

cAMP als protektiver Faktor bei der desmosomalen Adhäsion in Keratinozyten: Bedeutung von Flotillinen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Lisa Pilz
aus Bad Wildungen

Gießen 2025

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Biochemisches Institut

Gutachterin und Betreuerin: Prof. Dr. Ritva Tikkanen

Gutachter/in: Prof. Dr. Andreas Jung

Tag der Disputation: 19.01.2026

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	AUFBAU UND FUNKTION DER HAUTDECKE.....	1
1.2	ZELLVERBINDUNGEN.....	2
1.3	DESMOSOMEN.....	3
1.3.1	<i>Struktureller Aufbau der Desmosomen</i>	<i>4</i>
1.3.2	<i>Molekularer Aufbau der desmosomalen Cadherine.....</i>	<i>5</i>
1.3.3	<i>Gewebespezifische Expression der desmosomalen Cadherine und deren Assoziation mit Erkrankungen.....</i>	<i>6</i>
1.4	PEMPHIGUS-ERKRANKUNGEN.....	7
1.4.1	<i>Pathogenese des Pemphigus vulgaris</i>	<i>8</i>
1.4.2	<i>Diagnostik des Pemphigus vulgaris.....</i>	<i>11</i>
1.4.3	<i>Therapie und Prognose des Pemphigus vulgaris.....</i>	<i>12</i>
1.4.4	<i>Anti-Dsg3 Antikörper in der Pemphigusforschung.....</i>	<i>13</i>
1.5	FLOTILLINE.....	14
1.5.1	<i>Entdeckung und Vorkommen der Flotilline.....</i>	<i>14</i>
1.5.2	<i>Molekulare Struktur von Flotillinen.....</i>	<i>15</i>
1.5.3	<i>Die Funktionen von Flotillinen</i>	<i>16</i>
1.5.3.1	<i>Phosphorylierung von Flotillinen</i>	<i>17</i>
1.5.3.2	<i>Bedeutung der Flotilline für die desmosomale Adhäsion.....</i>	<i>17</i>
1.6	ZYKLISCHES ADENOSINMONOPHOSPHAT (cAMP).....	19
1.6.1	<i>Signaltransduktionswege von cAMP.....</i>	<i>19</i>
1.6.2	<i>cAMP-vermittelte protektive Wirkung auf die desmosomale Adhäsion</i>	<i>22</i>
1.7	ZIELE DER ARBEIT	24
2	MATERIAL	25
2.1	TECHNISCHE GERÄTE	25
2.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	26
2.3	CHEMIKALIEN UND PUFFER.....	27
2.4	ENZYME	30
2.5	ANTIBIOTIKA	30
2.6	ANTIKÖRPER.....	31
2.7	ZELLINIEN.....	32
2.8	COMPUTERPROGRAMME FÜR BILDERBEARBEITUNG, STATISTISCHE ANALYSEN UND GRAPHENDESIGN	33

3	METHODEN	35
3.1	ZELLBIOLOGISCHE STANDARDMETHODEN.....	35
3.1.1	<i>Kultivierung der hTert, HaCaT und AK23-Hybridoma Zelllinien</i>	<i>35</i>
3.1.2	<i>Passagieren der Zelllinien hTert und HaCaT</i>	<i>35</i>
3.1.3	<i>Zellzählung und Aussäen in Zellkulturplatten.....</i>	<i>36</i>
3.1.4	<i>Kryokonservierung von Zellen</i>	<i>36</i>
3.1.5	<i>Behandlung der Zellen mit anti-Dsg3- und Kontroll- (Ktrl) IgG-Antikörpern.....</i>	<i>37</i>
3.1.6	<i>Modulation des cAMP-Spiegels mit Forskolin und Rolipram</i>	<i>37</i>
3.1.7	<i>Gewinnung aus Einzelzellklonen</i>	<i>37</i>
3.1.8	<i>Monolayer-Dissoziationsassay</i>	<i>38</i>
3.2	BIOCHEMISCHEN METHODEN.....	40
3.2.1	<i>Herstellung der Zelllysate.....</i>	<i>40</i>
3.2.2	<i>Proteinbestimmung nach Bradford.....</i>	<i>41</i>
3.2.3	<i>SDS-PAGE und Western Blot zur Proteincharakterisierung.....</i>	<i>41</i>
3.2.4	<i>Messung des cAMP-Spiegels</i>	<i>43</i>
3.3	AUFREINIGUNG VON MAK23 UND KONTROLLANTIKÖRPERN.....	43
3.4	INDIREKTE IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG UND MIKROSKOPIE	45
3.5	BILDBEARBEITUNG UND STATISTISCHE AUSWERTUNG	46
4	ERGEBNISSE	48
4.1	ETABLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER FLOTILLIN-KNOCKOUT hTERT- UND HACAT-KERATINOZYTEN.....	48
4.1.1	<i>Validierung der Flotillin-Expression in hTert-Keratinozyten mittels WB.....</i>	<i>48</i>
4.1.2	<i>Validierung der Flotillin-Expression in hTert-Keratinozyten mittels IF.....</i>	<i>50</i>
4.1.3	<i>Gewinnung von Einzelzellklonen mit Knockout von Flot2 oder Flot1/2</i>	<i>51</i>
4.1.4	<i>Charakterisierung der neu generierten hTert-Zelllinien.....</i>	<i>54</i>
4.1.5	<i>Validierung von Flotillin-Expression in HaCaT-Keratinozyten.....</i>	<i>55</i>
4.2	PROTEKTIVER EFFEKT VON CAMP AUF DIE MONOLAYERSTABILITÄT VON hTERT-WT- UND HACAT-WT-KERATINOZYTEN.....	57
4.2.1	<i>Behandlung mit Forskolin/Rolipram führt zur Induktion von cAMP in hTert-Zellen.....</i>	<i>57</i>
4.2.2	<i>cAMP-Erhöhung reduziert den anti-Dsg3-induzierten Adhäsionsverlust von hTert-WT-Keratinozyten</i>	<i>58</i>
4.2.3	<i>cAMP-Erhöhung hat keinen Effekt auf den durch mAK23-induzierten Dsg3-Abbau.....</i>	<i>59</i>
4.2.4	<i>Behandlung mit Forskolin/Rolipram reduziert den anti-Dsg3 induzierten Adhäsionsverlust von HaCaT-WT-Keratinozyten</i>	<i>61</i>
4.2.5	<i>Behandlung mit mAK23 und Forskolin/Rolipram hat keinen Effekt auf Dsg- und Flot-Expression in HaCaT-WT-Keratinzyten</i>	<i>62</i>

4.3	ROLLE VON FLOTILLINEN IM cAMP-INDUZIERTEN PROTEKTIVEN MECHANISMUS	64
4.3.1	<i>Effekt von erhöhtem cAMP auf die Monolayerstabilität von Flotillin-Knockout hTert-Keratinocyten</i>	64
4.3.2	<i>Beteiligung von Flotillinen am cAMP-vermittelten Mechanismus zur Verhinderung des mAK23-induzierten Verlustes der Zell-Zell-Adhäsion in hTert-Zellen.....</i>	65
4.3.3	<i>Expression von Dsgs und Flots nach Behandlung mit mAK23 und Forskolin/Rolipram in Flot-KO-Keratinocyten</i>	68
4.3.4	<i>Beteiligung von Flot am cAMP-vermittelten Mechanismus zur Verhinderung des mAK23-induzierten Verlustes der Zell-Zell-Adhäsion in HaCaT-Zellen.....</i>	70
4.4	EINFLUSS DER PHOSPHORYLIERUNG VON FLOT2 AN TYR163 AUF DIE MONOLAYERSTABILITÄT IN KERATINOZYTEN	73
4.4.1	<i>Charakterisierung der HaCaT Flot2-KO-Zelllinien mit Überexpression von Flot2-WT oder Y163F-Mutante</i>	73
4.4.2	<i>Bedeutung der Tyr163-Phosphorylierung für die Monolayerstabilität</i>	74
5	DISKUSSION	78
5.1	DIE hTERT- UND HACAT-ZELLINIEN ALS MODELLSYSTEME ZUR UNTERSUCHUNG DER DESMOSOMALEN ADHÄSION	78
5.1.1	<i>Generierung einer neuen Flot2-KO hTert-Keratinocyten Zelllinie.....</i>	79
5.2	MONOKLONALE ANTI-DSG3 ANTIKÖRPER ALS WERTVOLLE WERKZEUGE IN DER PEMPHIGUSFORSCHUNG	80
5.3	PROTEKTIVER EFFEKT VON cAMP AUF DIE MONOLAYERSTABILITÄT IN hTERT- UND HACAT-KERATINOZYTEN.....	81
5.3.1	<i>Die cAMP-Erhöhung schützt die hTert- und HaCaT-Keratinocyten vor mAK23-induzierten desmosomalem Adhäsionsverlust.....</i>	81
5.3.2	<i>Effekt von cAMP auf die Dsg- und Flot-Expression</i>	82
5.4	FLOT2 IST OBLIGATORISCH FÜR DEN PROTEKTIVEN cAMP-MECHANISMUS IM ZUSAMMENHANG MIT DEM DURCH MAK23 INDUZIERTEN VERLUST DER ZELL-ZELL-ADHÄSION IN hTERT- UND HACAT-KERATINOZYTEN	84
5.5	BEDEUTUNG DER TYR-PHOSPHORYLIERUNG AN POSITION 163 IN FLOT2 FÜR DIE AUFRECHTERHALTUNG DER ZELLMONOLAYER-STABILITÄT	86
5.6	MÖGLICHE ROLLE VON FLOTILLINEN IM cAMP-VERMITTELTEN SCHUTZMECHANISMUS.....	88
5.7	AUSBLICK	92
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	95
7	SUMMARY.....	96
8	VERZEICHNIS.....	97

8.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	97
8.2	TABELLENVERZEICHNIS	101
8.3	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	102
8.4	LITERATURVERZEICHNIS.....	104
9	ANHANG	104
9.1	NUTZUNGSGENEHMIGUNG VON ABBILDUNGEN.....	123
10	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	124
11	DANKSAGUNG.....	125

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der Hautdecke

Die menschliche Hautdecke, auch als *Integumentum commune* bezeichnet, bildet die äußere Körperoberfläche und fungiert als Schutzbarriere gegenüber der Umwelt. Sie setzt sich aus der Kutis (Haut) und der darunterliegenden Subkutis (Unterhaut, *Tela subcutanea*) zusammen. Das *Integumentum commune* schützt das Körperinnere vor mechanischen Verletzungen, mikrobiellen Infektionen, UV-Strahlung, transepidermale Wasserverlust sowie extremer Hitze und Kälte. Darüber hinaus sind die Sinnesorgane in der Haut lokalisiert, die für die Wahrnehmung von Reizen wie Tast-, Druck-, Schmerz- und Vibrationssinne verantwortlich sind. Neben dem Hautkomplex aus Keratinozyten enthält die Haut eine Vielzahl weiterer struktureller und funktioneller Komponenten. Dazu zählen Blutgefäße, Nervenendigungen, Thermorezeptoren, Mechanorezeptoren und Hautanhangsgebilde wie Haare, Nägel, Talg-, Schweiß- und Brustdrüsen.

Histologisch betrachtet kann die Kutis in eine epitheliale Schicht, die Epidermis (Oberhaut), und in eine bindegewebige Schicht, die Dermis (Lederhaut), unterteilt werden (Welsch et al. 2022). Die Epidermis besteht aus einem verhornenden, mehrschichtigen Plattenepithel aus Keratinozyten und kann in vier verschiedene Schichten differenziert werden. Direkt angrenzend an die Dermis liegt die Basallamina mit dem einschichtigen *Stratum basale* (Baroni et al. 2012). Die prismatischen Zellen sind für den Zellausschub verantwortlich. Die Stammzellen und Progenitorzellen sind hier lokalisiert, daher sind meist Mitoseformen zu finden. Darüber liegt das *Stratum spinosum*, welches aus zwei bis fünf Zellschichten stachelartiger Zellen besteht. In dieser Schicht beginnt allmählich der Prozess der Verhornung (Keratinisierung). Die darauffolgende Schicht, das *Stratum granulosum* (Körnerschicht), besteht aus zwei bis drei Zellschichten. Die Keratinozyten enthalten basophile Keratohyalin granula, die eine zentrale Rolle im Verhornungsprozess spielen. Das außenliegende *Stratum corneum* (Hornschicht) besteht aus flachen, kernlosen Keratinozyten. Die Zellen durchlaufen einen kontinuierlichen Regenerationsprozess von der Basalschicht bis zur Hornschicht, wobei die abgestorbenen Keratinozyten kontinuierlich abgeschilfert werden (Lüllmann-Rauch 2015). Der gesamte Zyklus kann zwei bis drei Wochen dauern, bis eine basale kubische Zelle die vier Schichten durchlaufen hat (Blanpain und Fuchs 2009).

