nach Bindung von PV-IgG untersucht (Abb. 24c). Mittels Äquorin-basierter Messungen (Baubet et al., 2000) konnte nach Applikation von PV-IgG im Vergleich zu den Kontrollen ein signifikanter Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration detektiert werden, der etwa 180 s andauerte. Um die Bedeutung der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen für die Adducin-Phosphorylierung zu testen, wurde das zellpermeable Chelationsagens BAPTA-AM für 4 h vorinkubiert. Vergleichbar mit der direkten PKC-Inhibierung mittels BIM-X führte die parallele Inkubation mit BAPTA-AM zu einer Reduktion der PV-IgG-induzierten Phosphorylierung von  $\alpha$ -Adducin und ERK 1/2 nach 10 min (Abb. 24d).

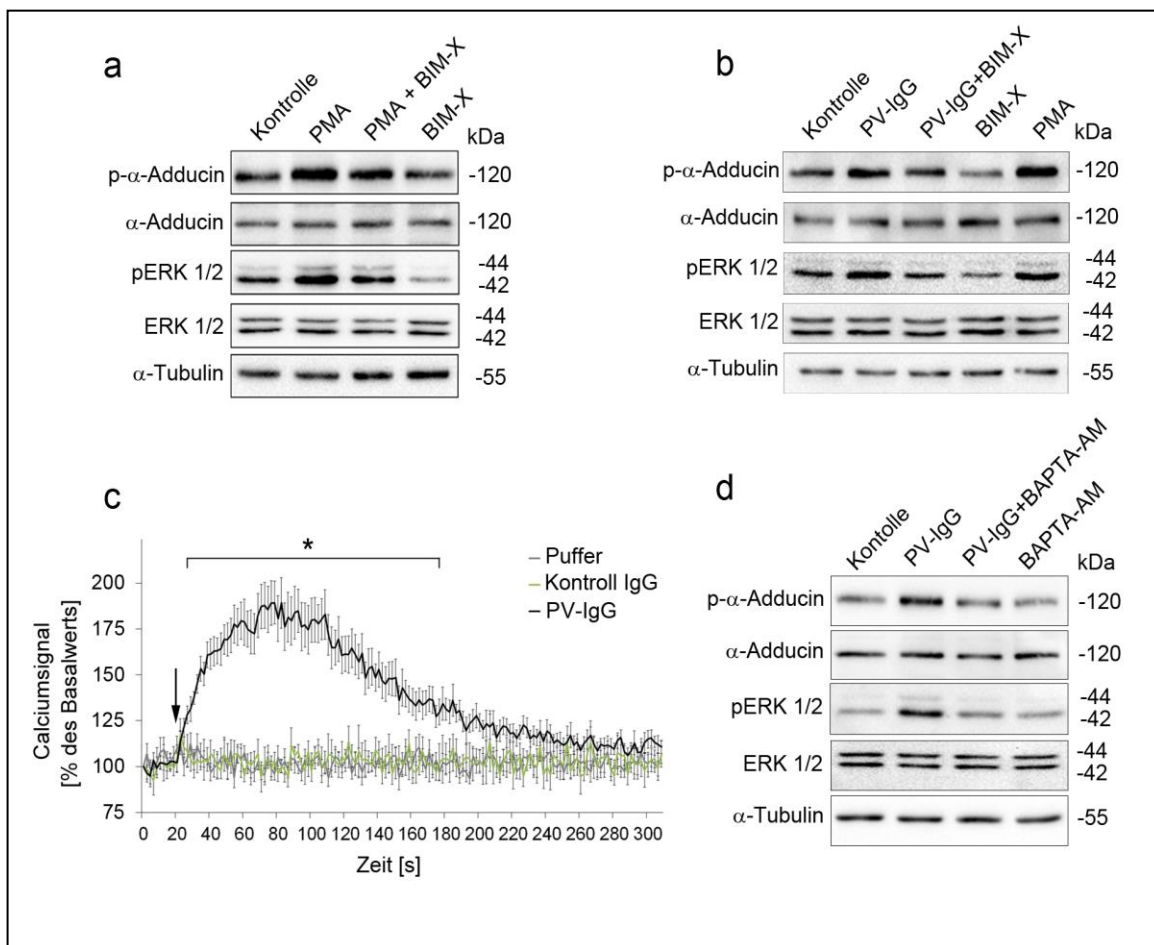


Abbildung 24: Die Phosphorylierung von  $\alpha$ -Adducin nach PV-IgG-Inkubation ist von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und PKC abhängig

(a) In Westernblotanalysen induzierte die Inkubation mit dem spezifischen PKC-Aktivator PMA für 10 min die Phosphorylierung von  $\alpha$ -Adducin, die durch parallele PKC-Inhibierung mit BIM-X vermindert wurde. Die Wirksamkeit der PKC-Modulatoren wurde durch Detektion der ERK-Phosphorylierung ermittelt ( $n=4$ ). (b) Die Phosphorylierung von  $\alpha$ -Adducin nach 10 minütiger PV-IgG-Inkubation wurde durch BIM-X-Applikation gehemmt ( $n=4$ ). (c) In Äquorin-basierten Messungen wurde ein schneller  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom nach PV-IgG-Inkubation detektiert ( $n=5$ , \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontroll-IgG-Inkubation). (d) Mittels Westernblotverfahren wurde eine verminderte PV-IgG-induzierte Phosphorylierung von  $\alpha$ -Adducin nach simultaner BAPTA-AM-Inkubation gezeigt ( $n=3$ ) [mit der Genehmigung des *Journal of Biological Chemistry* verwendet und modifiziert nach Rötzer et al., 2014].

Anschließend wurden unter den gleichen Versuchsbedingungen die Effekte der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen PKC-Signalgebung auf den Zell-Zell-Haftungsverlust der HaCaT-Zellen nach PV-IgG-Behandlung untersucht (Abb. 25). Dabei zeigte sich, dass sowohl die direkte Hemmung der PKC als auch der Entzug freier  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen einen protektiven Effekt hatten. Die parallele Inkubation von BIM-X für

24 h reduzierte die Fragmentzahlen signifikant von  $50 \pm 3$  nach PV-IgG-Applikation auf  $10 \pm 1$  (Abb. 25a). Damit vergleichbar konnte der Zell-Zell-Haftungsverlust nach PV-IgG-Inkubation für 4 h durch Koinkubation mit BAPTA-AM signifikant vermindert werden ( $18 \pm 2$  Fragmente im Vergleich zu  $32 \pm 2$  Fragmente nach PV-IgG Behandlung).

Somit konnte für PKC eine direkte  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Beteiligung in der PV-IgG-induzierten Phosphorylierung von  $\alpha$ -Adducin nachgewiesen werden.

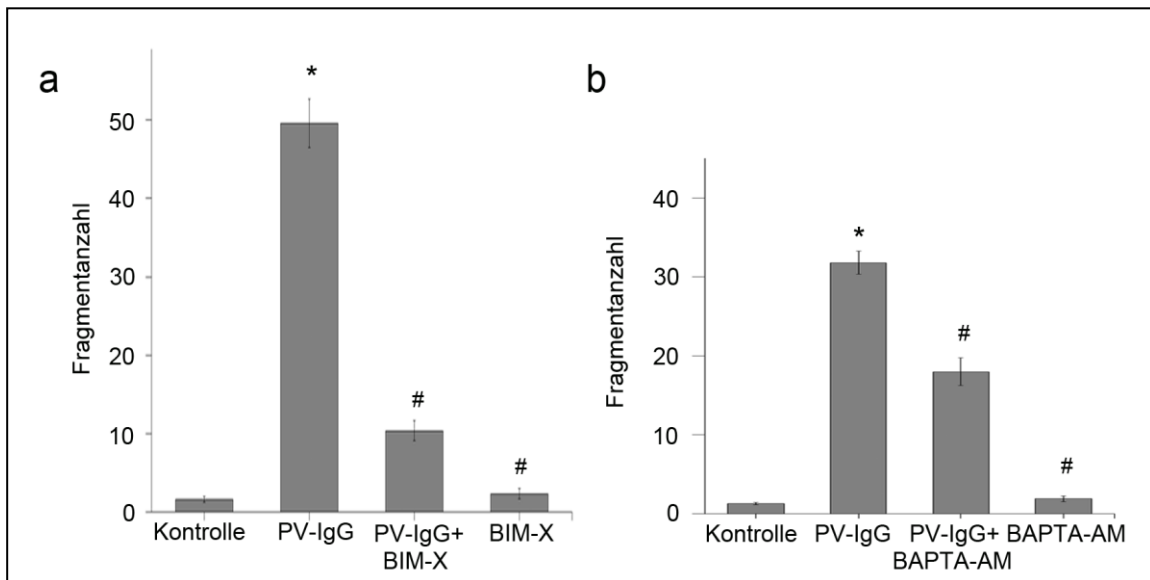


Abbildung 25: Inhibition von PKC sowie des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms verhindert den durch PV-IgG induzierten Zell-Zell-Haftungsverlust

Fragmentzahlen der Dispase-basierten Dissoziationsversuche nach Modulation der PKC-Aktivität durch PV-IgG-Inkubation. (a) Simultane BIM-X-Inkubation verhinderte den interzellulären Haftungsverlust nach PV-IgG-Behandlung für 24 h ( $n > 10$ , \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle; #  $p < 0,05$  im Vergleich zur PV-IgG-Behandlung). (b) Gleichzeitige Behandlung mit BAPTA-AM reduzierte die Fragmentanzahl, die durch PV-IgG nach 4 h verursacht wurde, signifikant ( $n > 8$ , \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle; #  $p < 0,05$  im Vergleich zur PV-IgG-Behandlung) [mit der Genehmigung des *Journal of Biological Chemistry* verwendet und modifiziert nach Rötzer et al., 2014].

Die Rolle der PKC-Aktivität nach PV-IgG-Bindung wurde in einer anderen Studie unserer Arbeitsgruppe untersucht (Dehner et al., 2014), in der DP, das als Adaptermolekül die Keratinfilamente mit den Desmosomen verankert und in der Reifung der Desmosomen wichtig für die Erlangung des hyperadhäsiven Status ist, im Fokus stand. Überexpression einer GFP-DP-Variante (GFP-DP-S2849G, kurz GFP-DPmut), die eine Punktmutation an der Konsensussequenz für PKC enthält, steigert die Verankerung von DP mit dem Keratinfilament-System und induziert die  $\text{Ca}^{2+}$ -Unabhängigkeit der Desmosomen. In HaCaT- und A431-Zellen wurden die pathogenen Effekte der PV-IgG-Behandlung wie der Zell-Zell-Haftungsverlust, die Depletion desmosomaler

Dsg3-Moleküle und die Retraktion der Keratinfilamente durch Überexpression von GFP-DPmut im Vergleich zu GFP-DPwt gehemmt. Für Rack-1 (engl. receptor of activated C kinase 1), das aktiviertes PKC bindet (Mochly-Rosen et al., 1991), wurde in einer aktuellen Studie gezeigt, dass dieses Gerüstmolekül an die Keratinfilamente lokalisiert und vermutlich durch die Sequestrierung der PKC $\alpha$  die Phosphorylierung von DP verhindert (Kröger et al., 2013). Da Zellen, die GFP-DPmut exprimierten, weniger anfällig gegenüber den pathogenen Effekten der PV-IgGs waren, sollte die Interaktion zwischen PKC $\alpha$  und Rack-1 in diesen Zellen untersucht werden. Dafür wurden Immunpräzipitationsversuche mit Rack1 nach Doxycyclin-induzierter Expression der GFP-gekoppelten DP-Konstrukte durchgeführt (Abb. 26a). Dabei zeigte sich, dass die Assoziation von PKC $\alpha$  mit Rack1 durch Expression von GFP-DPmut signifikant um 39% im Vergleich zur Expression von GFP-DPwt erhöht wurde (Abb. 26b).

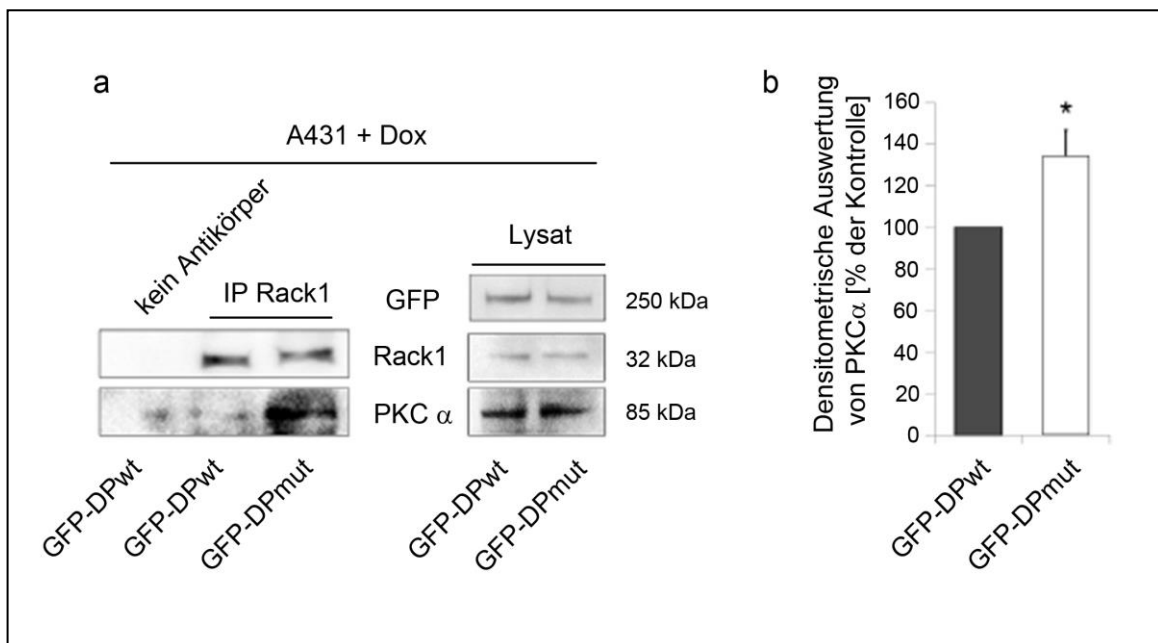


Abbildung 26: PKC $\alpha$  ist nach GFP-DPmut Expression vermehrt an Rack1 gebunden

(a) Repräsentativer Westernblot nach Immunpräzipitation von Rack1 nach Doxycyclin-induzierter Expression der GFP-markierten DP-Konstrukte in A431-Zellen. Es wurde eine vermehrte Interaktion zwischen PKC $\alpha$  und Rack1 nach Expression von GFP-DPmut im Vergleich zur GFP-DPwt-Kontrolle detektiert (n=5). (b) Densitometrische Auswertung der Bandenintensität von PKC $\alpha$  (n=5, \* p<0,05 im Vergleich zur GFP-DPwt-Kontrolle) [mit der Genehmigung des Elsevier Verlages verwendet und modifiziert nach Dehner, Rötzer et al., 2014].

Diese Daten zeigen, dass Rack1 in Zellen mit GFP-DPmut-Expression von PKC vermehrt sequestriert wird. Zusammen mit aktuellen Studien führte dieser Befund zu dem Modell, dass Veränderungen des Keratinfilament-Netzwerkes und der DP-vermittelten Keratin-Verankerung

die Verfügbarkeit von PKC nach PV-IgG-Applikation moduliert (Dehner et al., 2014; Kröger et al., 2013).

### 3.2.3 Reorganisation der Keratinfilamente in der Pathogenese von PV

Das Ablösen der Keratinfilamente von den Desmosomen und die anschließende Akkumulation im perinukleären Raum wird auch als Retraktion des Keratinfilament-Systems bezeichnet. Die Retraktion der Keratinfilamente gilt als eines der wesentlichen Merkmale bei Pemphigus (Wilgram et al., 1961). Mittels PV-IgGs und verschiedener gegen Dsg-gerichteter Peptide sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Dsg3-Bindung auf die Organisation des Keratinfilament-Systems hat. In Keratinozyten konnte gezeigt werden, dass pathogene Effekte der PV-IgGs wie der Zell-Zell-Haftungsverlust und die Depletion von Dsg3 durch parallele Applikation eines Tandempeptids (TP), das die Bindung zwischen Dsg-Molekülen stärkt, verhindert wurden (Heupel et al., 2009b).