Die Keratinozyten der Epidermis sind über eine Vielzahl interzellulärer Verbindungen miteinander und mit der Basallamina verbunden. Zu den wichtigsten Zell-Zell-Kontakten

gehören Desmosomen, die die mechanische Stabilität der Epidermis sicherstellen, sowie Tight Junctions, Zonula adhärens, Fokalkontakte und die Gap Junctions, die den Zellverband stabilisieren und den interzellulären Stoffaustausch regulieren (Lüllmann-Rauch 2015).

Die Dermis ist über die dermo-epidermale Verbindungszone fest mit der Epidermis verbunden. Diese Verbindung wird durch zapfenförmige Fortsätze (Papillen) verstärkt, die in die Epidermis hineinragen, um makroskopisch zusätzliche Haftung zu erzeugen. Histologisch kann die Dermis in das *Stratum papillare* und *Stratum reticulare* eingeteilt werden. Das *Stratum papillare* besteht aus lockerem und elastischem Bindegewebe, welches in den Papillen der Dermis lokalisiert ist. Die Papillen enthalten Kapillaren, sensorische Nervenendigungen sowie Lymphgefäße und sind entscheidend für den Stoffaustausch zwischen Dermis und Epidermis. Das darunter folgende *Stratum reticulare* besteht aus straffem, geflechtartigem Bindegewebe, das eine hohe Reißfestigkeit und Dehnungsbeständigkeit der Haut gewährleistet (Lüllmann-Rauch 2015; Yang et al. 2015).

Die Subkutis besteht aus lockerem Bindegewebe und Fettgewebe, in denen Nerven und Blutgefäße verlaufen. Die Schicht bildet eine Verbindung zwischen der Kutis und den tieferliegenden Strukturen wie Periost und Faszien. Ihre Hauptfunktionen bestehen darin, als mechanisches Polster zu dienen, eine Verschiebbarkeit der Haut gegenüber darunterliegenden Strukturen zu ermöglichen und die Wärmeisolation des Körpers zu unterstützen. Die Subkutis enthält zudem Fettdepots, die als Energiespeicher dienen (Lüllmann-Rauch 2015; Schünke et al. 2022).

1.2 Zellverbindungen

Die Zellverbindungen lassen sich in drei Gruppen aufteilen: Haft-, Verschluss- und Kommunikationskontakte. Die Haftkontakte dienen der mechanischen Verankerung zwischen den Zellen sowie der Verankerung der Zelle mit der Extrazellulärmatrix. Zu den Haftkontakten zählen die Desmosomen, die Zonula adhärens, die Hemidesmosomen und die Fokalkontakte. Die allgemeine Baustruktur der Haftkontakte besteht aus den verbindenden Transmembranproteinen und Plaque-Proteinen, die die Anbindung an die Filamente des Zytoskeletts vermitteln (Lüllmann-Rauch 2015). Zu den interzellulären Zellverbindungen zählen die Haftkontakte Desmosomen, die Zonula adhärens und die Verschlusskontakte Tight Junctions. Beide Arten von Haftkontakten besitzen Proteine der

Cadherin-Familie als Transmembranproteine. Cadherine benötigen extrazelluläres Calcium, um eine Verbindung zur Nachbarzelle einzugehen (Beckert et al. 2019; Chitav und Troyanovsky 1997). Die Zonula adhärens bildet einen gürtelförmigen Zellkontakt aus, der die Zelle von allen Seiten verbindet. Das Transmembranprotein E-Cadherin (im Epithel) bindet an die Plaue, die aus Cateninen (α , β , p120), α -Actinin und Vinculin besteht. Diese Plaue vermittelt die Verbindung zu den Aktinfilamenten des Zytoskeletts (Hartsock und Nelson 2008; Niessen 2007).

Zu den Verschlusskontakten zählen die Tight Junctions, die aus verschiedenen Proteinen wie Claudinen, Occludinen und Zonula occludens (ZO)-Proteinen bestehen. Die Proteine bilden Barrieren zwischen benachbarten Zellen, indem sie sich miteinander verbinden, um eine dichte Versiegelung der Zellzwischenräume zu schaffen und die Durchlässigkeit zwischen den Zellen zu regulieren. Die Zell-Zell-Verbindungen unterliegen einem kontinuierlichen Umbau, der aktiv durch intra- und interzelluläre Signaltransduktionswege induziert werden kann (Green et al. 2010).

Zu den Zell-Matrixkontakten zählen die Hemidesmosomen und die Fokalkontakte. Die Hemidesmosomen sind für die Verankerung der Zelle an die Basalmembran verantwortlich. Integrine fungieren als transmembranäre Verbindungsproteine, die die extrazelluläre Matrix über Plaueproteine der Plasmamembran mit der Lamina densa der Basalmembran koppeln. Die Lamina densa wird durch Kollagen VII an die Kollagenfibrillen des Bindegewebes vernetzt. Auf der zytoplasmatischen Seite sind die Hemidesmosomen mit den Intermediärfilamenten (z.B. Keratin) an Plaueproteine wie Plektin und BP230 verankert (Walko et al. 2015). Die Fokalkontakte sind dynamische Zell-Matrix-Verbindungen, die in beweglichen Zellen vorkommen. Die intrazelluläre Plaue beinhaltet α -Actinin, Vinculin und Talin, die mit den Aktinfilamenten verbunden sind (Wehrle-Haller 2012).

1.3 Desmosomen

Desmosomen sind essenziell für die mechanische Stabilität der Zell-Zell-Verbindungen und lassen sich im Gegensatz zu den anderen Zellverbindungen ultrastrukturell im Elektronenmikroskop darstellen (Delva et al. 2009). Desmosomen kommen in mechanisch belasteten Geweben wie in Epithelien, Herzmuskelzellen, Harnblase, gastrointestinale Mukosa, dendritischen Zellen der Lymphfollikel und Meningealzellen der weichen Hirnhaut vor (Delva et al. 2009; Getsios et al. 2004; Holthöfer et al. 2007).

1.3.1 Struktureller Aufbau der Desmosomen

Elektronenmikroskopisch lassen sich drei Hauptbereiche des Desmosoms unterscheiden: die extrazelluläre Kernregion, die äußere dichte Plaque und die innere dichte Plaque (**Abb. 1**). Die durchschnittliche Breite des desmosomalen Kontakts beträgt etwa 300 nm, wobei ein Spalt von 20 bis 40 nm durch fadenförmige Strukturen, die extrazellulären Domänen der Cadherine, überbrückt wird (Holthöfer et al. 2007; Lüllmann-Rauch et al. 2015). Der extrazelluläre Bereich wird von Desmogleinen (Dsg) und Desmocollinen (Dsc) aus der desmosomalen Cadherin-Familie gebildet, wobei vier Isoformen von Dsg1-4 und drei Isoformen von Dsc1-3 bekannt sind. Diese transmembranären Glykoproteine vermitteln Calcium-abhängige homo- oder heterophile Bindungen (Angst et al. 2001).

Es wurde gezeigt, dass Desmosomen unter mechanischen Stress eine calciumunabhängige Hyperadhäsion ausbilden können. Die Regulation erfolgt über intrazelluläre Signalwege, insbesondere durch die Proteinkinase C (PKC) (Kimura et al. 2007). Der extrazelluläre Anteil der Cadherine besteht aus vier Domänen (EC1-4), gefolgt von der extrazellulären Ankerdomäne EA. Das zytoplasmatische Ende der Cadherin-Proteine assoziiert im Zellinneren mit der äußeren Plaque (Nollet et al. 2000). Die äußere Plaque besteht aus Plakoglobin (PG) und Plakophilin (PKP), beides Mitglieder der Armadillo-Familie. Das PG fungiert als Verbindungsglied zwischen dem zytoplasmatischen Ende der desmosomalen Cadherine und Desmoplakin (DP). Außerdem ist PG an intrazellulären Signaltransduktionsvorgängen involviert und reguliert die laterale Interaktion sowie die Größe der Desmosomen (Wahl et al. 1996). Das PKP, von dem drei Haupttypen mit insgesamt fünf Isoformen bekannt sind, dient ebenfalls als Verbindungsglied zwischen den desmosomalen Cadherinen, PG, DP und den Intermediärfilamenten (Garrod und Chidgey 2008). Das DP, ein Mitglied der Plakin-Familie in der inneren Plaque, interagiert mit PG und PKP und stellt die Verbindung der Desmosomen mit den Keratin-Intermediärfilamenten des zytoskelettalen Netzwerkes in Epithelzellen her. In Kardiomyozyten interagiert DP mit den Desmin-Intermediärfilamenten und in Arachnoidalzellen sowie follikulären dendritischen Zellen mit Vimentin-Intermediärfilamenten (Delva et al. 2009; Getsios et al. 2004; Holthöfer et al. 2007).

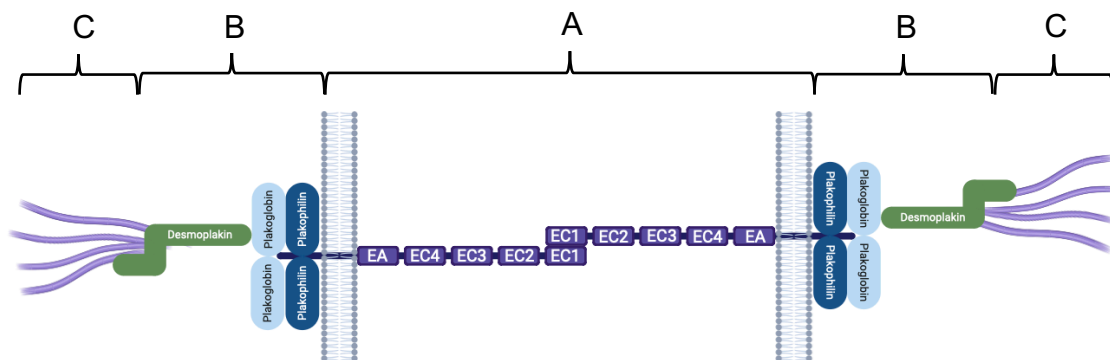


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Strukturkomponenten des Desmosoms (modifiziert nach Delva et al. 2009 und erstellt mit BioRender (<https://BioRender.com>))

Desmosomen bestehen aus drei Komponenten, den desmosomalen Cadherine mit fünf extrazellulären Domänen (EC1-5) (A) und den zwei intrazellulären Domänen (B und C). Der extrazelluläre Teil bindet außerhalb der Zelle mit einem anderen Cadherin-Protein auf hetero- oder homophilerweise, welche Calciumabhängig ist. (B) Die dichte desmosomale Plaque kann in einen äußeren Teil, bestehend aus Plakophilin (PKP) und Plakoglobin (PG), und in einen inneren Bereich, bestehend aus Desmoplakin (DP), eingeteilt werden. (C) Die Intermediärfilamente, Bestandteile des intrazellulären Zytoskeletts, strahlen in die innere dichte Plaque ein.