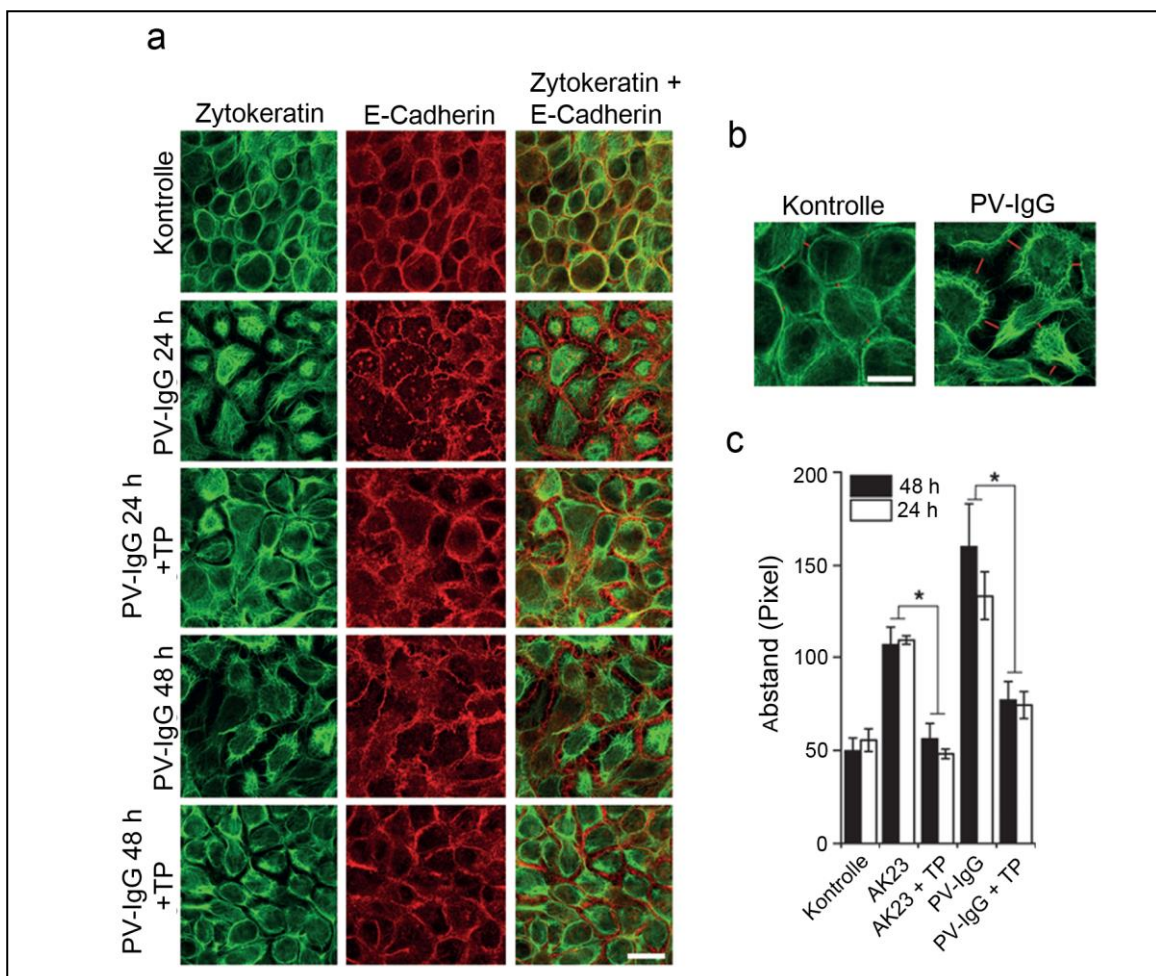


Abbildung 27: TP-Behandlung reduziert die durch PV-IgG- und AK23-induzierte Retraktion der Keratinfilamente



(a) In Fluoreszenzuntersuchungen wurde die Retraktion der Zytokeratinfilamente (grün) nach Inkubation von PV-IgG für 24 h detektiert. Die Immunfärbung gegen E-Cadherin, die nach PV-IgG-Gabe nur schwach verändert war, diente der Darstellung der Zellgrenzen (Maßstab: 20 µm, n=6). (b) Für die Quantifizierung der Zytokeratin-Retraktion wurde der Abstand (Länge der roten Linie) zwischen den Keratinfilamentbündeln benachbarter Zellen an Stellen gleicher Zelldichte gemessen (Maßstab: 20 µm). (c) Die Quantifizierung zeigte eine deutliche Retraktion der Keratinfilamente nach Inkubation mit AK23 oder PV-IgG für 24 h bzw. 48 h. Diese Effekte wurden durch parallele Inkubation mit TP signifikant vermindert. Die Werte basierten auf der Auswertung von je 5 Gesichtsfeldern aus 6 unabhängigen Versuchen. (\*  $p < 0,05$  im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle) [mit der Genehmigung des *Journal of Clinical Investigation* verwendet und modifiziert nach Spindler, Rötzer et al., 2013].

Zunächst wurden die Veränderungen des Keratinfilament-Systems nach Inkubation mit PV-IgG nachvollzogen. Unter Kontrollbedingungen waren die Keratinfilamente als dichtes Netzwerk bis zur Plasmamembran verteilt. Die Inkubation von PV-IgGs für 24 h bzw. 48 h verursachte eine starke Retraktion der Keratinfilamente um den Zellkern. Um die Zellgrenzen zu visualisieren, wurde neben den Keratinfilamenten auch E-Cadherin immungefärbt. Die Veränderungen der Keratinfilamente wurden jedoch durch gleichzeitige Applikation von TP deutlich reduziert (Abb. 27a). Um diese Beobachtungen zu quantifizieren, wurde der Abstand zwischen den Keratinfilamentbündeln benachbarter Zellen gemessen (Abb. 27b, rote Linie). Sowohl AK23 als auch PV-IgG induzierten nach 24 h bzw. 48 h eine drastische Vergrößerung der Abstände, was durch gleichzeitige TP-Inkubation signifikant reduziert wurde (Abb. 27c).

Da auch p38MAPK die dynamischen Prozesse der Keratinfilamente reguliert (Menon et al., 2010; Strnad et al., 2002; Woll et al., 2007), wurde im folgenden Schritt die Rolle der p38MAPK in der Retraktion der Keratinfilamente untersucht. In Immunfärbungen zeigte sich, dass die pharmakologische Aktivierung von p38MAPK durch Inkubation von Anisomycin für 6 h eine deutliche Retraktion der Zytokeratine im Vergleich zur Kontrolle verursachte (Abb. 28a). Dieser Effekt konnte durch gleichzeitige Inhibierung von p38MAPK durch SB202190 oder durch Behandlung mit TP signifikant auf Kontrollniveau reduziert werden (Abb. 28b).

Zusammenfassend verhinderte TP die Retraktion der Keratinfilamente sowohl nach PV-Antikörper-Behandlung als auch nach Aktivierung von p38MAPK durch Anisomycin. Diese Ergebnisse legen nahe, dass der Verlust der desmosomalen Adhäsion zumindest teilweise durch die p38MAPK-vermittelte Störung der Keratinfilamente erfolgen könnte. Da TP die Bindung der Dsg3-Moleküle stärkt, könnte der Verlust der Interaktion der desmosomalen Cadherine die

Retraktion der Keratinfilamente über die Regulierung der p38MAPK-Aktivität kontrollieren (Spindler et al., 2013).

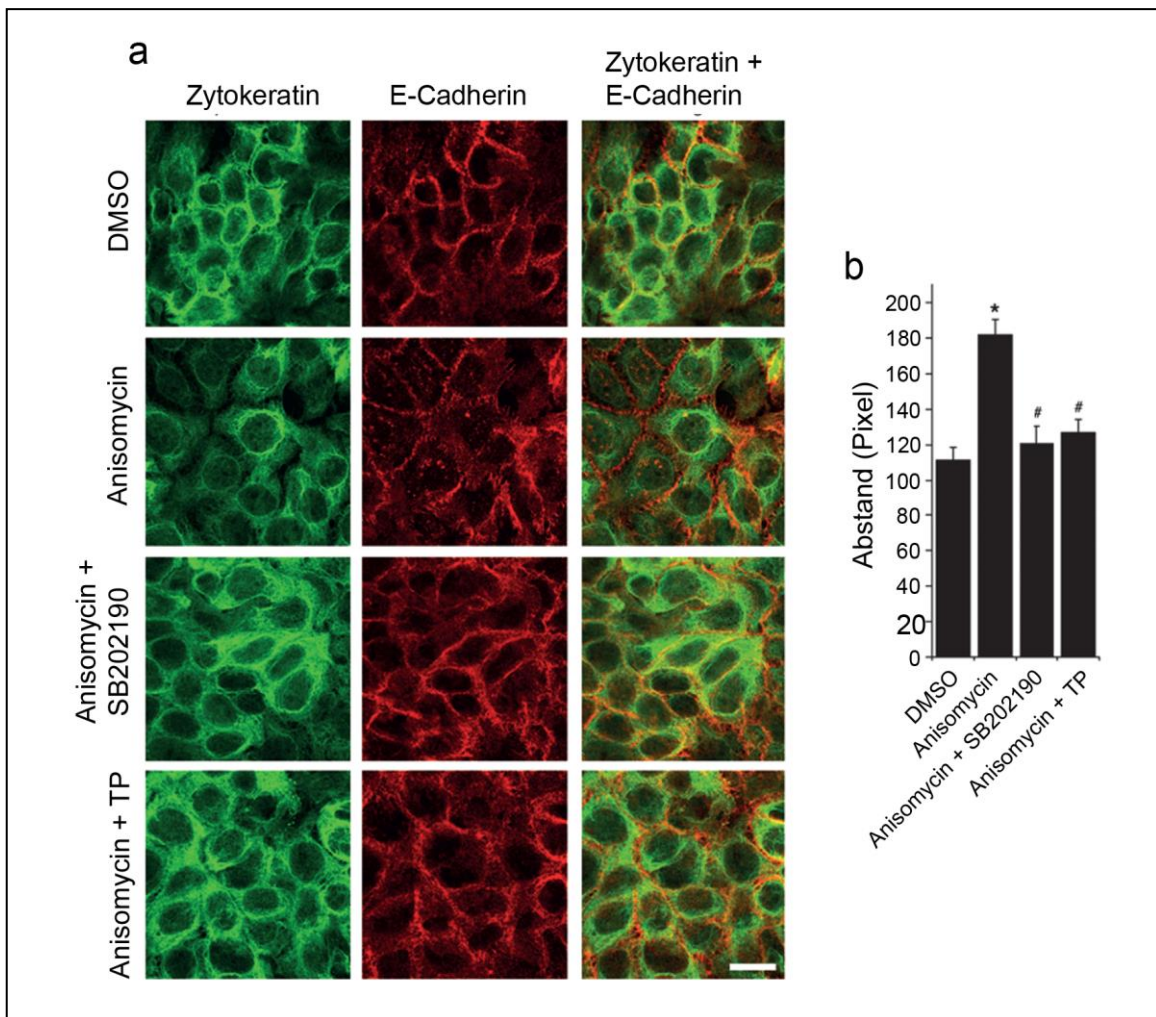


Abbildung 28: Spezifische Aktivierung von p38MAPK führt zur Retraktion der Keratinfilamente (a) Immunfärbung der Keratinfilamente (grün) und E-Cadherin (rot) nach Modulation von p38MAPK. Die Aktivierung der p38MAPK nach Anisomycin-Behandlung für 6 h induzierte die Retraktion der Keratinfilamente. Dieser Effekt auf die Zytokeratine wurde sowohl durch SB202190-vermittelte Inhibition von p38MAPK als auch durch TP verhindert (n=9, Maßstab: 20  $\mu$ m). (c) Auswertung der Zytokeratin-Retraktion in je 5 Gesichtsfeldern von 6 unabhängigen Versuchen (\*p<0,05 im Vergleich zur DMSO Kontrolle, # p<0,05 im Vergleich zur Anisomycin-Behandlung) [mit der Genehmigung des *Journal of Clinical Investigation* verwendet und modifiziert nach Spindler, Rötzer et al., 2013].

## 4 Diskussion

### 4.1. Actin-Bindeproteine und E-Cadherin sind an der Assemblierung der Desmosomen beteiligt

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die Prozesse der desmosomalen Assemblierung bzw. der Reassemblierung im Zuge der dynamischen Desmosomenumorganisation untersucht. Obwohl in zahlreichen Studien eine essentielle Rolle der Adhärenskontakte und deren Zusammenspiel mit dem Actin-Zytoskelett für die Ausbildung der Desmosomen demonstriert wurde (Adams und Nelson, 1998; Vasioukhin et al., 2000; Yin und Green, 2004), sind die zugrunde liegenden Mechanismen bis heute nur unzureichend erforscht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für den interzellulären Haftungsverlust und die Modulation der desmosomalen Dsg3-Proteinmengen eine Beteiligung der Actin-bindenden Proteine Adducin und Cortactin sowie von E-Cadherin identifiziert. Die Regulierung der desmosomalen Assemblierung scheint in diesem Zusammenhang auf unterschiedlichen Wegen zu erfolgen. Während Adducin indirekt die Mobilität der Dsg3-Moleküle innerhalb der Zellmembran reguliert, bildet E-Cadherin einen junktionalen, jedoch extradesmosomalen Komplex mit Dsg3 und Src. Im Zusammenspiel mit Src reguliert E-Cadherin nicht nur die Ausbildung der Desmosomen, sondern auch die anschließende Reifung zu stabilen Zellkontakten. Cortactin könnte über eine direkte Interaktion mit Dsg3 die Haftung zwischen Keratinozyten beeinflussen.

#### 4.1.1 Adducin und Cortactin regulieren die Ausbildung der Desmosomen über Dsg3

Aufgrund ihrer Funktion bei der Regulierung des Actin-Zytoskeletts wurden Adducin und Cortactin bislang vorwiegend im Zusammenhang mit Adhärensjunktionen untersucht (Dong et al., 1995; Helwani et al., 2004; Naydenov und Ivanov, 2010). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben Hinweise auf eine bisher nicht beschriebene Beteiligung von Adducin und Cortactin an der Desmosomen-vermittelten Haftung zwischen Keratinozyten. Die siRNA-induzierte Depletion beider Proteine führte zum interzellulären Haftungsverlust, der im Falle von Adducin mit reduzierten Dsg3-Proteinmengen innerhalb der Desmosomen korreliert wurde. Im Gegensatz zu einer Studie mit MDCK-Zellen (Chen et al., 2011) wurden Komponenten weiterer Interzellularkontakte, wie E-Cadherin und Claudin-1, nicht durch den Funktionsverlust von Adducin moduliert. Dies legt nahe, dass Adducin die Haftung zwischen humanen Keratinozyten spezifisch über den Proteingehalt von Dsg3 reguliert. Hier stellt sich die Frage, wie die Actin-Bindeproteine Adducin und Cortactin die Dsg3-vermittelte Zell-Zell-Haftung beeinflussen können.

Hinweise auf eine direkte Beteiligung lieferte eine Studie, die sowohl in humanen Hautproben als auch in humanen Keratinozyten einen Komplex zwischen Actin und dem Zytoskelett-ungebundenen Dsg3 detektierte (Tsang et al., 2012a). In der Tat wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls für Cortactin eine direkte Assoziation mit dem Zytoskelett-ungebundenen Dsg3 nachgewiesen. Dieser Cortactin/Dsg3-Komplex deutet auf eine direkte Regulierung des Dsg3-Umsatzes durch Cortactin hin. Es ist denkbar, dass Cortactin, wie es für den Pkp2-vermittelten desmosomalen Einbau von DP gezeigt wurde (Bass-Zubek et al., 2008), als Gerüstprotein fungiert und die Assemblierung von Dsg3 in die Desmosomen reguliert. Da Cortactin an der Endozytose membranständiger Proteine beteiligt ist (Ammer und Weed, 2008; Samaj et al., 2004; Weed und Parsons, 2001), könnte die detektierte Interaktion zwischen Cortactin und Dsg3 jedoch auch auf Prozesse des Cortactin-vermittelten endosomalen Abbaus von Dsg3 hindeuten. Obwohl weiterführende Untersuchungen notwendig sind, widerspricht dieser Hypothese des endosomalen Abbaus durch Cortactin, dass der siRNA-induzierte Funktionsverlust von Cortactin zu einer verminderten Zelladhäsion führt.

Adducin scheint, im Gegensatz zu Cortactin, aufgrund der fehlenden Assoziation mit Dsg3 eine eher indirekte Rolle in der Regulierung der Dsg3-basierten Zellkontakte einzunehmen. Hierbei könnte der Einfluss von Adducin auf das kortikale Actin-Stützgerüst von Bedeutung sein. Actinfilamente regulieren die dynamischen Prozesse der Desmosomen während ihrer Assemblierung und der Wundheilung (Godsel et al., 2010; Roberts et al., 2011). Somit könnte Adducin die Assemblierung der Desmosomen indirekt durch Veränderungen des Dsg3-Umsatzes innerhalb der Desmosomen kontrollieren. In der Tat wurde gezeigt, dass desmosomale Komponenten wie DP während der Ausbildung der Zellkontakte in Abhängigkeit von Actinfilamenten zur Zellmembran gelangen (Godsel et al., 2005). Hierbei spielen Pkp2 und aktives RhoA eine entscheidende Rolle (Godsel et al., 2010). Basierend auf Daten der FRAP-Experimente, die zeigten, dass Adducin die laterale Mobilität der Dsg3-Moleküle innerhalb der Zellmembran kontrolliert, könnte Adducin Einfluss auf die laterale Inkorporation von Dsg3 in die Desmosomen nehmen. Exemplarisch für Dsg2 wurde in Zeitreihenaufnahmen gezeigt, dass sich neu synthetisierte desmosomale Cadherine nach Transport an die Zellmembran punktförmig zusammenlagern und anschließend in die bereits bestehenden Desmosomen integriert werden (Gloushankova et al., 2003). Indem das Actin-Zytoskelett ein netzartiges Geflecht unterhalb der Zellmembran ausbildet, schränkt es die laterale Mobilität membranständiger Proteine ein und fördert somit die Gruppierung dieser Proteine (Baumgartner et al., 2003; Kusumi et al., 1999; Sako et al., 1998). In einer Arbeit mit GFP-markiertem Dsc2 wurde gezeigt, dass die laterale Inkorporation extradesmosomaler Cadherine durch pharmakologische Inhibition der

Actinpolymerisierung verhindert wird (Roberts et al., 2011). In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte die Actin-vermittelte Gruppierung von Cadherinen an der Zelloberfläche durch ein hochauflösendes Mikroskopieverfahren im Nanobereich detektiert werden (Wu et al., 2015). Adducin könnte die Funktion des „Einzäunens“ der membranassoziierten Actinfilamente kontrollieren und folglich die Verschiebung der Dsg3-Moleküle in die Desmosomen regulieren. Weiterhin wurde gezeigt, dass Adducin nach Phosphorylierung durch PKC an Serin726 weniger stark an Actinfilamente bindet und in Folge von der Zellmembran in das Zytoplasma relokalisiert (Kaiser et al., 1989). Dazu passend führte die Inkubation mit PV-IgG zu einer Fragmentierung der Adducin-Färbung an Stellen mit interzellulärer Lückenbildung. Diese Daten implizieren, dass die Umverteilung von Adducin oder dessen verminderte Bindung an Actinfilamente die Dynamik des Actin-Zytoskeletts verändert. Dies könnte erklären, warum die Inkorporation der Dsg3-Moleküle in die Desmosomen nach Funktionsverlust von Adducin reduziert war.

Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann jedoch nicht erklärt werden, warum Adducin ausschließlich Dsg3 und nicht Membranproteine weiterer Interzellularkontakte, wie E-Cadherin, beeinträchtigte. In humanen Epithelzellen wurde der Funktionsverlust von Adducin mit einer reduzierten Neubildung der Adhärenskontakte korreliert (Naydenov und Ivanov, 2010). Dementsprechend konnten Experimente zeigen, dass die Inhibierung der Actinpolymerisation durch Cytochalasin D nicht nur die Neubildung der Adhärensjunktionen hemmt (Vasioukhin und Fuchs, 2001), sondern auch eine Reduktion der Desmosomen an der Zellmembran zur Folge hat (Gliem et al., 2010; Inohara et al., 1990; Vasioukhin et al., 2000). Es ist denkbar, dass Dsg3 und E-Cadherin auf unterschiedliche Weise zur Zellmembran translozieren oder deren Einbau in die entsprechenden Haftstrukturen durch unterschiedliche Anteile des Actin-Zytoskeletts bewerkstelligt wird (Green et al., 2010; Nekrasova et al., 2011). Zumindest für Adhärenskontakte wurde gezeigt, dass zwei räumlich getrennte Actinpopulationen, die sich in ihrer Dynamik und Funktion unterscheiden, an der Ausbildung dieser Haftkontakte in Keratinozyten beteiligt sind (Zhang et al., 2005). Die Hypothese der unterschiedlichen Beteiligung des Zytoskeletts am Einbau von E-Cadherin und Dsg3 in die junctionalen Strukturen wird ebenfalls durch eine kürzlich veröffentlichte Studie gestützt. Stahley *et al.* zeigten, dass die Assemblierung der Desmosomen im Gegensatz zu den Adhärensjunktionen über sogenannte ‚Lipid Rafts‘ (engl. Lipidflöße), d.h. Cholesterin-reiche Abschnitte der Zellmembran, erfolgt (Stahley et al., 2014). Es bedarf weiterer Untersuchungen, um den Actin-Zytoskelett-vermittelten Transport der klassischen und desmosomalen Cadherine zu den entsprechenden Haftkontakten herauszuarbeiten.