1.3.2 Molekularer Aufbau der desmosomalen Cadherine

Die Gene von *Dsc1-3* und *Dsg1-4* sind auf dem q-Arm des Chromosoms 18 lokalisiert. Es gibt drei separate *Dsc*-Gene, die jeweils durch alternatives Spleißen eine „a“- und eine „b“-Isoform aufweisen (Abb. 2). Die desmosomalen Cadherine bestehen aus vier extrazellulären Domänen (EC1-4), gefolgt von der extrazellulären Ankerdomäne EA, die proximal an die membranumspannende Region, die Transmembrandomäne (TM), anknüpft. Die intrazelluläre Ankerdomäne (IA) wird durch eine intrazelluläre Cadherin-ähnliche Sequenz (ICS) ergänzt, die in den Spleißvarianten der *Dsc* „a“ sowie in den *Dsg*-Proteinen vorkommt. An die ICS-Domäne von *Dsg* und *Dsc* kann PG binden (Mathur et al. 1994). Die Spleißvarianten der *Dsc* „b“ besitzen eine verkürzte ICS-Domäne und enden mit zusätzlichen 11 Aminosäuren in *Dsc1* und *Dsc2* bzw. acht Aminosäuren in *Dsc3*, die in der „a“-Form nicht vorhanden sind (Kowalczyk und Green 2013). Die zytoplasmatischen Domänen der *Dsg*-Proteine enthalten zusätzlich Segmente, darunter einen kurzen, intrazellulären, prolinreichen Linker (IPL), variable Wiederholungseinheiten-Domänen (RUD), sowie eine Desmoglein-spezifische terminale Domäne (DTD) (Getsios et al. 2004; Holthöfer et al. 2007).

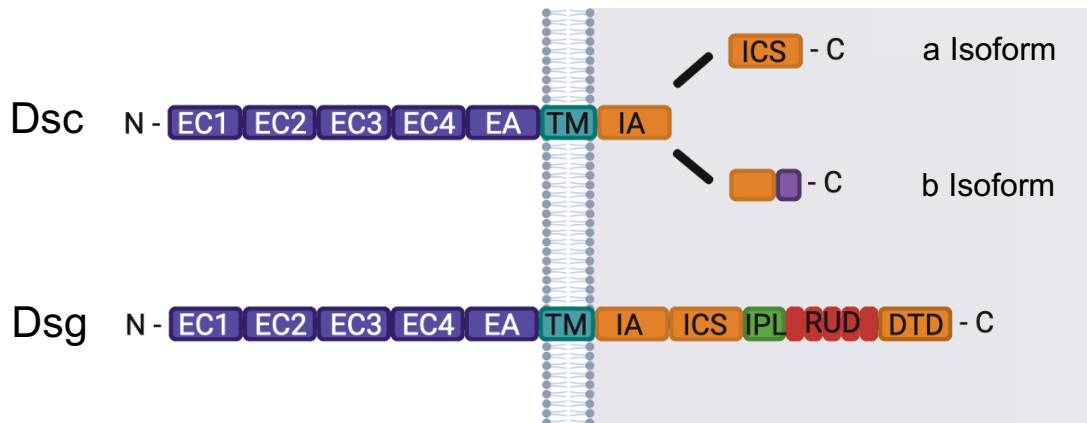


Abbildung 2: Schematische Darstellung der desmosomalen Cadherine (modifiziert nach Getsios et al. 2004 und erstellt mit BioRender (<https://BioRender.com>))

Die Dsc und Dsg besitzen beide vier extrazelluläre Domäne (EC1-4) mit einer membranproximalen Domäne (EA), die an die Transmembrandomäne (TM) bindet. An dem intrazellulären Anker (IA) folgt die Cadherin-ähnliche Sequenz (ICS). Die Dsg besitzen zusätzliche Sequenzen mit teilweise unbekannt Funktionen, wie die prolinreiche Linkerregion (IPL), die Wiederholungseinheits-Domäne (RUD) und eine Desmoglein-Terminaldomäne (DTD). Die Dsc weisen durch Alternatives Spleißen eine „a“- und eine „b“-Isoform auf. Die „a“-Isoform enthält ebenfalls die ICS-Domäne, während die „b“-Spleißvariante die ICS-Domäne verkürzt und mit zusätzlichen 11 Aminosäuren in Dsc1 und Dsc2 bzw. acht Aminosäuren in Dsc3 enthält.

1.3.3 Gewebespezifische Expression der desmosomalen Cadherine und deren Assoziation mit Erkrankungen

Desmosomen zeigen eine strukturelle und funktionelle Vielfalt, die sowohl die Gewebedifferenzierung als auch die Entstehung von Krankheitsbildern beeinflussen kann. Erkrankungen, die durch genetische Mutationen oder Autoimmunreaktionen gegen spezifische desmosomale Komponenten verursacht werden, betreffen häufig nur bestimmte desmosomenhaltige Gewebe. Beispielsweise kommt Dsg1 u.a. in der Schleimhaut des Uterus, des Magens, des Darms und in den Epithelien von Haut, Leber und Pankreas vor, während Dsc1 hauptsächlich im Darm und in der Leber exprimiert wird. Die Dsc2 und Dsg2 werden hingegen in allen desmosomenhaltigen Geweben exprimiert. Daher enthalten das Gewebe wie der Dickdarm und der Herzmuskel ausschließlich Dsc2 und Dsg2 (Waschke 2008). In der Epidermis werden alle sieben desmosomalen Cadherine differenzierungsspezifisch exprimiert, wobei Dsg2, Dsg3,

Dsc2 und Dsc3 in den unteren Epidermisschichten und Dsg1, Dsg4, Dsc1 und Dsg4 in den oberen Schichten vorkommen (Holthöfer et al. 2007). Die desmosomale Adhäsion kann durch genetische Defekte, bakterielle Toxine oder die Bindung von Autoantikörpern, wie sie bei der Autoimmunerkrankung Pemphigus v.a. gegen Dsg1 und/oder Dsg3 auftreten, beeinträchtigt werden (Waschke 2008). Obwohl in Karzinomen wie Plattenepithel-, Magen-, Darm- und Brustkarzinomen veränderte Expression von Dsg2/Dsc2 und Dsg3/Dsc3 nachgewiesen wurden, konnten keine Mutationen der Desmosomen festgestellt werden (Bazzi und Christiano 2007).

1.4 Pemphigus-Erkrankungen

Pemphigus zählt zu den seltenen blasenbildenden Autoimmunerkrankungen, die v.a. die Haut und die Schleimhäute betrifft. Als Auslöser binden Autoantikörper, größtenteils vom Typ IgG, an die Oberflächenstrukturen der Keratinozyten, die für die Hautbarriere verantwortlich sind. Als Folge kommt es zum Verlust der intraepidermalen Adhäsion, die sich klinisch als Blasen und Erosionen äußern (Amagai et al. 1991). Die Erkrankung wird daher als Pemphigus bezeichnet, da diese von dem griechischen Wort *pemphix* (zu Deutsch „Blase“) stammt. (Kneisel und Hertl 2011a).

Die häufigsten intraepidermalen Pemphiguserkrankungen sind Pemphigus vulgaris (PV) und Pemphigus foliaceus (PF) (Singer et al. 1985). Die Inzidenz variiert abhängig von der Region. Beispielsweise liegt die jährliche Inzidenz von Pemphigus vulgaris in Deutschland bei 1 bis 2 Fällen pro 1.000.000 Einwohner, während Südeuropäer eine bis zu neunmal höhere Inzidenz aufweisen (Hahn-Ristic et al. 2002; Zhao et al. 2023). Der Erkrankungsspeak tritt bei beiden Geschlechtern zwischen dem 4. und 6. Lebensjahrzehnt auf, jedoch sind auch Kinder und ältere Patienten betroffen (Porro et al. 2019). Die genaue Ursache für die Entstehung von Pemphigus ist noch unklar, allerdings kommen bestimmte Medikamente (Penicillinamin, Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE)-Hemmer, Pyrazolonderivate, Cephalosporine und Rifampicin) sowie andere Faktoren wie Verbrennungen, UV-Strahlung, Röntgenexposition oder genetische Prädisposition als mögliche Auslöser in Frage (Bystryn und Rudolph 2005; Ruocco et al. 2013).

Pemphigus vulgaris ist die häufigste Form, welche die Schleimhäute (z.B. Mund, Nase, Pharynx, Larynx, Konjunktiva, Genitalien) als auch die Epidermis betreffen kann. Es entstehen schmerzhaft Blasen, die häufig nach dem Zerplatzen als Erosionen auf der Haut und/oder den Schleimhäuten verbleiben (Kneisel und Hertl 2011a). Da auch

Pharynx, Larynx und Nasenschleimhäute betroffen sein können, weisen die Patienten auch häufig Symptome von Heiserkeit, Epistaxis und Schwierigkeiten beim Schlucken auf. Pemphigus foliaceus ist die zweithäufigste und mildere Form und betrifft hauptsächlich die Haut (insbesondere Gesicht, Kopfhaut und Oberkörper), ohne die Schleimhäute zu beeinträchtigen (Amagai und Stanley 2012; Porro et al. 2019).

1.4.1 Pathogenese des Pemphigus vulgaris

Beutner und Jordan konnten im Jahr 1964 zum ersten Mal mit der indirekten Immunfluoreszenz zeigen, dass die Antikörper aus Seren der PV-Patienten an die Oberfläche der Zellen des mehrschichtigen Plattenepithels, insbesondere im *Stratum spinosum*, binden (Beutner und Jordon 1964). Das Immunsystem produziert Autoantikörper überwiegend vom Immunglobulin Typ IgG, welche unter anderem an Dsg1 und/oder Dsg3 binden (Amagai et al. 1991). Es kommt zur Akantholyse zwischen den Keratinozyten, die ihre Zell-Zell-Verbindungen verlieren (**Abb. 3**). Histologisch ist eine intraepidermale Spaltbildung zu erkennen, wobei sich die oberste bedeckende Hautschicht häufig durch das Einwirken von mechanischen Reizen ablöst. Klinisch sind dann die typischen Erosionen und Ulzerationen und seltener intakte Blasen zu erkennen (Porro et al. 2019).

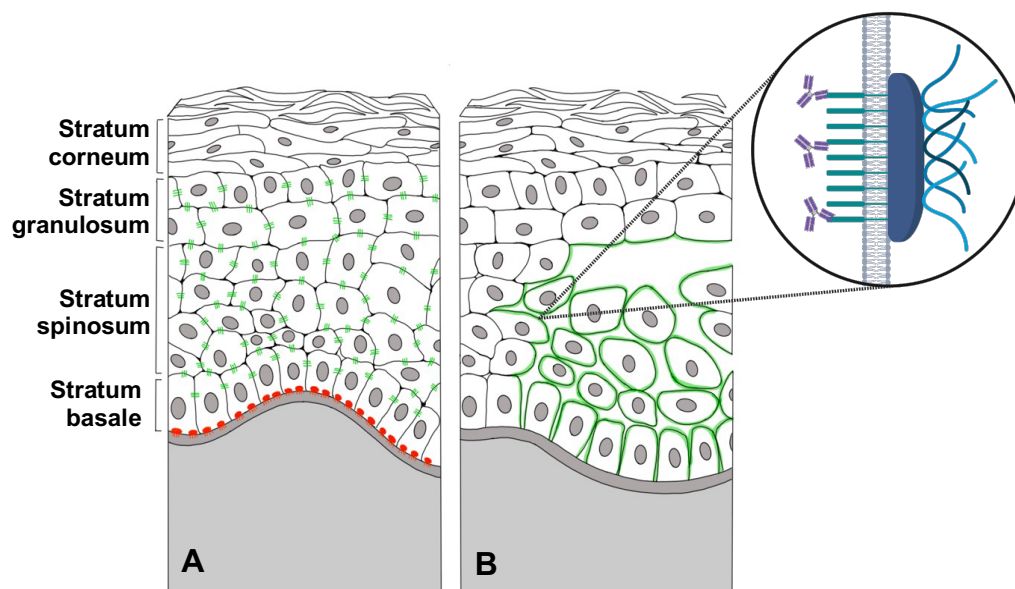


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Aufbaus der Epidermis und der durch Autoantikörper induzierten Akantholyse (modifiziert nach Wascke et al 2008 und erstellt mit BioRender (<https://BioRender.com>))

(A) Die physiologisch gesunde Epidermis besteht aus den vier benannten Schichten. (B) Bei einem PV-Patienten binden die Autoantikörper größtenteils an die desmosomalen Cadherine

Dsg1 und/oder Dsg3, sodass die Zellen ihre Zell-Zell-Verbindungen verlieren und sich ablösen (Akantholyse).