Zusammenfassend wurde am Beispiel der Actin-bindenden Proteine Adducin und Cortactin die hohe Relevanz eines intakten Actin-Zytoskeletts für die Assemblierung der Desmosomen

aufgezeigt. In zukünftigen Studien sollte untersucht werden, ob Adducin die Bildung der Desmosomen ausschließlich über den Einbau von Dsg3 reguliert oder ob es auch Effekte auf weitere desmosomale Cadherine hat.

### **4.1.2 E-Cadherin ist zusammen mit Src essentiell für die Assemblierung und Reifung der Desmosomen**

In der Literatur wurde die Notwendigkeit von E-Cadherin für die Ausbildung der Desmosomen durch zahlreiche Beispiele belegt (Gumbiner et al., 1988; Lewis et al., 1997; Michels et al., 2009). Damit einhergehend wurde in der vorliegenden Arbeit eine essentielle Rolle von E-Cadherin für die Regulierung des Umsatzes der Dsg3-Moleküle ermittelt. Mit siRNA-Interferenzstudien wurde gezeigt, dass E-Cadherin die Verschiebung der TX-100-löslichen Dsg3-Moleküle in die TX-100-unlösliche Fraktion reguliert. Diese Translokation der Zytoskelett-ungebundenen Dsg3-Moleküle in die Desmosomen ist essentiell für die Vermittlung der Zell-Zell-Haftung (Getsios et al., 2004; Godsel et al., 2004). Interessanterweise reduzierte die siRNA-induzierte Depletion von E-Cadherin die interzelluläre Haftung im vergleichbaren Maße wie der Funktionsverlust von Dsg3. Hier stellte sich die Frage, ob der detektierte Haftungsverlust nach siRNA-vermittelter Depletion von E-Cadherin nicht alleine auf die fehlende Haftungsfunktion von E-Cadherin zurückzuführen ist. Da der zelluläre Widerstand gegen mechanischen Scherstress vorwiegend durch Desmosomen und nicht über Adhärenskontakte vermittelt werden soll (Getsios et al., 2004), könnte der regulierende Einfluss von E-Cadherin auf den Umsatz von Dsg3 von hoher Relevanz für die interzelluläre Haftung zwischen Keratinozyten sein. Demzufolge könnte der interzelluläre Haftungsverlust in Reaktion auf die Depletion von E-Cadherin durch eine verminderte Verankerung von Dsg3 am Zytoskelett verursacht werden und so die Folge einer gestörten Ausbildung der Desmosomen darstellen. Im Weiteren hatte die Inhibition von Src einen vergleichbaren Effekt auf die zelluläre Verteilung von Dsg3 wie der siRNA-vermittelte Funktionsverlust von E-Cadherin. In beiden Fällen wurde eine Reduktion von Zytoskelett-ungebundenem Dsg3 und eine Lösung der Dsg3-Moleküle aus der Zytoskelett-gebundenen Proteinfraction detektiert. Folglich ist es denkbar, dass die Assemblierung der Desmosomen auf einem Zusammenspiel zwischen E-Cadherin und Src beruht. Diese Hypothese wird durch den Nachweis eines Signalkomplexes zwischen E-Cadherin, Dsg3 und Src gestützt. Tsang et al. identifizierten ebenfalls eine Assoziation zwischen E-Cadherin und Dsg3, jedoch wurde diese unter Verwendung eines unterschiedlichen Auftrennungsverfahrens in der TX-100-löslichen Proteinfraction lokalisiert (Tsang et al., 2012b). Durch weiterführende Anreicherungsstudien wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass sich dieser Komplex zwischen Dsg3 und E-Cadherin vermutlich innerhalb der Adhärensjunctionen bildet. Die

Interaktion zwischen E-Cadherin und Dsg3 wurde in der zytoskelettalen Fraktion detektiert und als weitere Assoziationspartner wurden sowohl  $\beta$ -Catenin als auch PG, jedoch nicht DP nachgewiesen. Anhand dieser Ergebnisse kann nicht eindeutig geklärt werden, ob die extradesmosomalen Dsg3-Moleküle innerhalb dieses Komplexes stabil gebunden oder sogar an der Vermittlung der Zell-Zell-Haftung beteiligt sind. Denkbar ist weiterhin, dass es sich bei diesem Komplex um eine zeitlich begrenzte Assoziation mit Komponenten der Adhärenskontakte handelt, bevor die Dsg3-Moleküle in die Desmosomen integriert werden. Die Ergebnisse implizieren ferner, dass Src maßgeblich an der Ausbildung bzw. der Stabilisierung dieses Komplexes beteiligt ist. Durch Inhibierung der Tyrosinkinase Src, die an Komponenten der Adhärenskontakte lokalisiert und deren Umbau reguliert (Fincham und Frame, 1998; Nam et al., 2002; Owens et al., 2000; Tsukita et al., 1991), wurden in HaCaT-Zellen die Mengen an gebundenem Dsg3, jedoch nicht von E-Cadherin, innerhalb dieses Komplexes reduziert. Zusammen mit dem Nachweis, dass Src die Verschiebung der Dsg3-Moleküle aus der Zytoskelett-ungebundenen in die Zytoskelett-verankerte Proteinfraction reguliert, könnte Src folglich den Einbau der Dsg3-Moleküle in die Desmosomen regulieren. In diesem Zusammenhang sollte in weiterführenden Studien auch die Rolle des desmosomalen Plaqueproteins PG untersucht werden. Das der Verknüpfung zwischen DP und Dsg3 dienende Protein kann nicht nur für Funktionen von  $\beta$ -Catenin kompensieren (Takeichi, 1995; Yap et al., 1997), sondern ermöglicht die Kommunikation zwischen den Adhärenskontakten und den Desmosomen (Lewis et al., 1997). Die PG-abhängige Interaktion dieser Haftkontakte wird durch den Nachweis gestützt, dass PG sowohl mit E-Cadherin und Dsg3 assoziiert als auch innerhalb des Komplexes zwischen Dsg3 und E-Cadherin lokalisiert ist.

Die Phosphorylierung der desmosomalen Cadherine und Plaqueproteine an Tyrosin- und Serin/Threoninresten reguliert deren Funktion sowie Interaktion mit anderen Proteinen (Gumbiner, 2005; Yin und Green, 2004). Jedoch wird die regulatorische Funktion der Src-Aktivität, bzw. die Phosphorylierung an Tyrosinresten, in der Ausbildung der interzellulären Adhäsion kontrovers diskutiert. In der Tat werden sowohl positive als auch negative Effekte der Src-Signalgebung auf die Funktion der Cadherine konstatiert, was vermutlich von zahlreichen Faktoren, wie dem zellulären Kontext oder dem Aktivitätsgrad von Src abhängig ist (McLachlan und Yap, 2007). Nichtsdestotrotz wurde sowohl in *in vitro*- als auch *in vivo*-Studien die Relevanz der Src-Kinaseaktivität für die Regulierung der Haftung zwischen Keratinozyten demonstriert (Calautti et al., 1998; Calautti et al., 2002). In Übereinstimmung mit dieser Studie wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Aktivität von Src insbesondere in der Phase der Desmosomenassemblierung essentiell ist. Die pharmakologische Inhibition von Src behinderte den Einbau der Dsg3-Moleküle in die Zellmembran bzw. in die Desmosomen. Mit weiterführenden

Hemmungsstudien wurden sowohl E-Cadherin und PG als auch Dsg3 innerhalb der zytoskelettalen Proteinfraktion als Zielproteine von Src identifiziert. Interessanterweise wurde im umgekehrten Fall in einer Studie aufgezeigt, dass die Überexpression von Dsg3 eine Src-vermittelte Phosphorylierung von Molekülen der Adhärenskontakte induziert (Tsang et al., 2010). Anhand der Daten der vorliegenden Arbeit kann spekuliert werden, dass E-Cadherin im Zusammenspiel mit Src eine essentielle Funktion für die korrekte Assemblierung der Desmosomen einnimmt. Zum einen fungiert E-Cadherin als Bindungspartner für die extradesmosomalen Dsg3-Proteine, die vermutlich als Vorrat für den anschließenden Einbau in die Desmosomen an die Zellmembran gelangen (Spindler und Waschke, 2014). Es ist denkbar, dass freie Dsg3-Moleküle, d.h. Moleküle, die nicht an weitere Adhäsionsmoleküle wie dem E-Cadherin gebunden sind, abgebaut werden. Zum anderen könnte E-Cadherin innerhalb dieses Komplexes als Rezeptor für Src fungieren, was eine Erklärung für den Umstand liefert, dass die Proteinmengen von E-Cadherin im Gegensatz zu Dsg3 durch Inhibition der Src-Aktivität nicht moduliert wurden. Die Ergebnisse deuten weiterhin an, dass Src nach Bindung an E-Cadherin die extradesmosomalen Dsg3-Moleküle vor deren Translokation in die Desmosomen phosphoryliert. Zusammen implizieren diese Daten, dass E-Cadherin durch die Assoziation mit Dsg3 außerhalb der Desmosomen nicht nur die Degradation dieser desmosomalen Haftmoleküle verhindert, sondern durch die Bindung mit Src deren Einbau innerhalb der Desmosomen gewährleistet. In diesem Zusammenhang wäre interessant zu untersuchen, ob die extradesmosomalen Dsg3-Moleküle ihre postulierte signalgebende Funktion innerhalb dieses Komplexes mit E-Cadherin ausüben (Waschke und Spindler, 2014).

Nach Assemblierung der desmosomalen Haftproteine durchlaufen die Desmosomen einen Reifungsprozess, der letztendlich in einem hyperadhäsiven Zustand resultiert. In diesem Zustand vermitteln die Desmosomen eine starke Zelladhäsion zwischen benachbarten Zellen und sind unabhängig gegenüber Modulationen des extrazellulären  $Ca^{2+}$ -Spiegels und der PKC-vermittelten Umorganisation des Keratinfilament-Netzwerkes (Garrod und Kimura, 2008; Kimura et al., 2007; Kitajima, 2013). Durch Inhibition der Src-Aktivität nach Modulation des desmosomalen Umsatzes wurde im Zuge dieser Arbeit erstmals eine Beteiligung von Src für die Erlangung eines  $Ca^{2+}$ -unempfindlichen Status der Desmosomen demonstriert.

Zusammenfassend konnten im Rahmen dieser Arbeit neue Einblicke in die Mechanismen der E-Cadherin- und Src-vermittelten Assemblierung und anschließenden Reifung der Desmosomen gegeben werden. Anhand dieser Ergebnisse und unter Einbezug früherer Befunde (Hartlieb et al., 2014; Spindler et al., 2013) kann die Existenz von drei Signalkomplexen postuliert werden, die Dsg3 enthalten (Abb. 29). Komplex I enthält die membranständigen/löslichen Proteine Dsg3, PG



und p38MAPK. Indessen bindet zytoskelettales Dsg3 entweder an E-Cadherin,  $\beta$ -Catenin, PG und Src (Komplex II) oder an DP, PG und p38MAPK (Komplex III) innerhalb der Desmosomen.

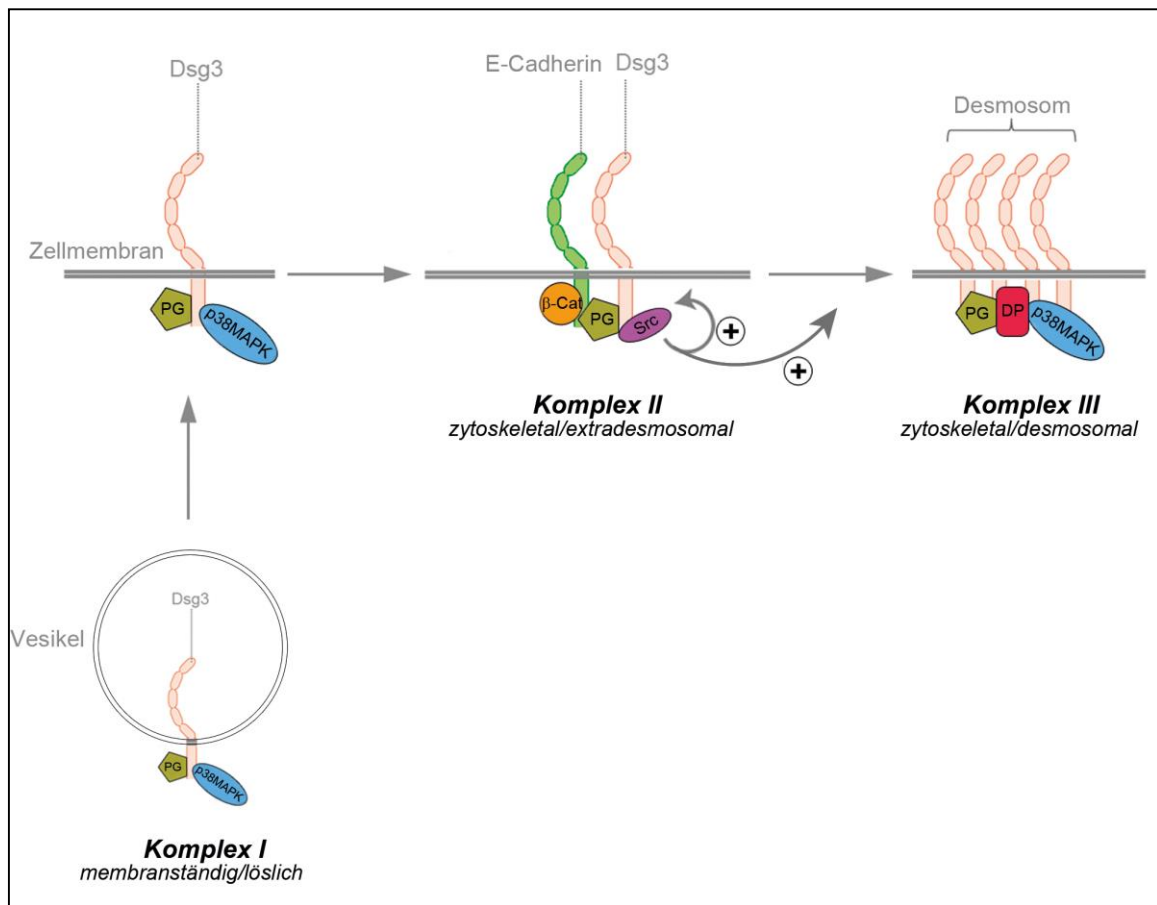


Abbildung 29: Schematische Darstellung der drei Komplexe mit Dsg3, die während der Assemblierung und Reifung der Desmosomen relevant sein könnten

Während der Ausbildung der Desmosomen können drei verschiedene Dsg3-enhaltende Komplexe identifiziert werden. Zytoskelett-ungebundenes Dsg3 gelangt in Assoziation mit PG und p38MAPK in Vesikeln zur Zellmembran (Komplex I). Zytoskelett-verankertes Dsg3 liegt entweder extradesmosomal in einem Komplex mit E-Cadherin,  $\beta$ -Catenin, PG und Src vor (Komplex II) oder ist zusammen mit DP, PG und p38MAPK in den Desmosomen lokalisiert (Komplex III). Src reguliert die zytoskeletale Verankerung von Dsg3 [mit der Genehmigung des Springer Verlages verwendet und modifiziert nach Rötzer et al., 2015].  $\beta$ -Cat =  $\beta$ -Catenin

Diesem Modell zufolge könnte Dsg3 sequenziell nach dem Transport zur Zellmembran über die intermediäre Assoziation mit E-Cadherin und Src in die Desmosomen eingebaut werden. In künftigen Studien sollte der spannenden Frage nachgegangen werden, ob die Actin-Bindeproteine Adducin und Cortactin in diese Prozesse involviert sind. Insbesondere für Adducin könnte eine mögliche Beteiligung am Transport der Dsg3-enhaltenden Vesikel, der Ausbildung des Komplexes

zwischen Dsg3 und E-Cadherin oder der anschließenden Inkorporation von Dsg3 in die Desmosomen z.B. mit Lebendzellstudien untersucht werden. Cortactin könnte eine zentrale Rolle in der Bildung des Komplexes zwischen E-Cadherin und Dsg3 einnehmen, da für dieses Actin-Bindeprotein in der vorliegenden Arbeit neben seiner beschriebenen Interaktion mit E-Cadherin (Helwani et al., 2004; Ren et al., 2009) auch eine Assoziation mit Dsg3 nachgewiesen werden konnte.