Die Pathogenese der Pemphigus-Erkrankungen ist komplex und wird durch verschiedene Mechanismen erklärt, die sich gegenseitig beeinflussen (Pan et al. 2011). Eine zentrale Theorie ist die Desmoglein-Kompensationstheorie, die von Amagai und Stanley 1999 formuliert wurde (**Abb. 4**). Sie basiert auf der unterschiedlichen Verteilung und Funktion der Desmoglein-Proteine (Dsg1 und Dsg3) in der Epidermis und den Schleimhäuten. Diese Theorie erklärt, dass Dsg1 und Dsg3 in unterschiedlichen Hautschichten exprimiert werden und sich gegenseitig in ihrer Funktion kompensieren können (Amagai et al., 1999). So treten bei PF, der durch Antikörper gegen Dsg1 charakterisiert ist, superfizielle Blasen auf, da in den oberen Hautschichten kein Dsg3 vorhanden ist, um den Funktionsverlust von Dsg1 auszugleichen. Im Gegensatz dazu führt beim mukosalen PV die Bildung von Antikörpern gegen Dsg3 zu suprabasalen Blasen in der Schleimhaut, wo Dsg1 nicht ausreichend exprimiert wird. Bei mukokutanem PV, bei dem Antikörper gegen Dsg1 und Dsg3 vorliegen, kommt es zur Blasenbildung in Haut und Schleimhäuten. Allerdings weisen einige Patienten klinische und serologische Profile auf, die nicht vollständig mit der Dsg-Kompensationstheorie übereinstimmen (Sielski et al. 2022).

Neben der sterischen Blockade durch Autoantikörper gegen die extrazelluläre Domäne der Dsg-Proteine, was zu einer Störung der Zell-Zell-Adhäsion führt, spielen intrazelluläre Signalwege eine entscheidende Rolle (Saito et al. 2012). Die PV-IgG aktivieren Signalwege wie Tyrosinkinase Src, *Epidermal Growth Factor*-Rezeptor-Kinase (EGFRK), p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (p38MAPK) und c-Jun-N-Terminale Kinase (JNK), die zu einer Destabilisierung des Zytoskeletts und einer Dissoziation der Desmosomen führen. Insbesondere die biphasische Aktivierung von p38MAPK zeigt, dass die frühe Phase die Akantholyse auslöst, während die späte Phase mit Apoptose assoziiert ist. Dennoch ist der Zusammenhang der Apoptose mit der Pathogenese von PV weiterhin umstritten, weil die Apoptose eher als sekundärer Effekt der Akantholyse angesehen wird, da PV-IgG *in vitro* eine Akantholyse auch ohne Apoptose verursachen kann (Schmitt und Waschke 2021).

Weitere Theorien wie die Basalzellschrumpfungshypothese von Claude et al. (2006) und das Konzept der „Apoptolyse“ von Grando et al. (2009) ergänzen das Verständnis der Pathogenese. Die Basalzellschrumpfungshypothese postuliert, wie Signalwege den Kollaps des Zytoskeletts und eine Schrumpfung der Zellen induzieren, was zum Verlust

der Zell-Zell-Verbindungen führt (Bystryn und Grando 2006). Die Apoptolyse beschreibt, wie Zelltod-Enzyme das Zytoskelett destabilisieren und eine Schrumpfung der Zellen bewirken, wodurch die Desmosomen abreißen (Grando et al. 2009).

Zusätzlich werden im Serum von PV-Patienten zahlreiche Autoantikörper gegen desmosomale und nicht-desmosomale Bestandteile wie Dsc, PG oder nikotinergen Acetylcholin-Rezeptoren gefunden (Kalantari-Dehaghi et al. 2013). Dies unterstützt die multipathogene Theorie, die besagt, dass mehrere Mechanismen gleichzeitig zur Blasenbildung führen (Sajda und Sinha 2018). Dennoch besitzen Antikörper gegen Dsg1 und Dsg3 die größte pathogene Bedeutung. Diese Antikörper überwinden zusammen mit Faktoren wie Serinproteasen oder Fas-Ligand die Reparaturmechanismen der Zellen, was zu irreversiblen Schäden führt (Ahmed et al. 2016).

Zusammengefasst ist die Pathogenese des PV ein Zusammenspiel aus Autoantikörper-induzierter sterischer Hinderung, Signalwegaktivierung und Zytoskelettdestabilisierung. Die genaue Rolle der Apoptose bleibt jedoch unklar, ob sie als primärer, vermittelnder oder sekundärer Prozess auftritt. Dieses komplexe Zusammenspiel führt letztlich zur Akantholyse und den klinischen Manifestationen der Erkrankung.

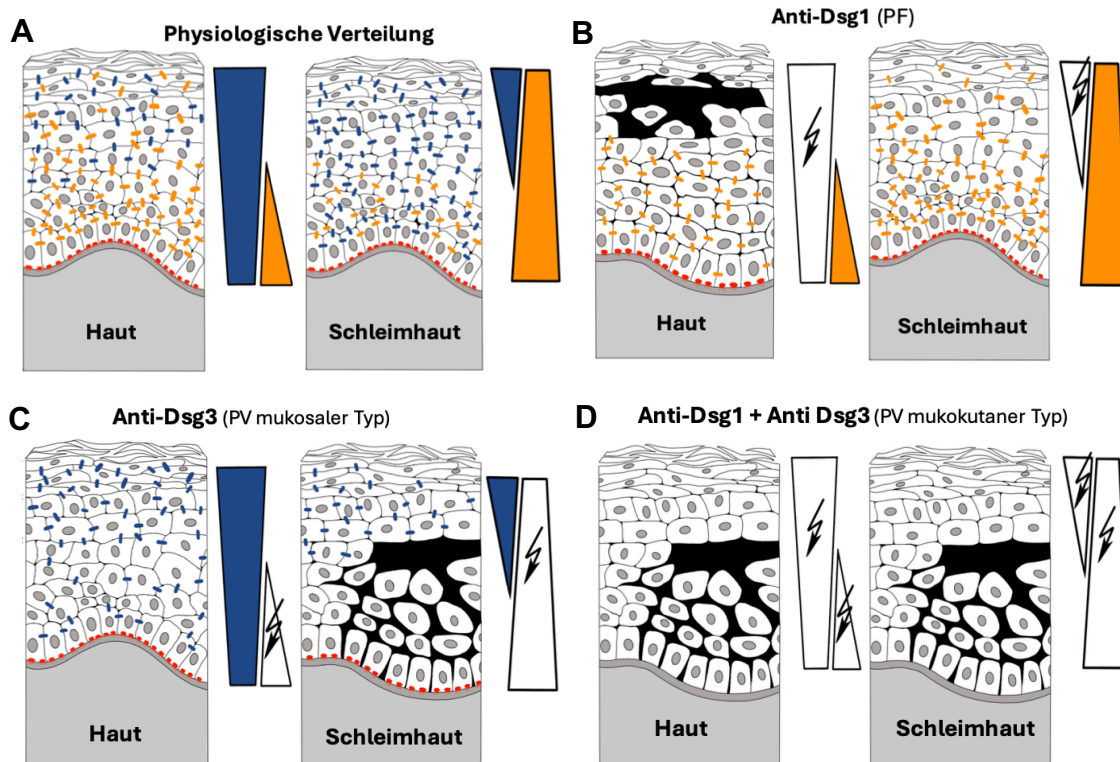


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Dsg-Kompensationstheorie (modifiziert nach Amagai & Stanley, 1999).

(A) Dsg1 (blau) und Dsg3 (orange) weisen eine unterschiedliche Verteilung der Expression in der Haut und den Schleimhäuten auf. (B) Bei Patienten mit PF sind Anti-Dsg1-Antikörper vorhanden, die zu superfiziellen Hautläsionen führen. (C) Bei Patienten mit PV kann ein mukosadominanter Typ auftreten, bei dem Anti-Dsg3-Antikörper basale Schleimhaut-Läsionen verursachen. (D) Alternativ kann auch der mukokutane Typ vorliegen, bei dem sowohl Anti-Dsg1 als auch Anti-Dsg3 Antikörper nachgewiesen werden.

1.4.2 Diagnostik des Pemphigus vulgaris

Die Diagnostik erfolgt durch eine Kombination aus Anamnese, klinischer Untersuchung und Laboruntersuchungen, wie einer Hautbiopsie und dem Nachweis von Autoantikörpern im Blut mittels direkter oder indirekter Immunfluoreszenz (Eming und Hertl 2006). Die Anamnese gibt Auskunft über mögliche bekannte Triggerfaktoren. Die klinische Untersuchung beinhaltet Inspektion und die Durchführung der Nikolski-Zeichen I und II. Beim Nikolski-Zeichen I wird durch Ausübung von tangentialen Druck auf gesunde Haut die Ablösung der Epidermis provoziert. Beim Nikolski-Zeichen II lassen sich bereits vorhandene Blasen verschieben (Goebeler und Hamm 2017). Laut Leitlinien stellt die direkte Immunfluoreszenz die sicherste Methode zur

Diagnosestellung dar. Für diese Untersuchung ist eine 4 mm große Stanzbiopsie aus dem periläsionalen Areal erforderlich, um ein falsch negatives Ergebnis zu verhindern (Kneisel und Hertl 2011b). Histopathologisch zeigen sich in den Hautproben häufig nur Spaltbildung und Akantholyse, während serologische Tests den Nachweis der Autoantikörper ermöglichen. Für die indirekte Immunfluoreszenz werden die im Serum enthaltenden Antikörper auf Ösophaguschnitten von Affen analysiert (Knudson et al. 2010). Ebenfalls gibt es anti-Dsg1- und anti-Dsg3-ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)-Testsysteme, da die Autoantikörper gegen Dsg1 und Dsg3 als ausschlaggebend für die Erkrankung gelten (Amagai et al. 1999; Kneisel und Hertl 2011b). Bei entsprechender klinischer Symptomatik und negativen Laboruntersuchungen sollten auch Autoantikörper gegen nicht-desmosomale Zielantigene, wie Acetylcholin-Rezeptoren, Pemphaxin (Annexin 9) und andere desmosomale Bestandteile wie PG, E-Cadherin, DP und Dsc in Betracht gezogen werden (Nguyen et al. 2000).

1.4.3 Therapie und Prognose des Pemphigus vulgaris

Zurzeit gibt es keine zugelassene Therapie, die gezielt auf die betroffenen Strukturen von PV einwirkt. Das primäre therapeutische Ziel besteht daher in der Unterdrückung des Immunsystems und der Hemmung der Autoimmunreaktion (Martin et al. 2009). Zur systemischen Induktionstherapie wird eine Kombination aus Glukokortikoiden, wie Prednisolon oder einem Prednisolonäquivalent, mit einem Immunsuppressivum (z.B. Azathioprin, Mycophenolat-Mofetil, Mycophenolsäure) oder Rituximab angewendet (Knudson et al. 2010). Bei einer langfristigen oder übermäßigen Anwendung von Glukokortikoiden, wie Prednisolon, treten häufig Nebenwirkungen wie Hyperglykämie (Diabetes mellitus), Hypertonie, Osteoporose oder das Cushing-Syndrom auf (Barnetson und White 1992). Azathioprin, ein Purinanaloga, kann in die DNA anstelle von Guanin eingebaut werden, sodass es zu einem Einzelstrangbruch, Zellzyklusarrest und letztlich zur Apoptose kommt. Als Folge wird die Differenzierung von Lymphozyten und die Antikörperproduktion gehemmt (Chavez-Alvarez et al. 2020). Rituximab, ein monoklonaler Antikörper gegen CD-20 (*cluster of differentiation*), bindet an das CD-20-Antigen auf den B-Zellen, was durch verschiedene zelluläre Mechanismen zum Tod der B-Zellen führt und neben PV/PF auch bei B-Zell-Lymphomen zum Einsatz kommt (Ahmed et al. 2006).