### **4.2 Rolle von Adducin bei der PV-IgG-induzierten desmosomalen Disassemblierung**

Zu den charakteristischen Merkmalen der Pathogenese des Pemphigus zählen die Retraktion der Keratinfilamente und die Reorganisation des Actin-Zytoskeletts (Berkowitz et al., 2005; Gliem et al., 2010; Spindler et al., 2007; Waschke et al., 2006). In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass sowohl die direkte pharmakologische Stabilisierung des kortikalen Actin-Zytoskeletts als auch die Stärkung durch Aktivierung von RhoA und Rac1 die pathogenen Effekte der PV-IgGs vermindern konnten (Spindler et al., 2007; Waschke et al., 2006; Wilgram et al., 1961). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten ebenfalls auf eine protektive Funktion von Adducin als Actin-regulierendes Protein in der PV-Pathogenese hin. siRNA-Interferenzstudien lassen dagegen eine Beteiligung von Adducin am endosomalen Abbau von Dsg3-Molekülen unwahrscheinlich erscheinen. Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Phosphorylierung von Adducin an Serin726 durch RhoA und PKC wichtig für die Stabilisierung der Desmosomen ist. Interessanterweise wird die Aktivität dieser Signalproteine ebenfalls nach Bindung der PV-IgGs an ihre Zielantigene moduliert (Osada et al., 1997; Spindler und Waschke, 2011; Waschke et al., 2006). Entgegen unserer Erwartungen löste die Aktivierung von RhoA, die eine Stabilisierung der Desmosomen bewirkt, ebenso wie die Inkubation mit PV-Antikörpern, die zur Destabilisierung der Desmosomen führt, eine Phosphorylierung von Adducin an Serin726 aus. Die naheliegende Überlegung zu diesem Befund, dass PV-Antikörper die Phosphorylierung von Adducin über RhoA induzieren, wurde durch Aktivitätsmessungen der RhoA nach Inkubation mit PV-IgGs und AK23 widerlegt. Dabei zeigte sich in Übereinstimmung mit früheren Daten (Waschke et al., 2006), dass die Aktivität von RhoA zu Zeitpunkten reduziert ist, an denen Adducin phosphoryliert war. Somit kann die schnelle Phosphorylierung von Adducin als ein protektiver Mechanismus der Keratinozyten interpretiert werden, der einsetzt, sobald PV-Antikörper an ihre Zielantigene binden. Gestützt wird diese Hypothese durch den Nachweis, dass die pathogenen Effekte von AK23 auf die Zell-Zell-Haftung und die Verteilung der Dsg3-Moleküle durch die Expression einer phosphorylierungsdefizienten Mutante von  $\alpha$ -Adducin zusätzlich verstärkt wurden. Da als ähnlicher Mechanismus auch gezeigt wurde, dass Keratinozyten die intrazellulären cAMP-Spiegel

erhöhen, um den Haftungsverlust zu reduzieren (Spindler et al., 2011), ist das Konzept eines Rettungsmechanismus als Reaktion auf PV-Antikörper plausibel. Ein zentrales Ereignis dieses intrinsischen Rettungsmechanismus könnte die PKC-vermittelte Phosphorylierung von Adducin an Serin726 sein. Weiterhin wurde die in der Literatur beschriebene Aktivierung von PKC in Reaktion auf PV-IgGs, die mit einem erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom korrelierte (Esaki et al., 1995; Osada et al., 1997; Seishima et al., 1995), im Zuge dieser Arbeit bestätigt. Hierbei handelt es sich vermutlich um klassische PKC-Isoformen, da diese im Gegensatz zu den nicht-konventionellen Isoformen von PKC in Abhängigkeit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aktiviert werden (Mochly-Rosen et al., 2012). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Aktivierung der PKC neben dem positiven Einfluss auf die Stabilität der Desmosomen über eine Phosphorylierung von Adducin auch die Zell-Zell-Haftung in Reaktion auf PV-IgGs schwächt. In Dissoziationsexperimenten hemmte sowohl die Inhibition von PKC als auch die Reduktion des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts den durch PV-IgG-induzierten Haftungsverlust der Keratinozyten. In der Tat kann die Bedeutung der erhöhten Aktivität von PKC in der PV-Pathogenese in der Literatur bis heute nicht abschließend geklärt werden. Diverse Studien heben die duale Funktion von PKC in der Regulierung der Desmosomenstabilität hervor (Kitajima, 2014; Sharma et al., 2007; Waschke, 2008). Zum einen wurde gezeigt, dass PKC essentiell für die Ausbildung und anschließende Stabilisierung durch Verankerung der Keratinfilamente an DP ist (Bass-Zubek et al., 2008; Green und Simpson, 2007; Hobbs et al., 2011). Zum anderen konnte anhand von Inhibitionsstudien bestätigt werden, dass PKC die Destabilisierung der Desmosomen induziert, indem es die PV-IgG-induzierte Depletion der desmosomalen Cadherine Dsg1 und Dsg3 fördert (Cirillo et al., 2010; Spindler et al., 2011). Weiterhin verhindert eine erhöhte PKC-Aktivität die Transition der Desmosomen zu hyperadhäsiven Haftstrukturen (Garrod und Kimura, 2008; Green und Simpson, 2007; Kimura et al., 2007). In diesem Zusammenhang zeigten Daten neuerer Studien, dass PKC durch Phosphorylierung von DP eine Loslösung der Keratinfilamente von ausgereiften Desmosomen induziert und somit die interzelluläre Haftung schwächt (Dehner et al., 2014; Hobbs und Green, 2012; Kröger et al., 2013). Diese Befunde wurden auch durch Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bestätigt. Die Expression einer DP-Variante, die eine Punktmutation in der Konsensussequenz für PKC enthält, induzierte in A431-Zellen eine gesteigerte Assoziation von PKC an das Stützprotein Rack1. In diesen Zellen schwächte die erhöhte Sequestrierung von PKC die pathogenen Effekte der PV-IgGs, wie z.B. die Depletion der Dsg3-Moleküle und die Retraktion der Keratinfilamente, signifikant ab (Dehner et al., 2014). Obwohl PKC eine wichtige Funktion in der dynamischen Assemblierung und Disassemblierung der Desmosomen einnimmt, wie etwa

während der Wundheilung (Thomason et al., 2012; Wallis et al., 2000), ist bis heute unklar, wie dieser PKC-abhängige Umsatz der Desmosomen in Reaktion auf PV-IgGs reguliert wird.

Zusammenfassend bedarf es weiterer Untersuchungen, um insbesondere die Bedeutung der Phosphorylierung von Adducin an Serin726 in der Pathogenese von PV genauer zu bestimmen. Zwar wurde anhand der erhobenen Daten gezeigt, dass PKC die Haftung der Desmosomen über die Phosphorylierung von Adducin in Reaktion auf PV-IgGs stabilisiert, jedoch ist die Rolle von RhoA in diesem Zusammenhang unklar. Es kann spekuliert werden, dass die Aktivierung von RhoA, vermutlich über die Rho-Kinase, die PKC-vermittelten protektiven Effekte der Adducin-Phosphorylierung nach Inkubation mit PV-IgGs in Keratinozyten steigert. Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass die Rho-Kinase die PKC-Aktivität reguliert und somit ebenfalls die Phosphorylierung von Adducin über PKC induziert. Anhand der erhobenen Daten kann der Einfluss von Adducin auf die Regulierung der Desmosomen wie in Abbildung 30 dargestellt werden.

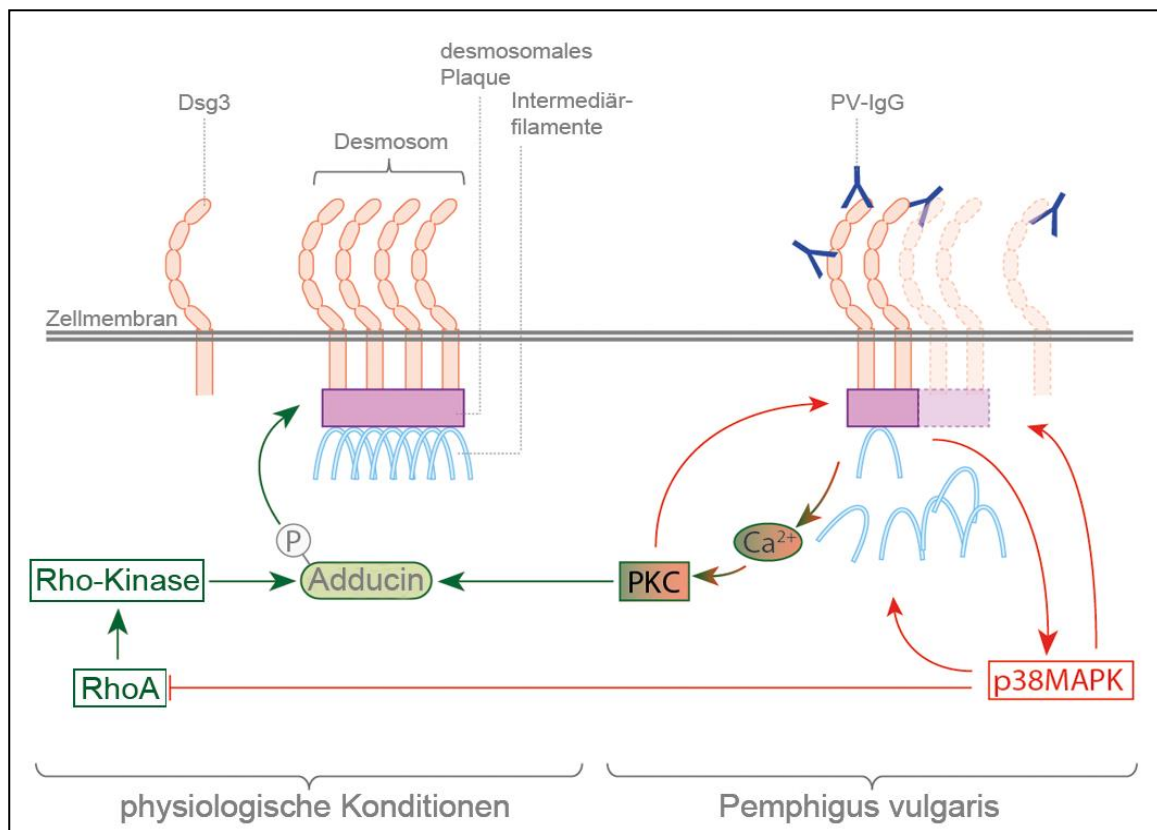


Abbildung 30: Schematische Darstellung der potentiellen Bedeutung von Adducin für die Regulation der desmosomalen Haftung

Grüne Linien und Pfeile kennzeichnen die Desmosomen-stabilisierenden Signalwege während rote Linien und Pfeile die Desmosomen-destabilisierenden Signalwege anzeigen [mit der Genehmigung des *Journal of Biological Chemistry* verwendet und modifiziert nach Rötzer et al., 2014].

Unter physiologischen Konditionen fördert Adducin den Einbau von Dsg3 in die Desmosomen. Hierbei könnte RhoA über die Rho-Kinase wichtig für die Phosphorylierung von Adducin an Serin726 sein. Die Inkubation von PV-IgGs führt zur Aktivierung von PKC und p38MAPK. Die aktive p38MAPK reduziert die Aktivität von RhoA und vermindert somit die RhoA-vermittelte desmosomale Assemblierung. PKC nimmt eine duale Funktion in der Regulierung der Desmosomenstabilität ein: einerseits induziert PKC ebenso wie p38MAPK den interzellulären Haftungsverlust. Andererseits fördert PKC die Kohäsion der Keratinozyten über die Phosphorylierung von Adducin. Damit könnte dieser Desmosomen-stabilisierende Einfluss von PKC nicht ausreichen, um die Effekte der p38MAPK-Signalgebung zu hemmen. Dennoch kann der durch PV-IgG induzierte Zell-Zell-Haftungsverlust durch die pharmakologische Aktivierung von RhoA, die die Assemblierung der Desmosomen fördert, verhindert werden. Diese Mechanismen könnten für den koordinierten Ablauf zwischen der Destabilisierung existierender Desmosomen und der Induktion neuer Kontakte wichtig sein: während unter Ruhebedingungen RhoA über die Rho-Kinase-vermittelte Adducin-Phosphorylierung eine kontinuierliche Assemblierung der Desmosomen gewährleistet, wird dieser Mechanismus nach Störung der desmosomalen Haftung, z.B. durch PV-Antikörper-induzierte p38MAPK-Aktivierung unterbrochen. Dieser Hypothese zufolge würden bereits bestehende hyperadhäsive Desmosomen über PKC vom Zytoskelett abgekoppelt, was ihren Abbau über p38MAPK ermöglichen könnte. Gleichzeitig könnte PKC über Adducin die Neusynthese der Desmosomen einleiten.

### **4.3 Reorganisation der Keratinfilamente als charakteristisches Phänomen bei der Destabilisierung der Desmosomen bei PV**

Bereits in den frühen 1960iger Jahren wurde die Akantholyse bei PV mit der Retraktion der Zytokeratine in Verbindung gebracht (Wilgram et al., 1961). Jedoch kann der Stellenwert dieser Umorganisation in der PV-Pathogenese bis heute nicht eindeutig geklärt werden (Saito et al., 2012; Waschke, 2008). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten eine zentrale Rolle der Retraktion des Keratin-Zytoskeletts in der PV-Pathogenese an, die in kultivierten humanen Keratinozyten durch Verstärkung der Dsg3-Bindung gehemmt werden kann. Die Verankerung der Intermediärfilamente an den desmosomalen Komplex ist für die Ausbildung einer starken Haftung zwischen Keratinozyten essentiell (Godsel et al., 2004; Huen et al., 2002) und untersteht der Regulation durch p38MAPK (Menon et al., 2010; Strnad et al., 2002; Wöll et al., 2007). In der Literatur wird die erhöhte p38MAPK-Aktivität nach Bindung der PV-IgGs an ihre Zielantigene mit der Endozytose der Dsg3-Moleküle, dem Verlust der interzellulären Haftung und der Retraktion

der Keratinfilamente assoziiert (Berkowitz et al., 2005; Berkowitz et al., 2006; Hartlieb et al., 2014; Jolly et al., 2010; Spindler et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde die Retraktion der Zytokeratinfilamente mit der Aktivität von PKC und p38MAPK in Reaktion auf PV-Antikörper korreliert. Die Effekte der gesteigerten p38MAPK-Aktivität auf die zelluläre Verteilung der Keratinfilamente konnte ebenfalls bestätigt werden. Interessanterweise hatte die pharmakologische Aktivierung von p38MAPK mit Anisomycin einen vergleichbar pathogenen Effekt auf das Keratin-Stützgerüst und die interzelluläre Haftung der Keratinozyten wie die Behandlung mit PV-IgGs (diese Arbeit und Spindler *et al.*, 2013). Im Einklang mit weiteren Studien (Calkins et al., 2006; Jolly et al., 2010; Waschke et al., 2006) wurden in diesem Zusammenhang nur geringe morphologische Veränderungen der membranständigen E-Cadherin-Färbung detektiert. Diese Befunde zeigen, dass die p38MAPK-Aktivität alleine für eine Retraktion der Keratinfilamente hinreichend ist und dies zusammen mit der PKC-vermittelten Abkopplung der Keratinfilamente von DP zu einem Kollaps des Keratin-Zytoskeletts führt (Dehner et al., 2014). Ein weiterer wichtiger Befund der vorliegenden Arbeit ist, dass der Einsatz eines zyklischen Tandempeptids (TP), das die Transinteraktion zwischen Dsg3-Molekülen stärkt (Heupel et al., 2009b), die pathogenen Effekte sowohl der PV-IgG-Inkubation als auch der p38MAPK-Aktivierung auf die Retraktion der Keratinfilamente und die verminderte Zell-Zell-Adhäsion hemmen konnte. Diese Ergebnisse deuten an, dass eine reziproke Abhängigkeit zwischen der Stabilität der Desmosomen und des damit verankerten Keratin-Zytoskeletts besteht.

Somit stellt sich die Frage, ob die Retraktion der Keratinfilamente in Reaktion auf PV-IgGs nicht nur als Folge, sondern zumindest partiell auch als Ursache des interzellulären Haftungsverlusts zu betrachten ist. Vorwiegend morphologische Studien messen der PV-IgG-induzierten Umorganisation des Keratin-Stützgerüsts eine wesentliche Rolle in der Induktion der Akantholyse bei. Einige Autoren sehen die Zellformveränderung in Reaktion auf die durch PV-IgG-induzierte Retraktion der Keratinfilamente als zentrales Ergebnis. Dementsprechend gilt die Retraktion des Keratin-Netzwerkes als direkter Auslöser der PV-IgG-vermittelten interzellulären Spaltbildung (Bystryn und Grando, 2009; Bystryn und Grando, 2006; Hashimoto und Lever, 1967; Sams und Gammon, 1982; Wilgram et al., 1961). Neue Befunde aus Hautläsionen von Pemphigus-Patienten zeigen, dass noch vorhandene Desmosomen an den Keratinfilamenten verankert sind, während Areale ohne Haftkontakte eine starke Keratin-Retraktion aufweisen (Sokol et al., 2015). Obwohl die Autoren dies als Hinweis dafür interpretieren, dass die Retraktion der Keratinfilamente die Folge der gestörten desmosomalen Assemblierung ist, kann auch umgekehrt die Abkopplung vom Zytoskelett den Abbau der Desmosomen induzieren. Hochauflösende AFM-Studien zeigen jedoch, dass ein mechanisch induzierbarer Haftungsverlust bereits 15 min nach PV-IgG-Gabe mit einer

Keratinfilament-Retraktion einhergeht, auch wenn zu diesem Zeitpunkt durch Biotinylierungsstudien keine Dsg3-Depletion nachzuweisen ist und die Auswirkungen der gestörten Neuassemblierung von Desmosomen gering sein dürften (Vielmuth et al., 2015). Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine hohe Relevanz eines intakten Keratin-Zytoskeletts für die stabile desmosomale Haftung zwischen Keratinozyten auf. In diesem Zusammenhang könnte die DP-vermittelte Verankerung der Keratinfilamente an die Desmosomen eine wichtige Rolle spielen (Bornslaeger et al., 1996; Godsel et al., 2005). In Experimenten mit primären Keratinozyten aus DP-defizienten Mäusen (Vasioukhin et al., 2001) oder mit humanen A431-Zellen, die eine DP-Mutante ohne Bindungsstelle für Keratinfilamente exprimierten (Huen et al., 2002), führte die fehlende Anheftung der Keratinfilamente an die Desmosomen zum interzellulären Haftungsverlust. Da das für PKC phosphorylierungsdefiziente DP nicht nur eine starke Bindung der Keratinfilamente und den Übergang der Desmosomen in einen hyperadhäsiven Zustand vermittelt (Hobbs und Green, 2012) und sowohl die PV-IgG-induzierte Keratinfilament-Retraktion als auch den Haftungsverlust abschwächt (Dehner et al., 2014), ist eine Beteiligung der Keratinfilamente am Haftungsverlust anzunehmen. Zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit kann es heute als gesichert angesehen werden, dass die Verknüpfung der Desmosomen an die Keratinfilamente für die desmosomale Haftung entscheidend ist und die Keratinfilament-Retraktion in der PV-Pathogenese zum Haftungsverlust beiträgt (Waschke, 2008; Waschke und Spindler, 2014).