Zusätzlich zur systemischen Induktionstherapie können topische Glukokortikoide und antiseptische Wundversorgungsmaßnahmen eingesetzt werden. Aufgrund der

großflächigen Erosionen im Mundraum sollen regelmäßige Zahnarztbesuche erfolgen (Kneisel und Hertl 2011b). Nach erfolgreicher Induktionstherapie erfolgt der Übergang in die Erhaltungstherapie durch eine schrittweise Reduktion der systemischen Kortikosteroid-Dosis, wobei eine Reduzierung unter die Cushing-Schwelle von 7,5 mg pro Tag Prednisolon als Ziel gilt (Goebeler und Hamm 2017). Obwohl die Therapie dazu beiträgt, neue Läsionen zu verhindern und bestehende Läsionen abheilen zu lassen, bleibt Pemphigus in vielen Fällen eine chronische Erkrankung (Ruocco et al. 2013). Daher besteht ein erheblicher Bedarf an der Erforschung gezielter therapeutischer Ansätze (Kneisel und Hertl 2011b). Trotz des unspezifischen Therapieansatzes hat sich die Prognose für Patienten mit PV deutlich verbessert, da die Erkrankung vor Einführung der systemischen Kortikosteroide in den 1950er Jahren in 100% der Fälle letal verlief (Porro et al. 2019). Die offenen Wunden auf der Haut und im Mund stellen eine optimale Eintrittspforte für Mikroorganismen dar (Hertl et al. 2008). Die Erkrankung manifestiert sich häufig spontan im höheren Lebensalter und zeigt einen schubweisen Verlauf mit akuten bis chronischen Phasen. In etwa 90% der Fälle kann eine Heilung oder langfristige Krankheitskontrolle erreicht werden (Goebeler und Hamm 2017). Aufgrund des unspezifischen Therapieverfahrens sind die Patienten besonders anfällig für Superinfektionen und erleben starke Nebenwirkungen, die durch langfristige Einnahme von Immunsuppressiva, Glukokortikoiden oder Rituximab verursacht werden (Kneisel und Hertl 2011b; Pollmann et al. 2018).

1.4.4 Anti-Dsg3 Antikörper in der Pemphigusforschung

Für die Forschung zur Pathogenese von PV stellt der monoklonale Antikörper mAK23 ein ausgezeichnetes Werkzeug dar, da dieser spezifisch an Dsg3, das Hauptzielantigen bei PV, bindet. Der mAK23 induziert PV-ähnliche Blasenbildung, indem die Zelladhäsion gestört wird, was sich durch suprabasale Akantholyse und Dsg3-Depletion zeigt (Tsunoda et al. 2003, 2011). Diese Effekte werden durch die Bindung an ein calciumabhängiges Epitop auf Dsg3 erzielt, welches entscheidend für die desmosomale Adhäsion ist. Neben der direkten Hemmung der Dsg3-Interaktionen aktiviert mAK23 Signalwege wie p38MAPK und Src, die für die PV-Pathogenese von zentraler Bedeutung sind (Schmitt et al. 2023; Walter et al. 2017). Dieser Antikörper wurde durch Immunisierung von Dsg3-Knockout Mäusen mit rekombinantem Dsg3 erzeugt, wodurch die B-Zellen der Mäuse spezifische Antikörper gegen Dsg3 produzieren. Nach der Fusion der Milz B-Zellen der

immunisierten Mäuse mit Myelomzellen entstanden Hybridom-Zellen, die in der Lage sind, den AK23-Antikörper unbegrenzt zu produzieren (Tsunoda et al. 2003).

Der mAK23 wurde *in vitro* in Keratinozytenkulturen und *in vivo* in Mausmodellen umfassend getestet und hat sich als zuverlässiges Werkzeug zur Untersuchung der PV-Mechanismen bewährt. Es beeinträchtigt die Desmosomenstruktur und Keratinverankerung, wodurch zentrale Aspekte der Krankheit nachgebildet werden (Egu et al. 2020). Im Vergleich zu Alternativen wie 2G4, einem Antikörper gegen die EC5-Domäne von Dsg3, zeigt mAK23 eine überlegene Effektivität bei der Induktion des Zelladhäsionsverlusts. Zwar aktiviert 2G4 ebenfalls Signalwege wie p38MAPK, jedoch nicht Src, was auf Unterschiede in den Mechanismen hinweist (Eming et al. 2024; Schmitt et al. 2023). Patientenseren bestehen aus heterogenen, polyklonalen PV-IgG, jedoch sind diese weniger standardisiert und nicht gut reproduzierbar (Saito et al. 2012). Insgesamt ermöglicht mAK23 durch seine Spezifität, Reproduzierbarkeit und Pathogenität eine detaillierte Untersuchung der molekularen Mechanismen von PV und ist somit die bevorzugte Wahl gegenüber anderen Antikörpern.

1.5 Flotilline

1.5.1 Entdeckung und Vorkommen der Flotilline

Flotilline gehören zu der Stomatin-Prohibitin-Flotillin-Protein-Superfamilie (SPFH) und sind durch zwei homologe Proteine, Flotillin 1 (Flot1) und Flotillin 2 (Flot2), vertreten (Browman et al. 2007). Diese Proteine wurden 1997 unabhängig voneinander von zwei Forschungsgruppen entdeckt und tragen daher unterschiedliche Bezeichnungen. Flot1 wird in der Literatur auch als Reggie-2 und Flot2 als Reggie-1 bezeichnet. Schulte et al. benannten die Proteine als Reggie-1 und -2 aufgrund ihrer Entdeckung in der Regeneration retinaler Ganglienzellen bei Goldfischen (Schulte et al. 1997). Bickel et al. entdeckten Flotilline in caveolinreichen Membranfraktionen aus der Mauslunge. Aufgrund der hohen Detergenzresistenz in den Lipidmikrodomänen und der Eigenschaft im Dichtegradienten zu schwimmen, bezeichnete Bickel die Proteine als Flot1 und Flot2, was in der wissenschaftlichen Literatur überwiegend verwendet wird (Bickel et al. 1997). Flotilline sind evolutionär hochkonserviert und nahezu ubiquitär in verschiedensten Geweben vorkommend (Babuke und Tikkanen 2007). Bereits in Bakterien, Pilzen und Pflanzen konnten Flotillin-ähnliche Proteine nachgewiesen werden (Rivera-Milla et al. 2006). Die Lokalisation von Flotillinen variiert je nach Differenzierungsgrad der Zellen,

Zelltyp und Kulturbedingungen. In differenzierten Zellen sind Flotilline primär an der Plasmamembran lokalisiert, während in nicht-differenzierten Zellen die Lokalisation häufig auf intrazellulären Strukturen konzentriert. Beispielsweise in Epithelzellen ist Flot2 größtenteils an der Plasmamembran und verstärkt an den Zell-Zell-Kontakten lokalisiert (Neumann-Giesen et al. 2004), während Flot1 bevorzugt in endosomalen Strukturen vorzufinden ist (Liu et al. 2005). Intrazellulär sind Flotilline in Lysosomen, Endosomen, Phagosomen und Exosomen assoziiert (Stuermer et al. 2004). Flot1 kann auch in dem Golgi-Apparat und Zellkern lokalisiert sein (Gkantiragas et al. 2001). An der Zellmembran sind die Flotilline mit den Lipid Rafts auf der zytosolischen Seite durch hydrophobe Interaktionen und posttranslationale Modifikationen wie Palmytylierung und Myristylierung assoziiert (**Abb. 5A**). Diese Mikrodomänen sind reich an Cholesterin und Glykosphingolipiden und spielen eine wichtige Rolle bei der Organisation und Funktion von Membranproteinen (Banning et al. 2011). Flotilline tragen zur Stabilisierung und Dynamik dieser Lipid Rafts bei und beeinflussen somit die Funktion und Integrität der Desmosomen (Stahley et al. 2014). Daher werden Flotilline häufig als Markerproteine für Lipidmikrodomänen genutzt (Lingwood und Simons 2010; Solis et al. 2007).

1.5.2 Molekulare Struktur von Flotillinen

Die homologen Flotillin-Proteine weisen eine Ähnlichkeit von 44% in ihrer Aminosäuresequenz auf und besitzen eine molekulare Masse von 48 kDa. Die Proteinsequenz von Flotillinen in der Maus zeigt eine Übereinstimmung von 99% mit der menschlichen Sequenz (Babuke und Tikkanen 2007; Schulte et al. 1997). Allgemein lassen sich die Flotilline in einen N-terminalen und C-terminalen Anteil unterteilen. Die N-terminalen Sequenz enthält hydrophobe Regionen und Acylierungsstellen für posttranslationale Fettsäuremodifikationen.

Über die N-terminale Region binden die Flotilline an die Plasmamembran, wobei sie auf der zytosolischen Seite als Homo- oder Hetero-Oligomere mit den Lipid Rafts interagieren (Bodin et al. 2025; Neumann-Giesen et al. 2007) (**Abb. 5 A, B**). Flot1 besitzt an Position 34 ein Cystein (Cys) mit einer reversibel gebundenen Palmitinsäure (Morrow et al. 2002). Flot2 weist an Position 2 ein Glycin (Gly) für die irreversible Myristylierung und an Position 4, 19 und 20 Cys für eine Palmytylierung (Neumann-Giesen et al. 2004). Die SPFH-Domäne bildet eine kompakte, ellipsoide bis kugelförmige Struktur, die zusätzlich vier bis fünf α -Helices und sechs β -Faltblattstränge aufweist (Langhorst et al.

2005). Die C-terminale Region, auch als Flotillin-Domäne bezeichnet, besteht aus Alanin-Glutamat Wiederholungen und ist für die Bildung der Hetero- und Homo-Oligomere der Flotilline verantwortlich, die entscheidend bei der Endozytose und Membranassoziation sind (Bickel et al. 1997). Flotilline können an verschiedenen Stellen phosphoryliert werden, wobei die wichtigsten Phosphorylierungsstellen an Tyrosin (Tyr) in Flot1 an Position 160 und in Flot2 an Position 163 liegen, da diese im Zusammenhang zur *Epidermal Growth Factor* (EGF) Stimulation stehen (Kurrle et al. 2012; Linding et al. 2007; Neumann-Giesen et al. 2007; Riento et al. 2009).

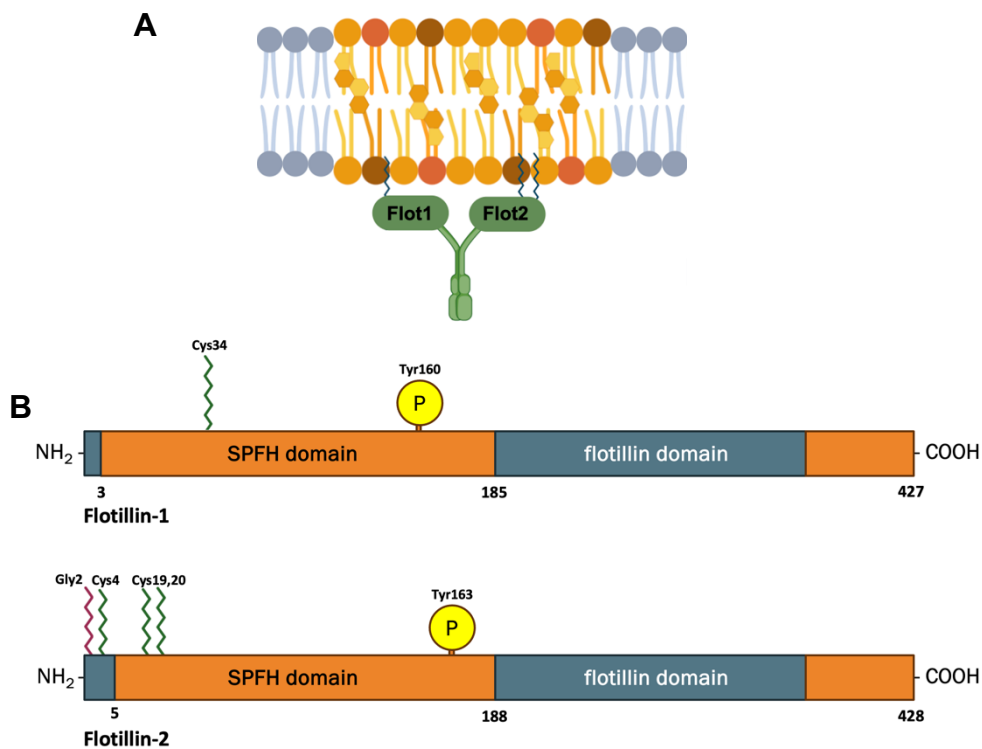


Abbildung 5: Strukturaufbau der Flotilline (modifiziert nach Browman et al 2007 und erstellt mit BioRender (<https://BioRender.com>))

(A) Interaktion des Flotillin Heterooligomers (in **grün**) mit den Lipid Rafts (in **orange/gelb**) über die Myristyl- und Palmitylreste an der Plasmamembran (in **blau**). (B) Flotilline bestehen aus einer N-terminalen SPFH- und C-terminalen Flotillin-Domäne. Vereinfachte Darstellung des Aufbaus von Flot1 und Flot2 mit wichtigen Myristyl-, Palmityl- und Phosphorylierungspositionen.