### **4.4 Ausblick**

Die vorliegende Arbeit unterstreicht die Notwendigkeit einer vertieften Erforschung der physiologischen Prozesse des desmosomalen Auf- und Abbaus, was ebenfalls essentiell für die Interpretation der PV-Pathogenesemechanismen ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine zentrale Rolle des Actin-Bindeproteins Adducins und von E-Cadherin bei der Verankerung von Dsg3 an das Zytoskelett und somit für die Stabilisierung der Desmosomen. In fortführenden Studien sollte zunächst abgeklärt werden, ob Adducin und E-Cadherin die Ausbildung der Desmosomen spezifisch über den Umsatz der Dsg3-Moleküle regulieren oder ob sie auch einen modulierenden Einfluss auf weitere desmosomale Cadherine haben. Weiterhin stellt sich die zentrale Frage nach den Mechanismen, über die Adducin und E-Cadherin den Einbau von Dsg3 in die Desmosomen kontrollieren. Für Adducin sind prinzipiell zwei Mechanismen denkbar, über die es den Dsg3-Proteingehalt innerhalb der Desmosomen regulieren könnte: zum einen könnte es den Vesikel-vermittelten Transport der Dsg3-Moleküle entlang der Mikrotubuli vom Ort der Synthese bis zur Plasmamembran, etwa über eine Interaktion mit den Mikrotubuli, koordinieren

und zum anderen könnte es die laterale Mobilität der Dsg3-Moleküle innerhalb der Plasmamembran über die Regulierung des Actin-Zytoskeletts einschränken. Es ist denkbar, dass diese Funktion des „Einzäunens“ die Ausbildung des Komplexes zwischen extradesmosomalen Dsg3, E-Cadherin und Src begünstigt. Hierbei könnte es sich um eine transiente, zeitlich begrenzte Assoziation handeln, die zum einen der Lokalisation der extradesmosomalen Dsg3-Moleküle innerhalb der Membran und zum anderen der anschließenden Src-vermittelten Integration in die Desmosomen dient. Letzteres ist denkbar, da die Inhibition von Src die Dsg3-Proteinmengen innerhalb des Komplexes mit E-Cadherin reduzierte. In diesem Zusammenhang sollte auch die Rolle von Cortactin, das nicht nur mit E-Cadherin sondern auch, wie in dieser Arbeit gezeigt, mit Dsg3 interagiert und ein Substrat von Src ist, weitergehend untersucht werden. Diese außerhalb der Desmosomen stattfindende Assoziation zwischen Dsg3 und E-Cadherin sollte auch hinsichtlich der Pathogenesemechanismen von PV in künftigen Arbeiten analysiert werden. Dies könnte Aufschluss darüber geben, ob sich dieser Komplex unter einer gesteigerten PV-IgG-induzierten Destabilisierung der Desmosomen überhaupt ausbilden kann und welchen Einfluss die postulierte signalgebende Funktion der extradesmosomalen Dsg3-Moleküle in diesem Zusammenhang einnimmt. Weiterhin liefern die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit neue Hinweise für die enge Korrelation der Keratinfilament-Retraktion mit dem Verlust der desmosomalen Haftung in der PV-Pathogenese. Da die Retraktion der Keratinfilamente sowohl durch eine erhöhte Aktivität von p38MAPK als auch durch eine PKC-vermittelte DP-Phosphorylierung ausgelöst wird und beide Kinasen innerhalb einer kurzen Zeitspanne nach PV-IgG-Inkubation aktiviert sind, sollten diese Prozesse zu frühen Zeitpunkten z. B. in Lebendzellmikroskopie-Studien weiter untersucht werden.



## Literaturverzeichnis

- Adams, C. L., Chen, Y. T., Smith, S. J. and Nelson, W. J. (1998). Mechanisms of epithelial cell-cell adhesion and cell compaction revealed by high-resolution tracking of E-cadherin-green fluorescent protein. *J Cell Biol* 142, 1105-19.
- Adams, C. L. and Nelson, W. J. (1998). Cytomechanics of cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 10, 572-7.
- Alberts B, J. A., Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2002). Molecular biology of the cell. New York: Garland Science.
- Amagai, M. (2003). Desmoglein as a target in autoimmunity and infection. *J Am Acad Dermatol* 48, 244-52.
- Amagai, M., Fujimori, T., Masunaga, T., Shimizu, H., Nishikawa, T., Shimizu, N., Takeichi, M. and Hashimoto, T. (1995a). Delayed assembly of desmosomes in keratinocytes with disrupted classic-cadherin-mediated cell adhesion by a dominant negative mutant. *J Invest Dermatol* 104, 27-32.
- Amagai, M., Hashimoto, T., Green, K. J., Shimizu, N. and Nishikawa, T. (1995b). Antigen-specific immunoadsorption of pathogenic autoantibodies in pemphigus foliaceus. *J Invest Dermatol* 104, 895-901.
- Amagai, M., Hashimoto, T., Shimizu, N. and Nishikawa, T. (1994). Absorption of pathogenic autoantibodies by the extracellular domain of pemphigus vulgaris antigen (Dsg3) produced by baculovirus. *J Clin Invest* 94, 59-67.
- Amagai, M., Karpati, S., Prussick, R., Klaus-Kovtun, V. and Stanley, J. R. (1992). Autoantibodies against the amino-terminal cadherin-like binding domain of pemphigus vulgaris antigen are pathogenic. *J Clin Invest* 90, 919-26.
- Amagai, M., Klaus-Kovtun, V. and Stanley, J. R. (1991). Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* 67, 869-77.
- Amagai, M. and Stanley, J. R. (2012). Desmoglein as a target in skin disease and beyond. *J Invest Dermatol* 132, 776-84.
- Amagai, M., Tsunoda, K., Zillikens, D., Nagai, T. and Nishikawa, T. (1999). The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile. *J Am Acad Dermatol* 40, 167-70.
- Ammer, A. G. and Weed, S. A. (2008). Cortactin branches out: roles in regulating protrusive actin dynamics. *Cell Motil Cytoskeleton* 65, 687-707.
- Anderson, J. M. (2001). Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News Physiol Sci* 16, 126-30.
- Anderson, J. M., Van Itallie, C. M. and Fanning, A. S. (2004). Setting up a selective barrier at the apical junction complex. *Curr Opin Cell Biol* 16, 140-5.
- Angst, B. D., Marcozzi, C. and Magee, A. I. (2001). The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci* 114, 629-41.
- Anhalt, G. J., Labib, R. S., Voorhees, J. J., Beals, T. F. and Diaz, L. A. (1982). Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. *N Engl J Med* 306, 1189-96.
- Anhalt, G. J., Patel, H. P., Labib, R. S., Diaz, L. A. and Proud, D. (1986). Dexamethasone inhibits plasminogen activator activity in experimental pemphigus in vivo but does not block acantholysis. *J Immunol* 136, 113-7.

- Aoyama, Y. and Kitajima, Y. (1999). Pemphigus vulgaris-IgG causes a rapid depletion of desmoglein 3 (Dsg3) from the Triton X-100 soluble pools, leading to the formation of Dsg3-depleted desmosomes in a human squamous carcinoma cell line, DJM-1 cells. *J Invest Dermatol* 112, 67-71.
- Aoyama, Y., Owada, M. K. and Kitajima, Y. (1999). A pathogenic autoantibody, pemphigus vulgaris-IgG, induces phosphorylation of desmoglein 3, and its dissociation from plakoglobin in cultured keratinocytes. *Eur J Immunol* 29, 2233-40.
- Arredondo, J., Chernyavsky, A. I., Karaoui, A. and Grando, S. A. (2005). Novel mechanisms of target cell death and survival and of therapeutic action of IVIg in Pemphigus. *Am J Pathol* 167, 1531-44.
- Bass-Zubek, A. E., Hobbs, R. P., Amargo, E. V., Garcia, N. J., Hsieh, S. N., Chen, X., Wahl, J. K., 3rd, Denning, M. F. and Green, K. J. (2008). Plakophilin 2: a critical scaffold for PKC alpha that regulates intercellular junction assembly. *J Cell Biol* 181, 605-13.
- Baubet, V., Le Mouellic, H., Campbell, A. K., Lucas-Meunier, E., Fossier, P. and Brulet, P. (2000). Chimeric green fluorescent protein-aequorin as bioluminescent Ca<sup>2+</sup> reporters at the single-cell level. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7260-5.
- Baumgartner, W., Schutz, G. J., Wiegand, J., Golenhofen, N. and Drenckhahn, D. (2003). Cadherin function probed by laser tweezer and single molecule fluorescence in vascular endothelial cells. *J Cell Sci* 116, 1001-11.
- Bektas, M., Jolly, P. S., Berkowitz, P., Amagai, M. and Rubenstein, D. S. (2013). A pathophysiologic role for epidermal growth factor receptor in pemphigus acantholysis. *J Biol Chem* 288, 9447-56.
- Berkowitz, P., Chua, M., Liu, Z., Diaz, L. A. and Rubenstein, D. S. (2008a). Autoantibodies in the autoimmune disease pemphigus foliaceus induce blistering via p38 mitogen-activated protein kinase-dependent signaling in the skin. *Am J Pathol* 173, 1628-36.
- Berkowitz, P., Diaz, L. A., Hall, R. P. and Rubenstein, D. S. (2008b). Induction of p38MAPK and HSP27 phosphorylation in pemphigus patient skin. *J Invest Dermatol* 128, 738-40.
- Berkowitz, P., Hu, P., Liu, Z., Diaz, L. A., Enghild, J. J., Chua, M. P. and Rubenstein, D. S. (2005). Desmosome signaling. Inhibition of p38MAPK prevents pemphigus vulgaris IgG-induced cytoskeleton reorganization. *J Biol Chem* 280, 23778-84.
- Berkowitz, P., Hu, P., Warren, S., Liu, Z., Diaz, L. A. and Rubenstein, D. S. (2006). p38MAPK inhibition prevents disease in pemphigus vulgaris mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12855-60.
- Beutner, E. H. and Jordon, R. E. (1964). Demonstration of skin antibodies in sera of pemphigus vulgaris patients by indirect immunofluorescent staining. *Proc Soc Exp Biol Med* 117, 505-10.
- Bickle, K., Roark, T. R. and Hsu, S. (2002). Autoimmune bullous dermatoses: a review. *Am Fam Physician* 65, 1861-70.
- Bohnekamp, J., Cryderman, D. E., Paululat, A., Baccam, G. C., Wallrath, L. L. and Magin, T. M. (2015). A drosophila model of epidermolysis bullosa simplex. *J Invest Dermatol* 135, 2031-9.
- Bolte, S. and Cordelieres, F. P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* 224, 213-32.
- Bornslaeger, E. A., Corcoran, C. M., Stappenbeck, T. S. and Green, K. J. (1996). Breaking the connection: displacement of the desmosomal plaque protein desmoplakin from cell-cell interfaces disrupts anchorage of intermediate filament bundles and alters intercellular junction assembly. *J Cell Biol* 134, 985-1001.
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. and Fusenig, N. E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106, 761-71.

- Burdett, I. D. (1998). Aspects of the structure and assembly of desmosomes. *Micron* 29, 309-28.
- Bystryn, J. C. and Grando, S. (2009). The cause of acantholysis in pemphigus: further support for the 'basal cell shrinkage' hypothesis. *Br J Dermatol* 161, 702.
- Bystryn, J. C. and Grando, S. A. (2006). A novel explanation for acantholysis in pemphigus vulgaris: the basal cell shrinkage hypothesis. *J Am Acad Dermatol* 54, 513-6.
- Bystryn, J. C. and Rudolph, J. L. (2005). Pemphigus. *Lancet* 366, 61-73.
- Calautti, E., Cabodi, S., Stein, P. L., Hatzfeld, M., Kedersha, N. and Paolo Dotto, G. (1998). Tyrosine phosphorylation and src family kinases control keratinocyte cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 141, 1449-65.
- Calautti, E., Grossi, M., Mammucari, C., Aoyama, Y., Pirro, M., Ono, Y., Li, J. and Dotto, G. P. (2002). Fyn tyrosine kinase is a downstream mediator of Rho/PRK2 function in keratinocyte cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 156, 137-48.
- Caldelari, R., de Bruin, A., Baumann, D., Suter, M. M., Bierkamp, C., Balmer, V. and Müller, E. (2001). A central role for the armadillo protein plakoglobin in the autoimmune disease pemphigus vulgaris. *J Cell Biol* 153, 823-34.
- Calkins, C. C., Setzer, S. V., Jennings, J. M., Summers, S., Tsunoda, K., Amagai, M. and Kowalczyk, A. P. (2006). Desmoglein endocytosis and desmosome disassembly are coordinated responses to pemphigus autoantibodies. *J Biol Chem* 281, 7623-34.
- Chen, C. L., Hsieh, Y. T. and Chen, H. C. (2007). Phosphorylation of adducin by protein kinase Cdelta promotes cell motility. *J Cell Sci* 120, 1157-67.
- Chen, C. L., Lin, Y. P., Lai, Y. C. and Chen, H. C. (2011). Alpha-Adducin translocates to the nucleus upon loss of cell-cell adhesions. *Traffic* 12, 1327-40.
- Chen, Y., Chernyavsky, A., Webber, R. J., Grando, S. A. and Wang, P. H. (2015). Critical role of FcRn in the pathogenic action of anti-mitochondrial autoantibodies synergizing with anti-desmoglein autoantibodies in pemphigus vulgaris. *J Biol Chem*.
- Chernyavsky, A. I., Arredondo, J., Kitajima, Y., Sato-Nagai, M. and Grando, S. A. (2007). Desmoglein versus non-desmoglein signaling in pemphigus acantholysis: characterization of novel signaling pathways downstream of pemphigus vulgaris antigens. *J Biol Chem* 282, 13804-12.
- Chernyavsky, A. I., Arredondo, J., Piser, T., Karlsson, E. and Grando, S. A. (2008). Differential coupling of M1 muscarinic and alpha7 nicotinic receptors to inhibition of pemphigus acantholysis. *J Biol Chem* 283, 3401-8.
- Chu, D. H. (2008). Overview of biology, development, and structure of skin. New York: McGraw-Hill.
- Cirillo, N., Cozzani, E., Carrozzo, M. and Grando, S. A. (2012). Urban legends: pemphigus vulgaris. *Oral Dis* 18, 442-58.
- Cirillo, N., Lanza, A. and Prime, S. S. (2010). Induction of hyper-adhesion attenuates autoimmune-induced keratinocyte cell-cell detachment and processing of adhesion molecules via mechanisms that involve PKC. *Exp Cell Res* 316, 580-92.
- Cirillo, N., Lanza, M., Rossiello, L., Gombos, F. and Lanza, A. (2007). Defining the involvement of proteinases in pemphigus vulgaris: evidence of matrix metalloproteinase-9 overexpression in experimental models of disease. *J Cell Physiol* 212, 36-41.
- Coons, A. H. (1958). Fluorescent antibody methods. *Gen Cytochem Methods* 1, 399-422.
- Cosen-Binker, L. I. and Kapus, A. (2006). Cortactin: the gray eminence of the cytoskeleton. *Physiology (Bethesda)* 21, 352-61.

- Coulombe, P. A. and Wong, P. (2004). Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds. *Nat Cell Biol* 6, 699-706.
- Creton, R., Kreiling, J. A. and Jaffe, L. F. (1999). Calcium imaging with chemiluminescence. *Microsc Res Tech* 46, 390-7.
- Daly, R. J. (2004). Cortactin signalling and dynamic actin networks. *Biochem J* 382, 13-25.
- Dehner, C., Rötzer, V., Waschke, J. and Spindler, V. (2014). A desmoplakin point mutation with enhanced keratin association ameliorates pemphigus vulgaris autoantibody-mediated loss of cell cohesion. *Am J Pathol* 184, 2528-36.
- Delva, E., Jennings, J. M., Calkins, C. C., Kottke, M. D., Faundez, V. and Kowalczyk, A. P. (2008). Pemphigus vulgaris IgG-induced desmoglein-3 endocytosis and desmosomal disassembly are mediated by a clathrin- and dynamin-independent mechanism. *J Biol Chem* 283, 18303-13.
- Delva, E., Tucker, D. K. and Kowalczyk, A. P. (2009). The desmosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a002543.
- Demlehner, M. P., Schafer, S., Grund, C. and Franke, W. W. (1995). Continual assembly of half-desmosomal structures in the absence of cell contacts and their frustrated endocytosis: a coordinated Sisyphus cycle. *J Cell Biol* 131, 745-60.
- Desai, B. V., Harmon, R. M. and Green, K. J. (2009). Desmosomes at a glance. *J Cell Sci* 122, 4401-7.
- Dmochowski, M., Hashimoto, T., Chidgey, M. A., Yue, K. K., Wilkinson, R. W., Nishikawa, T. and Garrod, D. R. (1995). Demonstration of antibodies to bovine desmocollin isoforms in certain pemphigus sera. *Br J Dermatol* 133, 519-25.
- Dong, L., Chapline, C., Mousseau, B., Fowler, L., Ramsay, K., Stevens, J. L. and Jaken, S. (1995). 35H, a sequence isolated as a protein kinase C binding protein, is a novel member of the adducin family. *J Biol Chem* 270, 25534-40.
- dos Remedios, C. G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I. V., Tsubakihara, M., Berry, D. A. and Nosworthy, N. J. (2003). Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev* 83, 433-73.
- Dubash, A. D. and Green, K. J. (2011). Desmosomes. *Curr Biol* 21, R529-31.
- Duden, R. and Franke, W. W. (1988). Organization of desmosomal plaque proteins in cells growing at low calcium concentrations. *J Cell Biol* 107, 1049-63.
- Esaki, C., Seishima, M., Yamada, T., Osada, K. and Kitajima, Y. (1995). Pharmacologic evidence for involvement of phospholipase C in pemphigus IgG-induced inositol 1,4,5-trisphosphate generation, intracellular calcium increase, and plasminogen activator secretion in DJM-1 cells, a squamous cell carcinoma line. *J Invest Dermatol* 105, 329-33.
- Evangelista, F., Dasher, D. A., Diaz, L. A., Prisanh, P. S. and Li, N. (2008). E-cadherin is an additional immunological target for pemphigus autoantibodies. *J Invest Dermatol* 128, 1710-8.
- Evans, J. V., Ammer, A. G., Jett, J. E., Bolcato, C. A., Breaux, J. C., Martin, K. H., Culp, M. V., Gannett, P. M. and Weed, S. A. (2012). Src binds cortactin through an SH2 domain cystine-mediated linkage. *J Cell Sci* 125, 6185-97.
- Evans, W. H. and Martin, P. E. (2002). Gap junctions: structure and function (Review). *Mol Membr Biol* 19, 121-36.
- Farb, R. M., Dykes, R. and Lazarus, G. S. (1978). Anti-epidermal-cell-surface pemphigus antibody detaches viable epidermal cells from culture plates by activation of proteinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 459-63.