1.5.3 Die Funktionen von Flotillinen

Flotilline besitzen eine sehr diverse Funktionsvielfalt mit Einfluss auf zahlreiche Prozessen, wie Signaltransduktionswege (Neumann-Giesen et al. 2007), Endozytose (Amaddii et al. 2012; Schneider et al. 2008), endosomales Trafficking (Meister und Tikkanen 2014; Solis et al. 2012, 2013), Zell-Zell-Adhäsion (Völlner et al. 2016),

Phagozytose (Dermine et al. 2001), die Regulation des Zytoskeletumbaus (Neumann-Giesen et al. 2004, 2007) und die Neuronenregeneration (Schulte et al. 1997). Aufgrund der breiten Funktionalität sind Flotilline in Zellen nicht nur an der Zellmembran, sondern auch in verschiedenen zellulären Kompartimenten lokalisiert.

1.5.3.1 Phosphorylierung von Flotillinen

Die Phosphorylierung von Flotillinen ist ein entscheidender Faktor für wichtige regulatorische Mechanismen, die beispielsweise die Funktion in Signaltransduktionswegen, Membranorganisation und Zytoskelett-Dynamik beeinflussen. Im MAPK-Signalweg, induziert durch EGF, sind Flotilline an der Endozytose von EGF und dem Abbau des EGF-Rezeptors (EGFR) beteiligt. Das Flot1 wirkt dabei regulierend als strukturelles Gerüst und Verstärker des MAPK-Signalweges, während Flot2 durch Umorganisieren der Aktinfilamente Einfluss auf das Zytoskelett nimmt, um die induzierten Wachstumsprozesse zu unterstützen (Amaddii et al. 2012; Neumann-Giesen et al. 2007). In der Studie von Neumann-Giesen et al. wurden alle acht Tyrosine in Flot2 durch Einzel- (Y24, Y27, Y124, Y241) und Doppelpunktmutation (Y158 + Y163, Y348 + Y358) zu Phenylalanin mutiert, um zu analysieren, ob die Src-Kinase diese Tyrosine phosphoryliert. Interessanterweise fand nach der Substitution von Tyrosin zu Phenylalanin an Position 163 in Flot2 durch Stimulation mit EGF keine Translokation durch Endozytose in die Endosomen statt, sondern die Y163F-Mutante verblieb in der Plasmamembran, da keine Phosphorylierung an Tyr163 mehr möglich war. Durch die Translokation von Flot2 von der Membran in Endosomen wird die Zellverbreitung und die Signalübertragung zum Aktin-Zytoskelett beeinflusst (Neumann-Giesen et al. 2007). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Flot1 durch die Fyn-Kinase an Tyr160 phosphoryliert wird, während Flot2 an der Tyr163 phosphoryliert wird. Diese Phosphorylierung ist entscheidend für die Internalisierung und den Abbau von Flotillinen von der Plasmamembran in späte Endosomen und Lysosomen (Neumann-Giesen et al. 2007; Riento et al. 2009).

1.5.3.2 Bedeutung der Flotilline für die desmosomale Adhäsion

Ein besonders relevanter Aspekt für die vorliegende Arbeit ist die Rolle der Flotilline in der Zell-Zell-Adhäsion (Völlner et al. 2016). Flotilline stabilisieren Cadherine an den Zell-Zell-Kontakten und sind für deren Bildung notwendig. Ihre Depletion führt zu einer

Störung der Organisation und Funktion der Zonula adhärens, was die Integrität und Funktionalität der Zell-Zell-Verbindung beeinträchtigt. Zudem dienen Flotillin-Mikrodomänen als Signalplattformen, die für die Differenzierung und Aufrechterhaltung epithelialer Barrieren von zentraler Bedeutung sind (Chartier et al. 2011; Guillaume et al. 2013; Kurrle et al. 2013). Auch die Assemblierung von Desmosomen und die Stärke der Zell-Zell-Verbindungen hängen von den cholesterinreichen Membrandomänen ab (Kurrle et al. 2013; Resnik et al. 2011).

Wie bereits zuvor beschrieben, spielen Lipid Rafts eine wichtige Rolle beim Aufbau und bei der Stabilisierung der interzellulären Haftkontakte (Resnik et al. 2011). Flot1 und Flot2 interagieren mit PG, welches sowohl in Zonula adhärens als auch in Desmosomen vorkommt (Chartier et al. 2011; Kurrle et al. 2013). In Abwesenheit von Flotillinen in MCF10A-Zellen werden Adhäsionsproteine wie E-Cadherin und β -Catenin verstärkt in Lipid Rafts rekrutiert, die jedoch nicht in der Lage sind, stabile Adhäsionsstrukturen vollständig zu unterstützen. Dies deutet darauf hin, dass Flotilline erforderlich sind, um Adhäsionsproteine in spezifischen „Flotillin-Rafts“ zu organisieren, was die Bildung geordneter und stabiler Zell-Zell-Adhäsionsstrukturen ermöglicht (Kurrle et al. 2013).

Es konnte nachgewiesen werden, dass Flotillin-Mikrodomänen die Bildung von Cadherin-Komplexen regulieren. Völlner et al. konnten mit Immunfluoreszenz in menschlichen Hautschnitten darstellen, dass Flotilline mit dem desmosomalen Adhäsionsprotein Dsg3 in Keratinozyten kolokalisieren. Mithilfe eines Pulldown-Assay konnte eine direkte Interaktion zwischen der zytoplasmatischen Domäne von Dsg3 und Flotillinen gezeigt werden. Die desmosomale Adhäsion der Zellen war signifikant geschwächt, da die Zellmonolayer ohne Flot1 oder Flot2 eine stärkere Fragmentierung aufwiesen als die Wildtyp (WT)-Zellen. Im Western Blot (WB) zeigte Dsg3 eine reduzierte Expression bei Fehlen von Flot1 oder Flot2. Die HaCaT-Zellen, die mit IgG-Antikörpern aus dem Serum von PV-Patienten behandelt wurden, zeigten eine diskontinuierliche, weniger kompakte Dsg3-Färbung, die der Färbung der HaCaT-Zellen ohne Flot1- und Flot2-Expression ähnelte. Interessanterweise induzierten die PV-IgG-Antikörper eine Umverteilung von Flot2 in den intrazellulären Bereich, wobei die Plasmamembranfärbung verloren ging. Diese Ergebnisse belegen, dass Flotilline eine entscheidende Rolle bei der Regulation und dem Aufbau von Desmosomen in der Plasmamembran spielen. Bei Fehlen der Flotillin-Proteine wird Dsg3 über Endozytose in die Zelle aufgenommen und degradiert, was zu einer geschwächten desmosomalen Adhäsion führt (Kurrle et al. 2013; Völlner et al. 2016).

1.6 Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP)

Zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat (cAMP) fungiert als sekundärer Botenstoff (*second messenger*) und spielt eine zentrale Rolle bei der Signalübertragung von Hormonen und Neurotransmittern (Sutherland und Rall 1957). Der cAMP-Signalweg (**Abb. 6**) wird durch die Bindung eines Liganden an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR) an der Plasmamembran aktiviert. Die Ligandenbindung induziert eine Konformationsänderung im Rezeptor, wodurch das heterotrimere G_s -Protein, bestehend aus je einer α -, β - und γ -Untereinheit, aktiviert wird. Durch die Aktivierung ersetzt die α -Untereinheit das Guanosindiphosphat (GDP) durch ein Guanosintriphosphat (GTP) und integriert mit dem membranverankerten Enzym Adenylatcyclase (AC) (Sassone-Corsi 2012). Es sind neun Isoformen der AC bekannt, die sich hinsichtlich ihrer Struktur, Regulation, Gewebeverteilung und Funktion unterscheiden (Hanoune und Defer 2001; Stanley McKnight 1991). Die $\beta\gamma$ -Untereinheiten des trimeren G-Proteins können andere AC-Isoformen stimulieren. Das Enzym AC katalysiert die Reaktion von Adenosintriphosphat (ATP) zu cAMP unter gleichzeitiger Freisetzung von Pyrophosphat. Die Reaktion ist irreversibel, da das Pyrophosphat unmittelbar in zwei Phosphate zerfällt.

1.6.1 Signaltransduktionswege von cAMP

Als sekundärer Botenstoff aktiviert cAMP eine Vielzahl von zellulären Prozessen, um eine intrazelluläre Signalverstärkung zu vermitteln. Die drei zentralsten Effekte von cAMP sind die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), EPAC (*exchange protein activated by cAMP*) und die Aktivierung cAMP-abhängiger Ionenkanäle (**Abb. 6**).

Die PKA, eine Serin/Threonin-spezifische Kinase, ist ein symmetrisches Holoenzym bestehend aus zwei katalytischen und zwei regulatorischen Untereinheiten (Pierce et al. 2002). Durch die Bindung von cAMP an die regulatorischen Untereinheiten werden die katalytischen Untereinheiten freigesetzt, was zur Aktivierung der Kinase führt (Taylor et al. 1992). Es sind zwei Hauptformen der PKA bekannt, wobei Typ I meist im Zytosol und Typ II an Membranen, Organellen oder Zytoskelettstrukturen verankert sind (Potter und Taylor 1979; Rassow et al. 2016). Die PKA aktiviert oder inhibiert weitere Proteine durch Phosphorylierungsprozesse. Unter anderem phosphoryliert die PKA bestimmte Transkriptionsfaktoren wie CREB (*cAMP response element-binding protein*), um die Expression von bestimmten Genen zu regulieren, die in Zellwachstum, Differenzierung, und neuronaler Plastizität beteiligt sind (Kopperud et al. 2003).

Die Proteine EPAC1 und EPAC2 sind cAMP-abhängige Signalproteine, die als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEF) für die kleinen Guanosintriphosphatasen (GTPasen) Rap1 und Rap2 dienen (Rassow et al. 2016). Die GTPasen sind Enzyme, die als molekulare Schalter in einer Vielzahl von zellulären Prozessen fungieren, indem sie zwischen einem aktiven GTP-gebundenen und einem inaktiven GDP-gebundenen Zustand wechseln. Es gibt mehrere Familien von den GTPasen, darunter die Ras-, Rho-, Rab-, Sar1/Arf- und Ran-Familien, die jeweils spezifische zelluläre Funktionen regulieren (Takai et al. 2001). Die Proteine Rap1 und Rap2 sind Mitglieder der Ras-ähnlichen kleinen GTP-bindenden Proteine und spielen eine zentrale Rolle in verschiedenen zellulären Prozessen wie in der Zelladhäsion, Zellproliferation und Differenzierung (Borland et al. 2009; De Rooij et al. 1998). Beispielsweise kann Rap1 nach Aktivierung durch cAMP-regulierte GEF, EPAC1, die Zelladhäsion über die Integrin Rezeptoren erhöhen (Bos 2003). Darüber hinaus kann cAMP direkt oder indirekt die Ionenkanäle der CNG-Gruppe (*Cyclic Nucleotide gated*) aktivieren, wie zum Beispiel die HCN-Kanäle (*Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel*) im Herzmuskel, die für die Regulierung des Herzschlags zuständig sind (Zaccolo et al. 2021).

Die Aktivität der AC kann durch Liganden gehemmt werden, die an GPCR mit G_i-Protein gekoppelt sind. Zudem kann cAMP durch Phosphodiesterasen (PDEs) abgebaut werden, die bei hohen cAMP-Konzentrationen durch negative Rückkopplung aktiviert werden. Die Isoenzyme PDE4, PDE7 und PDE8 katalysieren den spezifischen Abbau von cAMP zu AMP, indem die Phosphodiesterbindung gespalten wird (Doseyici et al. 2014; Vielmuth et al. 2023). Die ACs und PDEs unterliegen einer Vielzahl positiver und negativer Regulationsmechanismen durch andere Signalwege, wie z. B. Calcium-Signalwege über Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinasen (CaMKs) und Calcineurin (Bruce et al. 2003), Inositol-Lipide über PKC (Yoshimasa et al. 1987) und Rezeptor-Tyrosinkinasen über die ERK-MAP-Kinase und Proteinkinase B (PKB) (Webster und Anwer 1999).

Zur Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels werden Forskolin und Rolipram verwendet. Forskolin, ein Naturstoff aus der indischen Pflanze *Coleus forskohlii*, aktiviert die AC-Isoformen 1 bis 8 durch Bindung an eine hydrophobe Tasche in der Nähe der katalytischen Stelle des Enzyms. Rolipram hemmt selektiv die PDE4, welche weit verbreitet ist und spezifisch cAMP hydrolysieren kann (Doseyici et al. 2014). Im Einklang

mit dieser Beobachtung zeigte auch der PDE4-Inhibitor Apremilast eine modulatorische Wirkung auf den cAMP-Spiegel (Sigmund et al. 2023).

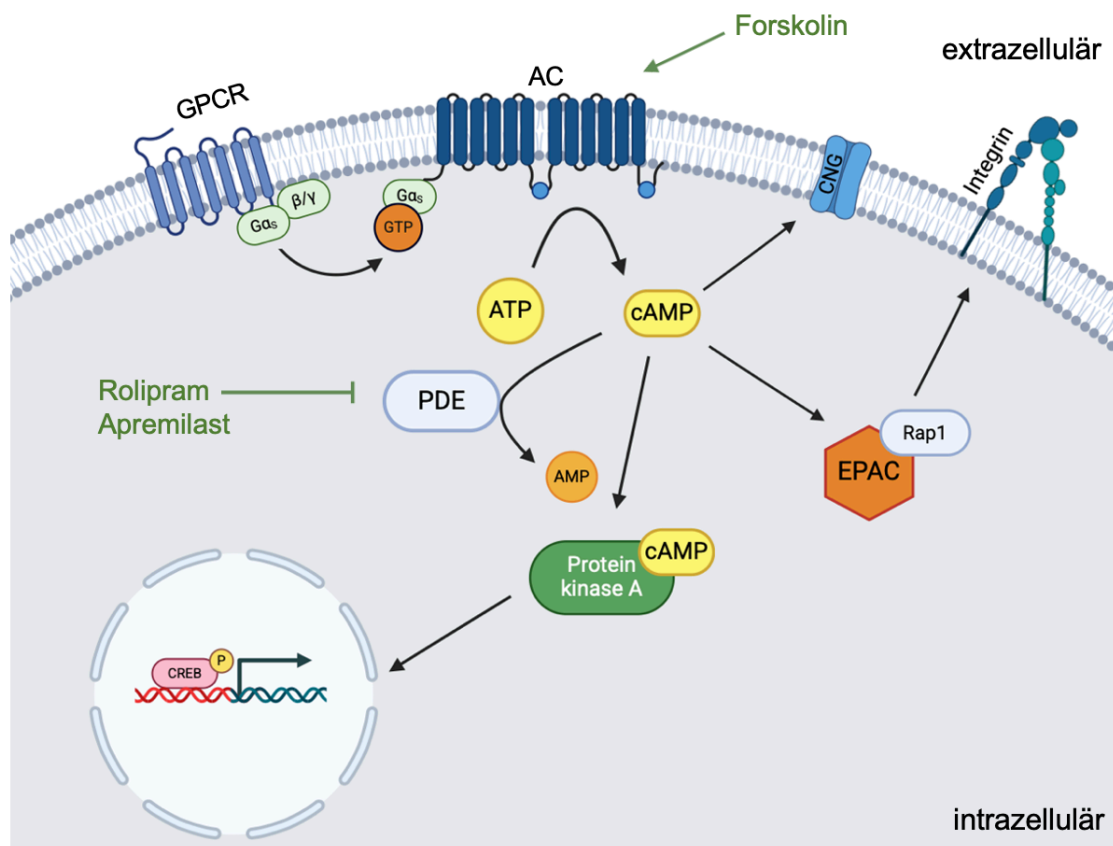


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Signaltransduktionsweges von cAMP (modifiziert nach Sassone-Corsi et al. 2012 und erstellt mit BioRender (<https://BioRender.com>))

Nach Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors (**GPCR**) durch einen Liganden wird die Adenylatcyclase (**AC**) durch das gekoppelte G-Protein aktiviert. Die AC produziert intrazellulär cAMP aus ATP. Der sekundäre Botenstoff cAMP wirkt über drei Hauptwege: **PKA**, **EPAC** und ionische Kanäle (**CNG-Kanäle**). Die PKA wird durch die Bindung von cAMP an die regulatorischen Untereinheiten der PKA aktiviert, sodass die katalytischen Untereinheiten freigesetzt werden. Die PKA phosphoryliert Zielproteine wie **CREB**, wodurch Genexpression, Stoffwechsel und Zelladhäsion reguliert werden. Das Protein EPAC aktiviert **Rap**-GTPasen, um das Zytoskelett und die Adhäsion über Integrine zu beeinflussen, während die cAMP-Ionenkanäle direkt oder über PKA moduliert und so die elektrische Erregbarkeit von Zellen steuert. Durch eine negative Rückkopplung kann durch die PKA die Phosphodiesterase (**PDE**) aktiviert werden, wodurch cAMP zu AMP abgebaut wird. Zur Modulation des cAMP-Signalweges kann Forskolin die AC zur vermehrten Produktion von cAMP stimulieren, während Rolipram und Apremilast selektiv die PDE inhibieren können, sodass intrazelluläres cAMP nicht abgebaut wird.

1.6.2 cAMP-vermittelte protektive Wirkung auf die desmosomale Adhäsion

Es ist bekannt, dass vaskuläre endotheliale (VE)-Cadherine, ähnlich dem Dsg in der Haut, entscheidend für die Adhäsion zwischen Endothelzellen sind, die das Lumen der Blutgefäße auskleiden. Der sekundäre Botenstoff cAMP hat eine protektive Wirkung auf die VE-Cadherine und wirkt somit verstärkend auf den adhäsiven Verband (Dejana et al. 2009). Spindler et al. wollten diesen Zusammenhang auch in Keratinozyten prüfen, ob cAMP eine protektive Wirkung auf die desmosomale Adhäsion hat. Sie sahen das Potential für einen Therapieansatz, um den durch Pemphigus-Autoantikörper induzierten Verlust der desmosomalen Adhäsion zu verhindern. Die Ergebnisse zeigten, dass ein erhöhter cAMP-Spiegel sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Schutzwirkung gegen die pathogenen Effekte der PV-Antikörper hat. Zudem wurde beobachtet, dass die Inkubation mit PV-Antikörpern die cAMP-Konzentration in Keratinozyten signifikant erhöhte, was darauf hinweist, dass der cAMP-Signalweg Teil eines intrazellulären Rettungsmechanismus als Reaktion auf den Verlust der Zelladhäsion ist (Spindler et al. 2010).

In verschiedenen Studien wurden mehrere PDE4-Inhibitoren entwickelt und getestet (Li et al. 2018). Sigmund et al. wollten das Medikament Apremilast untersuchen, einen selektiven PDE4-Inhibitor, der bereits für die Behandlung von Psoriasis, Psoriasis Arthritis und Morbus Behçet zugelassen ist (Pincelli et al. 2018; Sigmund et al. 2023; Torres und Puig 2018). Ein Fallbericht dokumentierte zudem den erfolgreichen Einsatz von Apremilast zur Behandlung eines Patienten mit PV (Meier et al. 2020). Die Ergebnisse von Sigmund et al. zeigten, dass Apremilast den durch PV-Autoantikörper induzierten Verlust der Kohäsion von Keratinozyten aus menschlicher Epidermis *ex vivo*, in kultivierten Keratinozyten *in vitro* sowie *in vivo* in Mäusen signifikant reduzierte. Gleichzeitig inhibierte Apremilast die Keratinretraktion sowie die Spaltung der Desmosomen, förderte die Phosphorylierung von PG an Ser665 und unterstützte den Einbau von DP in Desmosomen-Plaques (Sigmund et al. 2023). Das cAMP verstärkt sowohl in Keratinozyten als auch in Kardiomyozyten die Zellkohäsion, indem es die Verankerung der desmosomalen Plaques an Intermediärfilament-Zytoskelett fördert. In beiden Zelltypen induziert cAMP eine PKA-abhängige Phosphorylierung von PG an Ser665, 167 und 224, was die Bindung von Intermediärfilamenten an DP durch einen bisher nicht vollständig verstandenen Mechanismus unterstützt. Im Gegensatz dazu führt die Phosphorylierung von DP an Ser2849 durch PKC zu einer negativen Regulierung der DP-Keratin-Interaktion, was die Keratinozyten-Adhäsion verringert. Diese Phosphorylierung ist von Bedeutung, da Ca^{2+} -Signalwege und Phospholipase C (PLC) als

Regulatoren von PKC durch PV-Autoantikörper aktiviert werden können. Zusammengefasst wirken die Phosphorylierungen der Plaque-Proteine PG und DP als gegensätzliche molekulare Schalter, welche die desmosomale Zytoskelett-Verankerung regulieren und es den Desmosomen ermöglichen, auf unterschiedliche Umweltsignale wie Zellverletzungen und Zellmigration zu reagieren (Vielmuth et al. 2023).

1.7 Ziele der Arbeit

Pemphigus vulgaris (PV) ist eine schwerwiegende Autoimmunerkrankung der Haut und/oder Schleimhäute, verursacht durch IgG-Autoantikörper gegen die desmosomalen Cadherine Dsg3 und Dsg1. Diese führen zu Blasen- und Erosionsbildung. Der bekannte Schutzmechanismus von cAMP spielt eine wichtige Rolle beim Erhalt der desmosomalen Adhäsion in Anwesenheit von PV-Autoantikörpern. Flotilline, als wichtige Regulatoren der Signaltransduktion, interagieren direkt mit Dsg3 und Dsg1. Ihr Mangel schwächt die desmosomale Adhäsion und führt zu einer PV-ähnlichen Dsg3-Lokalisierung in menschlichen Keratinozyten.

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, den Zusammenhang zwischen dem protektiven, erhöhten cAMP-Spiegel in hTert- und HaCaT-Keratinozyten und Flotillinen zu untersuchen. Flotilline könnten hierbei als potenzielle Angriffspunkte dienen, um die Adhäsion in PV-betroffenen Zellen zu stärken. Zudem sollen grundlegende Interaktionen innerhalb der Desmosomen näher erforscht werden, insbesondere in Bezug auf die Rolle der Flotilline. Ein Nebenziel war es, mithilfe der Isolierung von Einzelzellen Flot2 defiziente hTert-Zellen zu generieren, um die Folge des Knockouts von Flot2 auf den protektiven cAMP-Mechanismus zu untersuchen. Die Bedeutung von Flot2 Phosphorylierung an Tyrosin 163 bei der desmosomalen Adhäsion sollte zusätzlich untersucht werden, um ein besseres Verständnis der spezifischen Rolle von Flot2 in Keratinozyten zu ermöglichen.

2 Material

2.1 Technische Geräte

In den folgenden Tabellen sind die eingesetzten technischen Geräte und Materialien inklusive Hersteller und Firmensitz aufgeführt.