- Fincham, V. J. and Frame, M. C. (1998). The catalytic activity of Src is dispensable for translocation to focal adhesions but controls the turnover of these structures during cell motility. *EMBO J* 17, 81-92.
- Fletcher, D. A. and Mullins, R. D. (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 463, 485-92.
- Foisner, R. and Wiche, G. (1991). Intermediate filament-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 3, 75-81.
- Franke, W. W. (2009). Discovering the molecular components of intercellular junctions--a historical view. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a003061.
- Fuchs, E., Esteves, R. A. and Coulombe, P. A. (1992). Transgenic mice expressing a mutant keratin 10 gene reveal the likely genetic basis for epidermolytic hyperkeratosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6906-10.
- Fukata, Y., Oshiro, N., Kinoshita, N., Kawano, Y., Matsuoka, Y., Bennett, V., Matsuura, Y. and Kaibuchi, K. (1999). Phosphorylation of adducin by Rho-kinase plays a crucial role in cell motility. *J Cell Biol* 145, 347-61.
- Gardner, K. and Bennett, V. (1987). Modulation of spectrin-actin assembly by erythrocyte adducin. *Nature* 328, 359-62.
- Gardner, K. a. B., V. (1986). A new erythrocyte membrane-associated protein with calmodulin binding activity. identification and purification. *J. Biol. Chem.* 261, 1339-1348.
- Garrod, D. (2010). Desmosomes in vivo. *Dermatol Res Pract* 2010, 212439.
- Garrod, D. and Chidgey, M. (2008). Desmosome structure, composition and function. *Biochim Biophys Acta* 1778, 572-87.
- Garrod, D. and Kimura, T. E. (2008). Hyper-adhesion: a new concept in cell-cell adhesion. *Biochem Soc Trans* 36, 195-201.
- Garrod, D. R. (2013). The assay that defines desmosome hyper-adhesion. *J Invest Dermatol* 133, 576-7.
- Garrod, D. R., Berika, M. Y., Bardsley, W. F., Holmes, D. and Taberner, L. (2005). Hyper-adhesion in desmosomes: its regulation in wound healing and possible relationship to cadherin crystal structure. *J Cell Sci* 118, 5743-54.
- Garrod, D. R., Merritt, A. J. and Nie, Z. (2002a). Desmosomal adhesion: structural basis, molecular mechanism and regulation (Review). *Mol Membr Biol* 19, 81-94.
- Garrod, D. R., Merritt, A. J. and Nie, Z. (2002b). Desmosomal cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 14, 537-45.
- Getsios, S., Huen, A. C. and Green, K. J. (2004). Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 271-81.
- Getsios, S., Waschke, J., Borradori, L., Hertl, M. and Müller, E. J. (2010). From cell signaling to novel therapeutic concepts: international pemphigus meeting on advances in pemphigus research and therapy. *J Invest Dermatol* 130, 1764-8.
- Gliem, M., Heupel, W. M., Spindler, V., Harms, G. S. and Waschke, J. (2010). Actin reorganization contributes to loss of cell adhesion in pemphigus vulgaris. *Am J Physiol Cell Physiol* 299, C606-13.
- Gloushankova, N. A., Wakatsuki, T., Troyanovsky, R. B., Elson, E. and Troyanovsky, S. M. (2003). Continual assembly of desmosomes within stable intercellular contacts of epithelial A-431 cells. *Cell Tissue Res* 314, 399-410.
- Godsel, L. M., Dubash, A. D., Bass-Zubek, A. E., Amargo, E. V., Klessner, J. L., Hobbs, R. P., Chen, X. and Green, K. J. (2010). Plakophilin 2 couples actomyosin remodeling to desmosomal plaque assembly via RhoA. *Mol Biol Cell* 21, 2844-59.

- Godsel, L. M., Getsios, S., Huen, A. C. and Green, K. J. (2004). The molecular composition and function of desmosomes. *Handb Exp Pharmacol*, 137-93.
- Godsel, L. M., Hobbs, R. P. and Green, K. J. (2008). Intermediate filament assembly: dynamics to disease. *Trends Cell Biol* 18, 28-37.
- Godsel, L. M., Hsieh, S. N., Amargo, E. V., Bass, A. E., Pascoe-McGillicuddy, L. T., Huen, A. C., Thorne, M. E., Gaudry, C. A., Park, J. K., Myung, K. et al. (2005). Desmoplakin assembly dynamics in four dimensions: multiple phases differentially regulated by intermediate filaments and actin. *J Cell Biol* 171, 1045-59.
- Goldman, R. D., Grin, B., Mendez, M. G. and Kuczmarski, E. R. (2008). Intermediate filaments: versatile building blocks of cell structure. *Curr Opin Cell Biol* 20, 28-34.
- Goodwin, L., Hill, J. E., Raynor, K., Raszi, L., Manabe, M. and Cowin, P. (1990). Desmoglein shows extensive homology to the cadherin family of cell adhesion molecules. *Biochem Biophys Res Commun* 173, 1224-30.
- Goodwin, M. and Yap, A. S. (2004). Classical cadherin adhesion molecules: coordinating cell adhesion, signaling and the cytoskeleton. *J Mol Histol* 35, 839-44.
- Grando, S. A. (2012). Pemphigus autoimmunity: hypotheses and realities. *Autoimmunity* 45, 7-35.
- Green, K. J., Bohringer, M., Gocken, T. and Jones, J. C. (2005). Intermediate filament associated proteins. *Adv Protein Chem* 70, 143-202.
- Green, K. J., Getsios, S., Troyanovsky, S. and Godsel, L. M. (2010). Intercellular junction assembly, dynamics, and homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000125.
- Green, K. J. and Simpson, C. L. (2007). Desmosomes: new perspectives on a classic. *J Invest Dermatol* 127, 2499-515.
- Groves, R. W. (2009). Pemphigus: a brief review. *Clin Med* 9, 371-5.
- Gumbiner, B., Stevenson, B. and Grimaldi, A. (1988). The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. *J Cell Biol* 107, 1575-87.
- Gumbiner, B. M. (1993). Breaking through the tight junction barrier. *J Cell Biol* 123, 1631-3.
- Gumbiner, B. M. (2005). Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 622-34.
- Hall, A. (1994). Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* 10, 31-54.
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509-14.
- Hanakawa, Y., Matsuyoshi, N. and Stanley, J. R. (2002). Expression of desmoglein 1 compensates for genetic loss of desmoglein 3 in keratinocyte adhesion. *J Invest Dermatol* 119, 27-31.
- Harris, T. J. and Tepass, U. (2010). Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 502-14.
- Hartlieb, E., Kempf, B., Partilla, M., Vigh, B., Spindler, V. and Waschke, J. (2013). Desmoglein 2 is less important than desmoglein 3 for keratinocyte cohesion. *PLoS One* 8, e53739.
- Hartlieb, E., Rötzer, V., Radeva, M., Spindler, V. and Waschke, J. (2014). Desmoglein 2 compensates for desmoglein 3 but does not control cell adhesion via regulation of p38 mitogen-activated protein kinase in keratinocytes. *J Biol Chem* 289, 17043-17053.
- Hashimoto, K. and Lever, W. F. (1967). An electron microscopic study on pemphigus vulgaris of the mouth and the skin with special reference to the intercellular cement. *J Invest Dermatol* 48, 540-52.

- Hashimoto, K., Shafran, K. M., Webber, P. S., Lazarus, G. S. and Singer, K. H. (1983). Anti-cell surface pemphigus autoantibody stimulates plasminogen activator activity of human epidermal cells. A mechanism for the loss of epidermal cohesion and blister formation. *J Exp Med* 157, 259-72.
- Helwani, F. M., Kovacs, E. M., Paterson, A. D., Verma, S., Ali, R. G., Fanning, A. S., Weed, S. A. and Yap, A. S. (2004). Cortactin is necessary for E-cadherin-mediated contact formation and actin reorganization. *J Cell Biol* 164, 899-910.
- Heng, Y. W. and Koh, C. G. (2010). Actin cytoskeleton dynamics and the cell division cycle. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 1622-33.
- Hennings, H. and Holbrook, K. A. (1983). Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture. An ultrastructural study. *Exp Cell Res* 143, 127-42.
- Herrmann, H., Bar, H., Kreplak, L., Strelkov, S. V. and Aebi, U. (2007). Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 562-73.
- Hertl, M. (2000). Humoral and cellular autoimmunity in autoimmune bullous skin disorders. *Int Arch Allergy Immunol* 122, 91-100.
- Heupel, W. M., Engerer, P., Schmidt, E. and Waschke, J. (2009a). Pemphigus vulgaris IgG cause loss of desmoglein-mediated adhesion and keratinocyte dissociation independent of epidermal growth factor receptor. *Am J Pathol* 174, 475-85.
- Heupel, W. M., Müller, T., Efthymiadis, A., Schmidt, E., Drenckhahn, D. and Waschke, J. (2009b). Peptides targeting the desmoglein 3 adhesive interface prevent autoantibody-induced acantholysis in pemphigus. *J Biol Chem* 284, 8589-95.
- Heupel, W. M., Zillikens, D., Drenckhahn, D. and Waschke, J. (2008). Pemphigus vulgaris IgG directly inhibit desmoglein 3-mediated transinteraction. *J Immunol* 181, 1825-34.
- Hobbs, R. P., Amargo, E. V., Somasundaram, A., Simpson, C. L., Prakriya, M., Denning, M. F. and Green, K. J. (2011). The calcium ATPase SERCA2 regulates desmoplakin dynamics and intercellular adhesive strength through modulation of PKC $\alpha$  signaling. *FASEB J* 25, 990-1001.
- Hobbs, R. P. and Green, K. J. (2012). Desmoplakin regulates desmosome hyperadhesion. *J Invest Dermatol* 132, 482-5.
- Holthofer, B., Windoffer, R., Troyanovsky, S. and Leube, R. E. (2007). Structure and function of desmosomes. *Int Rev Cytol* 264, 65-163.
- Homberg, M., Ramms, L., Schwarz, N., Dreissen, G., Leube, R. E., Merkel, R., Hoffmann, B. and Magin, T. M. (2015). Distinct impact of two keratin mutations causing epidermolysis bullosa simplex on keratinocyte adhesion and stiffness. *J Invest Dermatol*.
- Hu, C. H., Michel, B. and Schiltz, J. R. (1978). Epidermal acantholysis induced in vitro by pemphigus autoantibody. An ultrastructural study. *Am J Pathol* 90, 345-62.
- Huber, F., Boire, A., Lopez, M. P. and Koenderink, G. H. (2015). Cytoskeletal crosstalk: when three different personalities team up. *Curr Opin Cell Biol* 32, 39-47.
- Huber, O. (2003). Structure and function of desmosomal proteins and their role in development and disease. *Cell Mol Life Sci* 60, 1872-90.
- Huen, A. C., Park, J. K., Godsel, L. M., Chen, X., Bannon, L. J., Amargo, E. V., Hudson, T. Y., Mongiu, A. K., Leigh, I. M., Kelsell, D. P. et al. (2002). Intermediate filament-membrane attachments function synergistically with actin-dependent contacts to regulate intercellular adhesive strength. *J Cell Biol* 159, 1005-17.
- Hughes, C. A. and Bennett, V. (1995). Adducin: a physical model with implications for function in assembly of spectrin-actin complexes. *J Biol Chem* 270, 18990-6.

- Inohara, S., Tatsumi, Y., Cho, H., Tanaka, Y. and Sagami, S. (1990). Actin filament and desmosome formation in cultured human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 282, 210-2.
- Ishii, K., Harada, R., Matsuo, I., Shirakata, Y., Hashimoto, K. and Amagai, M. (2005). In vitro keratinocyte dissociation assay for evaluation of the pathogenicity of anti-desmoglein 3 IgG autoantibodies in pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol* 124, 939-46.
- Izawa, I. and Inagaki, M. (2006). Regulatory mechanisms and functions of intermediate filaments: a study using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *Cancer Sci* 97, 167-74.
- Janmey, P. A. (1995). Cell membranes and the cytoskeleton. Amsterdam: Elsevier.
- Jennings, J. M., Tucker, D. K., Kottke, M. D., Saito, M., Delva, E., Hanakawa, Y., Amagai, M. and Kowalczyk, A. P. (2011). Desmosome disassembly in response to pemphigus vulgaris IgG occurs in distinct phases and can be reversed by expression of exogenous Dsg3. *J Invest Dermatol* 131, 706-18.
- Johnson, J. L., Najor, N. A. and Green, K. J. (2014). Desmosomes: regulators of cellular signaling and adhesion in epidermal health and disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4, a015297.
- Jolly, P. S., Berkowitz, P., Bektas, M., Lee, H. E., Chua, M., Diaz, L. A. and Rubenstein, D. S. (2010). p38MAPK signaling and desmoglein-3 internalization are linked events in pemphigus acantholysis. *J Biol Chem* 285, 8936-41.
- Kaiser, H. W., O'Keefe, E. and Bennett, V. (1989). Adducin: Ca<sup>++</sup>-dependent association with sites of cell-cell contact. *J Cell Biol* 109, 557-69.
- Kanitakis, J. (2002). Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol* 12, 390-9; quiz 400-1.
- Kim, S. and Coulombe, P. A. (2007). Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. *Genes Dev* 21, 1581-97.
- Kimura, K., Fukata, Y., Matsuoka, Y., Bennett, V., Matsuura, Y., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Kaibuchi, K. (1998). Regulation of the association of adducin with actin filaments by Rho-associated kinase (Rho-kinase) and myosin phosphatase. *J Biol Chem* 273, 5542-8.
- Kimura, T. E., Merritt, A. J. and Garrod, D. R. (2007). Calcium-independent desmosomes of keratinocytes are hyper-adhesive. *J Invest Dermatol* 127, 775-81.
- Kirmse, R., Portet, S., Mucke, N., Aebi, U., Herrmann, H. and Langowski, J. (2007). A quantitative kinetic model for the in vitro assembly of intermediate filaments from tetrameric vimentin. *J Biol Chem* 282, 18563-72.
- Kitajima, Y. (2002). Mechanisms of desmosome assembly and disassembly. *Clin Exp Dermatol* 27, 684-90.
- Kitajima, Y. (2013). New insights into desmosome regulation and pemphigus blistering as a desmosome-remodeling disease. *Kaohsiung J Med Sci* 29, 1-13.
- Kitajima, Y. (2014). 150(th) anniversary series: Desmosomes and autoimmune disease, perspective of dynamic desmosome remodeling and its impairments in pemphigus. *Cell Commun Adhes* 21, 269-80.
- Kitajima, Y., Aoyama, Y. and Seishima, M. (1999). Transmembrane signaling for adhesive regulation of desmosomes and hemidesmosomes, and for cell-cell detachment induced by pemphigus IgG in cultured keratinocytes: involvement of protein kinase C. *J Invest Dermatol Symp Proc* 4, 137-44.
- Kneisel, A. and Hertl, M. (2011a). Autoimmune bullous skin diseases. Part 1: Clinical manifestations. *J Dtsch Dermatol Ges* 9, 844-56; quiz 857.



- Kneisel, A. and Hertl, M. (2011b). Autoimmune bullous skin diseases. Part 2: diagnosis and therapy. *J Dtsch Dermatol Ges* 9, 927-47.
- Koch, P. J. and Franke, W. W. (1994). Desmosomal cadherins: another growing multigene family of adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* 6, 682-7.
- Koch, P. J., Mahoney, M. G., Ishikawa, H., Pulkkinen, L., Uitto, J., Shultz, L., Murphy, G. F., Whitaker-Menezes, D. and Stanley, J. R. (1997). Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris. *J Cell Biol* 137, 1091-102.
- Koch, P. J., Walsh, M. J., Schmelz, M., Goldschmidt, M. D., Zimbelmann, R. and Franke, W. W. (1990). Identification of desmoglein, a constitutive desmosomal glycoprotein, as a member of the cadherin family of cell adhesion molecules. *Eur J Cell Biol* 53, 1-12.
- Kölsch, A., Windoffer, R. and Leube, R. E. (2009). Actin-dependent dynamics of keratin filament precursors. *Cell Motil Cytoskeleton* 66, 976-85.
- Kölsch, A., Windoffer, R., Wurflinger, T., Aach, T. and Leube, R. E. (2010). The keratin-filament cycle of assembly and disassembly. *J Cell Sci* 123, 2266-72.
- Korman, N. J., Eyre, R. W., Klaus-Kovtun, V. and Stanley, J. R. (1989). Demonstration of an adhering-junction molecule (plakoglobin) in the autoantigens of pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris. *N Engl J Med* 321, 631-5.
- Kottke, M. D., Delva, E. and Kowalczyk, A. P. (2006). The desmosome: cell science lessons from human diseases. *J Cell Sci* 119, 797-806.
- Kröger, C., Loschke, F., Schwarz, N., Windoffer, R., Leube, R. E. and Magin, T. M. (2013). Keratins control intercellular adhesion involving PKC-alpha-mediated desmoplakin phosphorylation. *J Cell Biol* 201, 681-92.
- Kuhlman, P. A., Hughes, C. A., Bennett, V. and Fowler, V. M. (1996). A new function for adducin. Calcium/calmodulin-regulated capping of the barbed ends of actin filaments. *J Biol Chem* 271, 7986-91.
- Kunda, P. and Baum, B. (2009). The actin cytoskeleton in spindle assembly and positioning. *Trends Cell Biol* 19, 174-9.
- Kusumi, A., Suzuki, K. and Koyasako, K. (1999). Mobility and cytoskeletal interactions of cell adhesion receptors. *Curr Opin Cell Biol* 11, 582-90.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Lecuit, T. and Yap, A. S. (2015). E-cadherin junctions as active mechanical integrators in tissue dynamics. *Nat Cell Biol* 17, 533-9.
- Lee, S. H. and Dominguez, R. (2010). Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells. *Mol Cells* 29, 311-25.
- Lever, W. F. (1953). Pemphigus. *Medicine (Baltimore)* 32, 1-123.
- Lewis, J. E., Jensen, P. J. and Wheelock, M. J. (1994). Cadherin function is required for human keratinocytes to assemble desmosomes and stratify in response to calcium. *J Invest Dermatol* 102, 870-7.
- Lewis, J. E., Wahl, J. K., 3rd, Sass, K. M., Jensen, P. J., Johnson, K. R. and Wheelock, M. J. (1997). Cross-talk between adherens junctions and desmosomes depends on plakoglobin. *J Cell Biol* 136, 919-34.

- Li, X., Matsuoka, Y. and Bennett, V. (1998). Adducin preferentially recruits spectrin to the fast growing ends of actin filaments in a complex requiring the MARCKS-related domain and a newly defined oligomerization domain. *J Biol Chem* 273, 19329-38.
- Lodish, H. B. A., Zipursky SL, et al. (2000). *Molecular Cell Biology*. New York: W. H. Freeman.
- Lüllmann-Rauch, R. (2012). *Taschenlehrbuch Histologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Madison, K. C. (2003). Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *J Invest Dermatol* 121, 231-41.
- Magin, T. M., Vijayaraj, P. and Leube, R. E. (2007). Structural and regulatory functions of keratins. *Exp Cell Res* 313, 2021-32.
- Mahoney, M. G., Wang, Z., Rothenberger, K., Koch, P. J., Amagai, M. and Stanley, J. R. (1999). Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. *J Clin Invest* 103, 461-8.
- Mao, X., Li, H., Sano, Y., Gaestel, M., Mo Park, J. and Payne, A. S. (2014). MAPKAP kinase 2 (MK2)-dependent and -independent models of blister formation in pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol* 134, 68-76.
- 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. et al. (2010). Autoimmunity to desmocollin 3 in pemphigus vulgaris. *Am J Pathol* 177, 2724-30.
- Marchenko, S., Chernyavsky, A. I., Arredondo, J., Gindi, V. and Grando, S. A. (2010). Antimitochondrial autoantibodies in pemphigus vulgaris: a missing link in disease pathophysiology. *J Biol Chem* 285, 3695-704.
- Matsuoka, Y., Hughes, C. A. and Bennett, V. (1996). Adducin regulation. Definition of the calmodulin-binding domain and sites of phosphorylation by protein kinases A and C. *J Biol Chem* 271, 25157-66.
- Matsuoka, Y., Li, X. and Bennett, V. (1998). Adducin is an in vivo substrate for protein kinase C: phosphorylation in the MARCKS-related domain inhibits activity in promoting spectrin-actin complexes and occurs in many cells, including dendritic spines of neurons. *J Cell Biol* 142, 485-97.
- Matsuoka, Y., Li, X. and Bennett, V. (2000). Adducin: structure, function and regulation. *Cell Mol Life Sci* 57, 884-95.
- McLachlan, R. W. and Yap, A. S. (2007). Not so simple: the complexity of phosphotyrosine signaling at cadherin adhesive contacts. *J Mol Med (Berl)* 85, 545-54.
- Menon, M. B., Schwermann, J., Singh, A. K., Franz-Wachtel, M., Pabst, O., Seidler, U., Omary, M. B., Kotlyarov, A. and Gaestel, M. (2010). p38 MAP kinase and MAPKAP kinases MK2/3 cooperatively phosphorylate epithelial keratins. *J Biol Chem* 285, 33242-51.
- Merrifield, C. J. (2004). Seeing is believing: imaging actin dynamics at single sites of endocytosis. *Trends Cell Biol* 14, 352-8.
- Michels, C., Buchta, T., Bloch, W., Krieg, T. and Niessen, C. M. (2009). Classical cadherins regulate desmosome formation. *J Invest Dermatol* 129, 2072-5.
- Mochly-Rosen, D., Das, K. and Grimes, K. V. (2012). Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nat Rev Drug Discov* 11, 937-57.
- Mochly-Rosen, D., Khaner, H. and Lopez, J. (1991). Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3997-4000.
- Mucke, N., Kirmse, R., Wedig, T., Leterrier, J. F. and Kreplak, L. (2005). Investigation of the morphology of intermediate filaments adsorbed to different solid supports. *J Struct Biol* 150, 268-76.

- Mucke, N., Kreplak, L., Kirmse, R., Wedig, T., Herrmann, H., Aebi, U. and Langowski, J. (2004). Assessing the flexibility of intermediate filaments by atomic force microscopy. *J Mol Biol* 335, 1241-50.
- Müller, E. J., Williamson, L., Kolly, C. and Suter, M. M. (2008). Outside-in signaling through integrins and cadherins: a central mechanism to control epidermal growth and differentiation? *J Invest Dermatol* 128, 501-16.
- Murphy, G. F. (1997). *Histology of the skin*. Philadelphia:: Lippincott Williams & Wilkins.
- Nam, J. S., Ino, Y., Sakamoto, M. and Hirohashi, S. (2002). Src family kinase inhibitor PP2 restores the E-cadherin/catenin cell adhesion system in human cancer cells and reduces cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 8, 2430-6.
- Naydenov, N. G. and Ivanov, A. I. (2010). Adducins regulate remodeling of apical junctions in human epithelial cells. *Mol Biol Cell* 21, 3506-17.
- Naydenov, N. G. and Ivanov, A. I. (2011). Spectrin-adducin membrane skeleton: A missing link between epithelial junctions and the actin cytoskeleton? *Bioarchitecture* 1, 186-191.
- Nekrasova, O. and Green, K. J. (2013). Desmosome assembly and dynamics. *Trends Cell Biol* 23, 537-46.
- Nekrasova, O. E., Amargo, E. V., Smith, W. O., Chen, J., Kreitzer, G. E. and Green, K. J. (2011). Desmosomal cadherins utilize distinct kinesins for assembly into desmosomes. *J Cell Biol* 195, 1185-203.
- Nguyen, V. T., Ndoye, A. and Grando, S. A. (2000a). Novel human alpha9 acetylcholine receptor regulating keratinocyte adhesion is targeted by Pemphigus vulgaris autoimmunity. *Am J Pathol* 157, 1377-91.
- Nguyen, V. T., Ndoye, A., Shultz, L. D., Pittelkow, M. R. and Grando, S. A. (2000b). Antibodies against keratinocyte antigens other than desmogleins 1 and 3 can induce pemphigus vulgaris-like lesions. *J Clin Invest* 106, 1467-79.
- Nie, Z., Merritt, A., Rouhi-Parkouhi, M., Taberner, L. and Garrod, D. (2011). Membrane-impermeable cross-linking provides evidence for homophilic, isoform-specific binding of desmosomal cadherins in epithelial cells. *J Biol Chem* 286, 2143-54.
- Niessen, C. M. (2007). Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol* 127, 2525-32.
- Niessen, C. M., Leckband, D. and Yap, A. S. (2011). Tissue organization by cadherin adhesion molecules: dynamic molecular and cellular mechanisms of morphogenetic regulation. *Physiol Rev* 91, 691-731.
- O'Keefe, E. J., Briggaman, R. A. and Herman, B. (1987). Calcium-induced assembly of adherens junctions in keratinocytes. *J Cell Biol* 105, 807-17.
- Omary, M. B., Ku, N. O., Tao, G. Z., Toivola, D. M. and Liao, J. (2006). "Heads and tails" of intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights. *Trends Biochem Sci* 31, 383-94.
- Osada, K., Seishima, M. and Kitajima, Y. (1997). Pemphigus IgG activates and translocates protein kinase C from the cytosol to the particulate/cytoskeleton fractions in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 108, 482-7.
- Owens, D. W. and Lane, E. B. (2003). The quest for the function of simple epithelial keratins. *Bioessays* 25, 748-58.

- Owens, D. W., McLean, G. W., Wyke, A. W., Paraskeva, C., Parkinson, E. K., Frame, M. C. and Brunton, V. G. (2000). The catalytic activity of the Src family kinases is required to disrupt cadherin-dependent cell-cell contacts. *Mol Biol Cell* 11, 51-64.
- Parry, D. A. (2005). Microdissection of the sequence and structure of intermediate filament chains. *Adv Protein Chem* 70, 113-42.
- Paul, W. E. (2012). *Fundamental immunology*. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilki.
- Payne, A. S., Hanakawa, Y., Amagai, M. and Stanley, J. R. (2004). Desmosomes and disease: pemphigus and bullous impetigo. *Curr Opin Cell Biol* 16, 536-43.
- Pollard, T. D., Blanchoin, L. and Mullins, R. D. (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29, 545-76.
- Pollard, T. D. and Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-65.
- Pretel, M., Espana, A., Marquina, M., Pelacho, B., Lopez-Picazo, J. M. and Lopez-Zabalza, M. J. (2009). An imbalance in Akt/mTOR is involved in the apoptotic and acantholytic processes in a mouse model of pemphigus vulgaris. *Exp Dermatol* 18, 771-80.
- Proksch, E., Brandner, J. M. and Jensen, J. M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* 17, 1063-72.
- Qualmann, B. and Kessels, M. M. (2002). Endocytosis and the cytoskeleton. *Int Rev Cytol* 220, 93-144.
- Rafelski, S. M. and Theriot, J. A. (2004). Crawling toward a unified model of cell mobility: spatial and temporal regulation of actin dynamics. *Annu Rev Biochem* 73, 209-39.
- Ren, G., Helwani, F. M., Verma, S., McLachlan, R. W., Weed, S. A. and Yap, A. S. (2009). Cortactin is a functional target of E-cadherin-activated Src family kinases in MCF7 epithelial monolayers. *J Biol Chem* 284, 18913-22.
- Roberts, B. J., Pashaj, A., Johnson, K. R. and Wahl, J. K., 3rd. (2011). Desmosome dynamics in migrating epithelial cells requires the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res* 317, 2814-22.
- Roskoski, R., Jr. (2004). Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 324, 1155-64.
- Rötzer, V., Breit, A., Waschke, J. and Spindler, V. (2014). Adducin is required for desmosomal cohesion in keratinocytes. *J Biol Chem* 289, 14925-14940.
- Rötzer, V., Hartlieb, E., Vielmuth, F., Gliem, M., Spindler, V. and Waschke, J. (2015). E-cadherin and Src associate with extradesmosomal Dsg3 and modulate desmosome assembly and adhesion. *Cell Mol Life Sci*.
- Saito, M., Stahley, S. N., Caughman, C. Y., Mao, X., Tucker, D. K., Payne, A. S., Amagai, M. and Kowalczyk, A. P. (2012). Signaling dependent and independent mechanisms in pemphigus vulgaris blister formation. *PLoS One* 7, e50696.
- Sako, Y., Nagafuchi, A., Tsukita, S., Takeichi, M. and Kusumi, A. (1998). Cytoplasmic regulation of the movement of E-cadherin on the free cell surface as studied by optical tweezers and single particle tracking: corralling and tethering by the membrane skeleton. *J Cell Biol* 140, 1227-40.
- Saleh, M. A., Hashimoto, R., Kase, Y., Amagai, M. and Yamagami, J. (2015). Low pathogenicity of anti-desmoglein 3 immunoglobulin G autoantibodies contributes to the atypical clinical phenotypes in pemphigus. *J Dermatol* 42, 685-9.
- Samaj, J., Baluska, F., Voigt, B., Schlicht, M., Volkmann, D. and Menzel, D. (2004). Endocytosis, actin cytoskeleton, and signaling. *Plant Physiol* 135, 1150-61.

- Sambrook J., a. R. D. W. (2001). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sams, W. M., Jr. and Gammon, W. R. (1982). Mechanism of lesion production in pemphigus and pemphigoid. *J Am Acad Dermatol* 6, 431-52.
- Sanchez-Carpintero, I., Espana, A., Pelacho, B., Lopez Moratalla, N., Rubenstein, D. S., Diaz, L. A. and Lopez-Zabalza, M. J. (2004). In vivo blockade of pemphigus vulgaris acantholysis by inhibition of intracellular signal transduction cascades. *Br J Dermatol* 151, 565-70.
- Sato, M., Aoyama, Y. and Kitajima, Y. (2000). Assembly pathway of desmoglein 3 to desmosomes and its perturbation by pemphigus vulgaris-IgG in cultured keratinocytes, as revealed by time-lapsed labeling immunoelectron microscopy. *Lab Invest* 80, 1583-92.
- Schiltz, J. R. and Michel, B. (1976). Production of epidermal acantholysis in normal human skin in vitro by the IgG fraction from pemphigus serum. *J Invest Dermatol* 67, 254-60.
- Schmidt, A. and Hall, M. N. (1998). Signaling to the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 305-38.
- Schmidt, E., Brocker, E. B. and Zillikens, D. (2000). Pemphigus. Loss of desmosomal cell-cell contact. *Hautarzt* 51, 309-18.
- Schneeberger, E. E. and Lynch, R. D. (1992). Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. *Am J Physiol* 262, L647-61.
- Schnoor, M., Lai, F. P., Zarbock, A., Klaver, R., Polaschegg, C., Schulte, D., Weich, H. A., Oelkers, J. M., Rottner, K. and Vestweber, D. (2011). Cortactin deficiency is associated with reduced neutrophil recruitment but increased vascular permeability in vivo. *J Exp Med* 208, 1721-35.
- Schonwasser, D. C., Marais, R. M., Marshall, C. J. and Parker, P. J. (1998). Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Mol Cell Biol* 18, 790-8.
- Seishima, M., Esaki, C., Osada, K., Mori, S., Hashimoto, T. and Kitajima, Y. (1995). Pemphigus IgG, but not bullous pemphigoid IgG, causes a transient increase in intracellular calcium and inositol 1,4,5-triphosphate in DJM-1 cells, a squamous cell carcinoma line. *J Invest Dermatol* 104, 33-7.
- Seishima, M., Iwasaki-Bessho, Y., Itoh, Y., Nozawa, Y., Amagai, M. and Kitajima, Y. (1999). Phosphatidylcholine-specific phospholipase C, but not phospholipase D, is involved in pemphigus IgG-induced signal transduction. *Arch Dermatol Res* 291, 606-13.
- Sharma, P., Mao, X. and Payne, A. S. (2007). Beyond steric hindrance: the role of adhesion signaling pathways in the pathogenesis of pemphigus. *J Dermatol Sci* 48, 1-14.
- Shimizu, A., Ishiko, A., Ota, T., Saito, H., Oka, H., Tsunoda, K., Amagai, M. and Nishikawa, T. (2005). In vivo ultrastructural localization of the desmoglein 3 adhesive interface to the desmosome mid-line. *J Invest Dermatol* 124, 984-9.
- Shimomura, O., Johnson, F. H. and Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59, 223-39.
- Singer, K. H., Hashimoto, K., Jensen, P. J., Morioka, S. and Lazarus, G. S. (1985). Pathogenesis of autoimmunity in pemphigus. *Annu Rev Immunol* 3, 87-108.
- Sitaru, C. and Zillikens, D. (2005). Mechanisms of blister induction by autoantibodies. *Exp Dermatol* 14, 861-75.
- Snapp, E. L., Altan, N. and Lippincott-Schwartz, J. (2003). Measuring protein mobility by photobleaching GFP chimeras in living cells. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 21, Unit 21 1.

- Soderberg, O., Gullberg, M., Jarvius, M., Ridderstrale, K., Leuchowius, K. J., Jarvius, J., Wester, K., Hydbring, P., Bahram, F., Larsson, L. G. et al. (2006). Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Methods* 3, 995-1000.
- Sokol, E., Kramer, D., Diercks, G. F., Kuipers, J., Jonkman, M. F., Pas, H. H. and Giepmans, B. N. (2015). Large-scale electron microscopy maps of patient skin and mucosa provide insight into pathogenesis of blistering diseases. *J Invest Dermatol* 135, 1763-70.
- Spindler, V., Dehner, C., Hubner, S. and Waschke, J. (2014). Plakoglobin but not desmoplakin regulates keratinocyte cohesion via modulation of p38MAPK signaling. *J Invest Dermatol* 134, 1655-64.
- Spindler, V., Drenckhahn, D., Zillikens, D. and Waschke, J. (2007). Pemphigus IgG causes skin splitting in the presence of both desmoglein 1 and desmoglein 3. *Am J Pathol* 171, 906-16.
- Spindler, V., Endlich, A., Hartlieb, E., Vielmuth, F., Schmidt, E. and Waschke, J. (2011). The extent of desmoglein 3 depletion in pemphigus vulgaris is dependent on Ca(2+)-induced differentiation: a role in suprabasal epidermal skin splitting? *Am J Pathol* 179, 1905-16.
- Spindler, V., Heupel, W. M., Efthymiadis, A., Schmidt, E., Eming, R., Rankl, C., Hinterdorfer, P., Müller, T., Drenckhahn, D. and Waschke, J. (2009). Desmocollin 3-mediated binding is crucial for keratinocyte cohesion and is impaired in pemphigus. *J Biol Chem* 284, 30556-64.
- Spindler, V., Rötzer, V., Dehner, C., Kempf, B., Gliem, M., Radeva, M., Hartlieb, E., Harms, G. S., Schmidt, E. and Waschke, J. (2013). Peptide-mediated desmoglein 3 crosslinking prevents pemphigus vulgaris autoantibody-induced skin blistering. *J Clin Invest* 123, 800-11.
- Spindler, V. and Waschke, J. (2011). Role of Rho GTPases in desmosomal adhesion and pemphigus pathogenesis. *Ann Anat* 193, 177-80.
- Spindler, V. and Waschke, J. (2014). Desmosomal cadherins and signaling: lessons from autoimmune disease. *Cell Commun Adhes* 21, 77-84.
- Stahley, S. N. and Kowalczyk, A. P. (2015). Desmosomes in acquired disease. *Cell Tissue Res* 360, 439-56.
- Stahley, S. N., Saito, M., Faundez, V., Koval, M., Mattheyses, A. L. and Kowalczyk, A. P. (2014). Desmosome assembly and disassembly are membrane raft-dependent. *PLoS One* 9, e87809.
- Stanley, J. R. (2003). Pemphigus. New York: McGraw-Hill.
- Stanley, J. R. and Amagai, M. (2006). Pemphigus, bullous impetigo, and the staphylococcal scalded-skin syndrome. *N Engl J Med* 355, 1800-10.
- Stanley, J. R., Koulu, L. and Thivolet, C. (1984). Distinction between epidermal antigens binding pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus autoantibodies. *J Clin Invest* 74, 313-20.
- Stanley, J. R., Yaar, M., Hawley-Nelson, P. and Katz, S. I. (1982). Pemphigus antibodies identify a cell surface glycoprotein synthesized by human and mouse keratinocytes. *J Clin Invest* 70, 281-8.
- Strnad, P., Windoffer, R. and Leube, R. E. (2002). Induction of rapid and reversible cytokeratin filament network remodeling by inhibition of tyrosine phosphatases. *J Cell Sci* 115, 4133-48.
- Takeichi, M. (1995). Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 7, 619-27.
- Taylor, K. A. and Taylor, D. W. (1994). Formation of two-dimensional complexes of F-actin and crosslinking proteins on lipid monolayers: demonstration of unipolar alpha-actinin-F-actin crosslinking. *Biophys J* 67, 1976-83.
- Thomas, S. M. and Brugge, J. S. (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 513-609.

- Thomason, H. A., Cooper, N. H., Ansell, D. M., Chiu, M., Merrit, A. J., Hardman, M. J. and Garrod, D. R. (2012). Direct evidence that PKC $\alpha$  positively regulates wound re-epithelialization: correlation with changes in desmosomal adhesiveness. *J Pathol* 227, 346-56.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4.
- Troyanovsky, R. B., Klingelhofer, J. and Troyanovsky, S. (1999). Removal of calcium ions triggers a novel type of intercadherin interaction. *J Cell Sci* 112 ( Pt 23), 4379-87.
- Tsang, S. M., Brown, L., Gadmor, H., Gammon, L., Fortune, F., Wheeler, A. and Wan, H. (2012a). Desmoglein 3 acting as an upstream regulator of Rho GTPases, Rac-1/Cdc42 in the regulation of actin organisation and dynamics. *Exp Cell Res* 318, 2269-83.
- Tsang, S. M., Brown, L., Lin, K., Liu, L., Piper, K., O'Toole, E. A., Grose, R., Hart, I. R., Garrod, D. R., Fortune, F. et al. (2012b). Non-junctional human desmoglein 3 acts as an upstream regulator of Src in E-cadherin adhesion, a pathway possibly involved in the pathogenesis of pemphigus vulgaris. *J Pathol* 227, 81-93.
- Tsang, S. M., Liu, L., Teh, M. T., Wheeler, A., Grose, R., Hart, I. R., Garrod, D. R., Fortune, F. and Wan, H. (2010). Desmoglein 3, via an interaction with E-cadherin, is associated with activation of Src. *PLoS One* 5, e14211.
- Tsukita, S., Oishi, K., Akiyama, T., Yamanashi, Y., Yamamoto, T. and Tsukita, S. (1991). Specific proto-oncogenic tyrosine kinases of src family are enriched in cell-to-cell adherens junctions where the level of tyrosine phosphorylation is elevated. *J Cell Biol* 113, 867-79.
- Tsunoda, K., Ota, T., Aoki, M., Yamada, T., Nagai, T., Nakagawa, T., Koyasu, S., Nishikawa, T. and Amagai, M. (2003). Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. *J Immunol* 170, 2170-8.
- Vasioukhin, V., Bauer, C., Yin, M. and Fuchs, E. (2000). Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell* 100, 209-19.
- Vasioukhin, V., Bowers, E., Bauer, C., Degenstein, L. and Fuchs, E. (2001). Desmoplakin is essential in epidermal sheet formation. *Nat Cell Biol* 3, 1076-85.
- Vasioukhin, V. and Fuchs, E. (2001). Actin dynamics and cell-cell adhesion in epithelia. *Curr Opin Cell Biol* 13, 76-84.
- Vassar, R., Coulombe, P. A., Degenstein, L., Albers, K. and Fuchs, E. (1991). Mutant keratin expression in transgenic mice causes marked abnormalities resembling a human genetic skin disease. *Cell* 64, 365-80.
- Vielmuth, F., Waschke, J. and Spindler, V. (2015). Loss of desmoglein binding is not sufficient for keratinocyte dissociation in pemphigus. *J Invest Dermatol*.
- Wallis, S., Lloyd, S., Wise, I., Ireland, G., Fleming, T. P. and Garrod, D. (2000). The alpha isoform of protein kinase C is involved in signaling the response of desmosomes to wounding in cultured epithelial cells. *Mol Biol Cell* 11, 1077-92.
- Waschke, J. (2008). The desmosome and pemphigus. *Histochem Cell Biol* 130, 21-54.
- Waschke, J. and Spindler, V. (2014). Desmosomes and extradesmosomal adhesive signaling contacts in pemphigus. *Med Res Rev*. 34:1127-45.
- Waschke, J., Spindler, V., Bruggeman, P., Zillikens, D., Schmidt, G. and Drenckhahn, D. (2006). Inhibition of Rho A activity causes pemphigus skin blistering. *J Cell Biol* 175, 721-7.
- Watt, F. M., Matthey, D. L. and Garrod, D. R. (1984). Calcium-induced reorganization of desmosomal components in cultured human keratinocytes. *J Cell Biol* 99, 2211-5.

- Weaver, A. M., Karginov, A. V., Kinley, A. W., Weed, S. A., Li, Y., Parsons, J. T. and Cooper, J. A. (2001). Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Curr Biol* 11, 370-4.
- Weed, S. A., Karginov, A. V., Schafer, D. A., Weaver, A. M., Kinley, A. W., Cooper, J. A. and Parsons, J. T. (2000). Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex. *J Cell Biol* 151, 29-40.
- Weed, S. A. and Parsons, J. T. (2001). Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly. *Oncogene* 20, 6418-34.
- Welsch, U., Kummer, W. and Deller, T. (2014). Lehrbuch Histologie. München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
- Wickett, R. R. and Visscher, M. O. (2006). Structure and function of the epidermal barrier. *Am J Infect Control* 34, 94-110.
- Wilgram, G. F., Caulfield, J. B. and Lever, W. F. (1961). An electron microscopic study of acantholysis in pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol* 36, 373-82.
- Winder, S. J. and Ayscough, K. R. (2005). Actin-binding proteins. *J Cell Sci* 118, 651-4.
- Windoffer, R., Borchert-Stuhltrager, M. and Leube, R. E. (2002). Desmosomes: interconnected calcium-dependent structures of remarkable stability with significant integral membrane protein turnover. *J Cell Sci* 115, 1717-32.
- Windoffer, R., Wöll, S., Strnad, P. and Leube, R. E. (2004). Identification of novel principles of keratin filament network turnover in living cells. *Mol Biol Cell* 15, 2436-48.
- Wöll, S., Windoffer, R. and Leube, R. E. (2005). Dissection of keratin dynamics: different contributions of the actin and microtubule systems. *Eur J Cell Biol* 84, 311-28.
- Wöll, S., Windoffer, R. and Leube, R. E. (2007). p38 MAPK-dependent shaping of the keratin cytoskeleton in cultured cells. *J Cell Biol* 177, 795-807.
- Wu, Y., Kanchanawong, P. and Zaidel-Bar, R. (2015). Actin-delimited adhesion-independent clustering of e-cadherin forms the nanoscale building blocks of adherens junctions. *Dev Cell* 32, 139-54.
- Yamamoto, Y., Aoyama, Y., Shu, E., Tsunoda, K., Amagai, M. and Kitajima, Y. (2007). Anti-desmoglein 3 (Dsg3) monoclonal antibodies deplete desmosomes of Dsg3 and differ in their Dsg3-depleting activities related to pathogenicity. *J Biol Chem* 282, 17866-76.
- Yancey, K. B. (2005). The pathophysiology of autoimmune blistering diseases. *J Clin Invest* 115, 825-8.
- Yap, A. S., Brieher, W. M. and Gumbiner, B. M. (1997). Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 119-46.
- Yin, T. and Green, K. J. (2004). Regulation of desmosome assembly and adhesion. *Semin Cell Dev Biol* 15, 665-77.
- Yonemura, S. (2011). Cadherin-actin interactions at adherens junctions. *Curr Opin Cell Biol* 23, 515-22.
- Yonemura, S., Itoh, M., Nagafuchi, A. and Tsukita, S. (1995). Cell-to-cell adherens junction formation and actin filament organization: similarities and differences between non-polarized fibroblasts and polarized epithelial cells. *J Cell Sci* 108 ( Pt 1), 127-42.
- Yonemura, S., Wada, Y., Watanabe, T., Nagafuchi, A. and Shibata, M. (2010). Alpha-Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. *Nat Cell Biol* 12, 533-42.



Zhang, J., Betson, M., Erasmus, J., Zeikos, K., Bailly, M., Cramer, L. P. and Braga, V. M. (2005). Actin at cell-cell junctions is composed of two dynamic and functional populations. *J Cell Sci* 118, 5549-62.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau eines Desmosoms .....	4
Abbildung 2: Aufbau eines Adhärenskontakts .....	6
Abbildung 3: Klinischer Phänotyp und histologisches Präparat von PV-Patienten.....	14
Abbildung 4: Expressionsmuster von Dsg1 und Dsg3 in der humanen Epidermis (links) und der Schleimhaut (rechts) .....	17
Abbildung 5: Mechanismen des Zell-Zell-Haftungsverlusts in der Pemphigus-Pathogenese.....	21
Abbildung 6: Untersuchung der Adducin-Expression in HaCaT-Zellen .....	50
Abbildung 7: Fragmentierung des kortikalen Actinrings nach $\alpha$ - bzw. $\gamma$ -Adducin-siRNA Transfektion .....	51
Abbildung 8: Verlust von $\alpha$ - bzw. $\gamma$ -Adducin reduziert die interzelluläre Haftung .....	52
Abbildung 9: siRNA-induzierte Adducin-Depletion reduziert die Expression von desmosomalen Dsg3, nicht aber von Proteinen weiterer Interzellularkontakte .....	53
Abbildung 10: siRNA-vermittelte E-Cadherin-Depletion führt zum Zell-Zell-Haftungsverlust.....	55
Abbildung 11: siRNA-vermittelte $\alpha$ -Adducin-Depletion reduziert den zytoskelettal-gebundenen Dsg3-Proteingehalt.....	56
Abbildung 12: Endosomaler Abbau der Dsg3-Molekülen wird nicht durch Transfektion von $\alpha$ -Adducin-siRNA moduliert.....	57
Abbildung 13: siRNA-induzierte $\alpha$ -Adducin-Depletion reduziert die Mobilität der Dsg3-Moleküle in der Membran .....	59
Abbildung 14: siRNA-induzierte E-Cadherin-Depletion reduziert die zytoskelettale Verankerung von Dsg3.....	60
Abbildung 15: E-Cadherin interagiert mit Zytoskelett-gebundenem Dsg3.....	62
Abbildung 16: Src reguliert die Komplexbildung zwischen E-Cadherin und Dsg3 .....	64
Abbildung 17: Src-Aktivität ist für die Verankerung von Dsg3 am Zytoskelett notwendig.....	66
Abbildung 18: Cortactin-Defizienz verursacht eine interzellulären Haftungsverlust.....	69
Abbildung 19: Cortactin liegt als Komplex mit Dsg3 in HaCaT-Zellen vor.....	70
Abbildung 20: Effekte von PV-Antikörpern auf die Verteilung und Phosphorylierung von $\alpha$ -Adducin sowie die Aktivität von RhoA .....	73
Abbildung 21: RhoA verhindert den PV-IgG-induzierten Haftungsverlust abhängig von der Phosphorylierung von $\alpha$ -Adducin an Serin726.....	75
Abbildung 22: Phosphorylierungsdefizientes $\alpha$ -Adducin verstärkt die pathogenen Effekte von AK23 auf die Fragmentierung von Dsg3.....	77

Abbildung 23: Die Rollen von $\alpha$ -Adducin und p38MAPK bei den AK23-induzierten Effekten sind unabhängig voneinander .....	79
Abbildung 24: Die Phosphorylierung von $\alpha$ -Adducin nach PV-IgG-Inkubation ist von $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und PKC abhängig.....	81
Abbildung 25: Inhibition von PKC sowie des $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms verhindert den durch PV-IgG induzierten Zell-Zell-Haftungsverlust.....	82
Abbildung 26: PKC $\alpha$ ist nach GFP-DPmut Expression vermehrt an Rack1 gebunden.....	83
Abbildung 27: TP-Behandlung reduziert die durch PV-IgG-und AK23-induzierte Retraktion der Keratinfilamente.....	84
Abbildung 28: Spezifische Aktivierung von p38MAPK führt zur Retraktion der Keratinfilamente	86
Abbildung 29: Schematische Darstellung der drei Komplexe mit Dsg3, die während der Assemblierung und Reifung der Desmosomen relevant sein könnten.....	93
Abbildung 30: Schematische Darstellung der potentiellen Bedeutung von Adducin für die Regulation der desmosomalen Haftung .....	96

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der Zelllinien .....	24
Tabelle 2: Auflistung der Oligonukleotid.....	24
Tabelle 3: Auflistung der Plasmid-DNA .....	25
Tabelle 4: Auflistung der siRNA.....	25
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Primärantikörper .....	25
Tabelle 6: Auflistung der Sekundärantikörper und Fluorophor-gekoppelten Substanzen .....	27
Tabelle 7: Auflistung der Mediatoren .....	28
Tabelle 8: Auflistung kommerzieller Reaktionssysteme .....	28
Tabelle 9: Auflistung der Chemikalien.....	29
Tabelle 10: Auflistung der Agarosepartikel .....	32
Tabelle 11: Auflistung der Puffer und Lösungen.....	32
Tabelle 12: Pipettierschema des PCR-Reaktionsansatzes.....	38
Tabelle 13: PCR Programm der Genotypisierung.....	41

## Publikationsverzeichnis

### Originalarbeiten

Spindler, V, Rötzer V, Dehner C, Kempf B, Gliem M, Radeva M, Hartlieb E, Harms GS, Schmidt E, Waschke J (2013).

Peptide-mediated desmoglein 3 crosslinking prevents pemphigus vulgaris autoantibody-induced skin blistering

*Journal of Clinical Investigation*, 123(2): 800-811; doi:10.1172

Rötzer, V, Breit A, Waschke J, Spindler V (2014).

Adducin is required for desmosomal cohesion in keratinocytes

*Journal of Biological Chemistry*, 289(21):14925-14940; doi: 10.1074

Hartlieb E, Rötzer V, Radeva M, Spindler V, Waschke J (2014).

Desmoglein 2 compensates for desmoglein 3 but does not control cell adhesion via regulation of p38 mitogen-activated protein kinase in keratinocytes

*Journal of Biological Chemistry*, 289(24): 17043-17053; doi: 10.1074

Dehner C, Rötzer V, Waschke J, Spindler V (2014).

A desmoplakin point mutation with enhanced keratin association ameliorates pemphigus vulgaris autoantibody-mediated loss of cell cohesion

*American Journal of Pathology*, 184(9): 2528-2536; doi: 10.1016

Rötzer V, Hartlieb E, Vielmuth F, Gliem M, Spindler V, Waschke J (2015)

E-cadherin and Src associate with extradesmosomal Dsg3 and modulate desmosome assembly and adhesion

*Journal of Cellular and Molecular Life Sciences*, epub doi: 10.1007/s00018-015-1977-0

Rötzer V\*, Hartlieb E\*, Winkler J, Walther E, Schlipp A, Miklos Sardy, Spindler V, Waschke J (2015)

Desmoglein 3 inhibits keratinocyte migration by suppressing p38MAPK activity

*Journal of Investigative Dermatology*, doi: 10.1038/jid.2015.380

Schinner C, Schlipp A, Rötzer V, Hartlieb E, Messoudi A, Horn A, Vielmuth F, Spindler V, Waschke J (2015)

Adrenergic signaling strengthens cardiomyocyte cohesion; eingereicht

Rötzer V, Egu D, Waschke J (2015)

Meibomian gland cells display a differentiation-dependent composition of desmosomes;  
eingereicht

\*gleichberechtigte Autorenschaft

### **Kongressbeiträge**

Rötzer V, Waschke J, Spindler V (2012)

Adducin modulates intercellular keratinocyte adhesion

*107. Jahrestagung, Anatomische Gesellschaft, 23.03.-26.03.2012, Frankfurt, Deutschland*

*Poster (Posterpreis)*

Rötzer V, Waschke J, Spindler V (2013)

Pemphigus and the actin cytoskeleton – role of adducin and RhoA

*108. Jahrestagung, Anatomische Gesellschaft, 22.03.-25.03.2013, Magdeburg, Deutschland*

*Vortrag*

Rötzer V, Waschke J, Spindler V (2013)

Adducin modulates intercellular keratinocyte adhesion

*Experimental Biology, 20.04.-24.04.2013, Boston, USA*

*Poster*

Rötzer V, Waschke J, Spindler V (2014)

Mechanisms of adducin-dependent regulation of desmosomal adhesion

*109. Jahrestagung, Anatomische Gesellschaft, 25.09.-27.09.2014, Salzburg, Österreich*

*Vortrag*

Rötzer V, Hartlieb E., Waschke J, Spindler V (2015)

Loss of desmoglein 3 promotes p38MAPK-dependent keratinocyte migration

*110. Jahrestagung, Anatomische Gesellschaft, 23.09.-25.09.2015, Würzburg, Deutschland*

*Poster (Posterpreis)*

## Danksagung

Zunächst danke ich herzlich Herrn Prof. Hans Straka für die Betreuung meiner Promotionsarbeit und die Erstellung des Erstgutachtens. Weiterhin bedanke ich mich sehr bei Frau Prof. Anja Horn-Bochtler für die Übernahme der Zweitbegutachtung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Jens Waschke und Prof. Volker Spindler für die Bereitstellung der interessanten Promotionsthematik, die fachliche Betreuung, die Finanzierung, die Motivation und stets konstruktive Kritik. Vielen Dank für die Möglichkeit, auf nationalen und internationalen Kongressen teilzunehmen und als wissenschaftliche Mitarbeiterin auch weiterhin am Institut für Anatomie und Zellbiologie tätig sein zu können.

Bei Herrn Dr. Andreas Breit bedanke ich mich herzlich für die Möglichkeit am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie die Calciummessungen durchführen zu können und für die vielen interessanten und fachlichen Gespräche.

Ferner bedanke ich mich bei Herrn Dr. Miklós Sardy für die Bereitstellung der PV-Patientenbilder.

Besonders danken möchte ich dem gesamten Laborteam für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielen schönen Stunden in und nach der Arbeit. Dem gesamten Team an technischen Mitarbeiterinnen danke ich herzlich-ohne euch ginge es nicht. Mein besonderer Dank gebührt Dr. Mariya Radeva, Dr. Daniela Kugelmann, Dr. Eva Arnold und Martina Hitzenbichler für eure Unterstützung, Motivation und die vielen schönen Momente.

Weiterhin danke ich herzlich allen Mitarbeitern der Anatomischen Anstalt, jedoch mit Nachdruck Cathleen Plietz für die sorgfältige und liebevolle Betreuung der Mäuse im Tierstall.

Mein ganz besonderer und aufrichtiger Dank geht an Flo, der mir stets den Rücken freihält und mit seiner unerschütterlichen Liebe an meiner Seite steht-stay forever young.

Auch möchte ich mich herzlich bei Eva, Felicia und Flo für das gewissenhafte Korrekturlesen dieser Arbeit danken.

Mein größter Dank gebührt jedoch meiner Familie-meinen Eltern und meinen Geschwistern Paul, Jannis und Anne sowie meiner Nichte Hannah, die mit ihrer grenzenlosen Zuversicht und Liebe immer für mich da sind.