Tabelle 1: Auflistung der Geräte und Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Becherglas (100 ml, 150 ml, 250 ml, 400 ml, 600 ml und 800 ml)	Roth, Karlsruhe (DE)
Blotkammer, Criterion Blotter	Bio-Rad, München (DE)
CO ₂ -Inkubator MCO-18AIC zur <i>in vitro</i> Zellkultivierung	Sanyo, Osaka (JP)
Erlenmeyerkolben (500 ml)	Roth, Karlsruhe (DE)
Fluoreszenzmikroskop-Kamera, ORCA-Flash 4.0 C13440	Hamamatsu Photonics, Hamamatsu (JP)
Fluoreszenzmikroskop, Aurox Clarity	Aurox, Abingdon (UK)
Gefrierbehälter, Mr. Frosty	Thermo Fisher Scientific, Dreieich (DE)
Heizblock, HLC	Labomedic, Bonn (DE)
Kühlschrank -20 °C comfort	Liebherr, Kempten (DE)
Gefrierschrank -80 °C freeze	Hera, Baden-Baden (DE)
Kühlschrank +6 °C profi line	Liebherr, Kempten (DE)
Lichtmikroskop, AE31	Motic, Wetzlar (DE)
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank, HeraSafe KS	Thermo Fisher Scientific, Dreieich (DE)
Multipipette, E3	Eppendorf, Hamburg (DE)
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen (DE)
Objektträger, 76 x 26 mm	Neo-Lab, Heidelberg (DE)
Petrischale, Ø 10 cm Glas	Roth, Karlsruhe (DE)
Pinzette	Neo-Lab, Heidelberg (DE)
Pipetten, Pipetman L	Gilson International B.V., Limburg (DE)
Pipetten, Research Plus	Eppendorf, Hamburg (DE)
Pipettierhelfer, accu-jet	A. Hartenstein, Würzburg (DE)

Scanner, Epson Perfection 3200	Herzog Computer Systeme, Frankfurt (DE)
Schwenktisch, WS-10	Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen (DE)
SDS-Gel Gießkammer	Amersham Bioscience, Freiburg (DE)
SDS-PAGE Kammersystem	Amersham Bioscience, Freiburg (DE)
Sonoplus Ultraschallhomogenisatoren	Bandelin electronics, Berlin (DE)
Spannungsquelle, EPS 301	Amersham Bioscience, Freiburg (DE)
TECAN Infinite M200	Thermo Fisher Scientific, Dreieich (DE)
Vortexmischer, V-1 Plus	A. Hartenstein, Würzburg (DE)
Waage, SI-64	Denver Instrument GmbH, Göttingen (DE)
Waage, Toledo PB602-S	Mettler-Toledo, Gießen (DE)
Wasserbad	LAUDA Dr. R. Wobser, Lauda-Königshofen (DE)
Zentrifuge, 5424 R	Eppendorf, Hamburg (DE)
Zentrifuge, Mikro 200 R	Hettich, Kirchlengern (DE)
Zentrifuge mit Kühlung, Mikro 22R	Hettich, Kirchlengern (DE)
Zentrifuge, Universal 32R	Hettich, Kirchlengern (DE)

2.2 Verbrauchsmaterialien

In den folgenden Tabellen sind die eingesetzten Verbrauchsmaterialien inklusive Hersteller und Firmensitz aufgeführt.

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheiten	Merck Millipore, Darmstadt (DE)
Cellstar Plastikröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen (DE)
Deckgläschen Ø 15 mm	Menzel, Braunschweig (DE)
Filterpapier, Protran BA 83	Whatman, Dassel (DE)
Impfnadeln	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen (DE)

Mikrotiterplatten 96-Well	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)
Nitrocellulose-Membran	Whatman GmbH, Dassel (DE)
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1 ml, 2 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)
Skalpell	Schreiber GmbH, Fridingen (DE)
Parafilm	Bemis, Wisconsin (USA)
Pasteurpipetten, Glas	Roth, Karlsruhe (DE)
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Nerbe Plus, Winsen (DE)
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 96-Well)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)
Zellkulturflaschen (T-25, T-75)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)
Zellschaber	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)

2.3 Chemikalien und Puffer

In den folgenden Tabellen sind die eingesetzten Chemikalien und verwendeten Puffer inklusive Hersteller und Firmensitz aufgeführt.

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Puffer

Chemikalie/Puffer	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe (DE)
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Acrylamid (AA)	Roth, Karlsruhe (DE)
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem, Darmstadt (DE)
Ampicillin	Roth, Karlsruhe (DE)
Bovine Serum Albumin (BSA)	PAA, Cölbe (DE)
Bradford Reagenz	Bio-Rad, München (DE)
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe (DE)
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Roth, Karlsruhe (DE)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Roth, Karlsruhe (DE)
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt (DE)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Essigsäure	Roth, Karlsruhe (DE)
Ethanol	Roth, Karlsruhe (DE)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe (DE)
Forskolin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Fötale Kälberserum (FBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Glycerin	Roth, Karlsruhe (DE)
Glycin	AppliChem, Darmstadt (DE)
Hanks' balanced salt solution (HBSS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Isopropanol	Roth, Karlsruhe (DE)
Keratinocyte Growth Medium 2 (KGM 2) mit SupplementMix & CaCl ₂ Solution	PromoCell, Heidelberg (DE)
Methanol	Roth, Karlsruhe (DE)
Milchpulver	Roth, Karlsruhe (DE)
Natrium-Phosphat-Puffer	AppliChem, Darmstadt (DE)
Natriumcarbonat	AppliChem, Darmstadt (DE)
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe (DE)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe (DE)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe (DE)
Natriumpyruvat	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Nonoxinol-P40 (NP-40)	Roth, Karlsruhe (DE)
Ponceau S	AppliChem, Darmstadt (DE)
Protein G Sepharose	GE Healthcare, Buckinghamshire (UK)
Proteinase Inhibitor Cocktail (PI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Proteinmarker	Bio-Rad, München (DE)
Rolipram	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Roti®-Mount FluorCARE 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Roth, Karlsruhe (DE)
SuperSignal West Femto/Pico Chemilumineszenz-Substrat	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe (DE)

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (Tris HCl)	Roth, Karlsruhe (DE)
Trypanblau	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Tween 20	Roth, Karlsruhe (DE)
Zitronensäure	Roth, Karlsruhe (DE)

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten selbstgemischten Puffer mit Zusammensetzung

Puffer	Zusammensetzung
Blockierungspuffer für WB	5% Milchpulver in TBST
Blockierungspuffer für IF	1% BSA in PBS
Blottingpuffer	192 mM Glycin 25 mM Tris 10% Methanol
Einfriermedium	10% DMSO in FBS
Lämmli-Gelelektrophorese-Puffer	192 mM Glycin 25 mM Tris 0,1% SDS
Natriumcitratpuffer (20 mM, pH 2,4)	0,37% Zitronensäure 0,03% Natriumcitrat
Natriumphosphat-Puffer (200 mM, pH 7,3)	150 mM Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O 20 mM NaH ₂ PO ₄ • 2 H ₂ O
PBS pH 7,4	150 mM NaCl 20 mM NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O
Ponceau S	0,1% Ponceau-red 5% Essigsäure
Proteinladepuffer (4x)	100 mM DTT 250 mM Tris-HCl pH 6,8 8% SDS 40% Glycerin 0,4% Bromphenolblau 20% 2-Mercaptoethanol

Stürmer-Lysepuffer	150 mM NaCl 50 mM Tris pH 7,4 2 mM EDTA 1% Nonoxinol 40 (NP-40)
Tris-buffered saline Tween 20 (TBST)	150 mM NaCl 0,05% Tween-20 100 mM Tris-HCl pH 7,4

WB: Western Blot; IF: Immunfluoreszenz

2.4 Enzyme

Die Tabelle 5 listet die benutzten Enzyme auf.

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Enzyme

Enzyme	Hersteller
Dispase II	Roche, Basel (CHE)
Trypsin	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

2.5 Antibiotika

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Antibiotika aufgelistet, die den Nährmedien zugesetzt wurden.

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Antibiotika

Antibiotika	Hersteller
Gentamycinsulfat	Serva, Heidelberg (DE)
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe (DE)

2.6 Antikörper

In den folgenden Tabellen sind die verwendeten primären und sekundären Antikörper für Western Blot (WB) und Immunfluoreszenzmikroskopie (IF) mit Angabe der Verdünnung in TBST (WB) oder 1% BSA in PBS (IF) aufgelistet.

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten primären Antikörper

Antikörper	Wirt	Verdünnung		Hersteller
		WB	IF	
Anti-Dsg1 (B-11)	Maus	1:1.000	/	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg (DE)
Anti-Dsg3 (5H10)	Maus	1:1.000	/	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg (DE)
Anti-Flot1	Maus	1:1.000	1:100	BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ (USA)
Anti-Flot2	Maus	1:1.000	1:50	BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ (USA)
Anti-GAPDH (6C5)	Maus	1:20.000	/	Abcam, Cambridge (UK)
Anti-GFP	Maus	1:1.000	/	Roche, Basel (CHE)

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten sekundären Antikörper

Antikörper	Wirt	Verdünnung		Hersteller
		WB	IF	
Anti-mouse Alexa Fluor (AF) 488	Esel	/	1:300	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Anti-mouse IgG/HRP	Ziege	1:5000	/	Dako, Hamburg (DE)

2.7 Zelllinien

In Tabelle 9 sind die verwendeten Zelllinien aufgezählt und in Tabelle 10 die benötigten Nährmedien mit Zusammensetzungen.

Tabelle 9: Zelllinien

Zelllinien Bezeichnung	Information	Kultivierung
AK23 Hybridoma Zellen	Immortalisierte Maus Hybridoma-Zellen, die mAK23 produzieren (Tsunoda et al. 2003), Geschenk von Amagai Arbeitsgruppe	Gibco RPMI 1640 Medium ++++ ISF-1 Medium Bei +37 °C und 5% CO ₂
HaCaT	Immortalisierte humane Keratinocyten (Boukamp et al. 1988)	DMEM++++ Bei +37 °C und 5% CO ₂
hTert/KER-CT	Immortalisierte humane Keratinocyten (Beckert et al. 2019)	KGM 2+++ Bei +37 °C und 5% CO ₂

Tabelle 10: Nährmedien

Medium Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)++++	10% FBS 1% Penicillin/Streptomycin 1% NEAA 1 mM Natriumpyruvat	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
ISF-1 Medium	Für AK23 Hybridoma Antikörper Produktion: 60% ISF-1 und 40% RPMI ++++	BioSell, Nürnberg (DE)

Keratinocyte Growth Medium 2 (KGM 2) + + +	SupplementMix: 4 µl/ml Boviner Hypophysen Extrakt 0,125 ng/ml Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) 5 µg/ml Insulin 0,33 µg/ml Hydrocortison 0,39 µg/ml Adrenalin 10 µg/ml Transferrin 0,05 mM CaCl ₂ Solution 30 µg/ml Gentamycin Sulfat	PromoCell, Heidelberg (DE)
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium + + + + +	10% FBS 1% Penicillin/Streptomycin 1% NEAA 1 mM Natriumpyruvat 1% 2-Mercaptoethanol	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

2.8 Computerprogramme für Bilderbearbeitung, statistische Analysen und Graphendesign

In Tabelle 11 sind die verwendeten Programme mit Anwendungsbereichen und Hersteller angegeben.

Tabelle 11: Computerprogramme

Programm Bezeichnung	Anwendung	Hersteller
GraphPad Prism 6	Durchführung von statistischen Analysen und Anfertigung von Graphen	GraphPad Software Inc., San Diego, CA (USA)
Fiji	Bildbearbeitungsprogramm, Auswertung von WB	Wayne Rasband (USA)

Magellan	Steuerung von Mikroplatten-Readern, die in der Bradford-Analyse die Datenerfassung, Erstellung von Standardkurven und Berechnung der Proteinkonzentrationen ermöglicht	Tecan Austria GmbH, Grödig (AUT)
Microsoft Office 2013	Datendokumentation, Textverarbeitungsprogramm	Microsoft Corporation (USA)
Zotero	Open-Source-Software zur Literaturverwaltung	Corporation for Digital Scholarship (CDS), Fairfax, Virginia (USA)

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Standardmethoden

3.1.1 Kultivierung der hTert, HaCaT und AK23-Hybridoma Zelllinien

Die immortalisierten humanen Keratinozyten (hTert) wurden in T-25 Zellkulturflaschen bei einer Temperatur von 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Als Nährmedium diente 5 ml Keratinocyte Growth Medium 2 (KGM 2) pro T-25 Zellkulturflasche. Dieses Medium wurde durch Zugabe von SupplementMix (die genaue Zusammensetzung ist in **Tab. 10** dargestellt), 30 µg/ml Gentamycin und 0,05 mM CaCl₂ ergänzt. Zur Induktion der desmosomalen Zell-Zell-Kontakte in den hTert-Zellen wurde das Nährmedium mit 2 mM CaCl₂ KGM 2 ersetzt (Beckert et al. 2019).

Die Kultivierung der HaCaT-Keratinozyten erfolgte unter den gleichen Bedingungen. Im Unterschied dazu wurde als Nährmedium DMEM (**Tab. 10**) verwendet, welches mit 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% NEAA und 1 mM Natriumpyruvat supplementiert wurde.

Die AK23-Hybridoma-Zellen wurden unter gleichen Bedingungen in Medium RPMI 1640 (die genaue Zusammensetzung ist in **Tab. 10** dargestellt) und in einer T-75 Zellkulturflasche kultiviert. Um die Produktion des monoklonalen Antikörpers AK23 zu induzieren, wurde das Kulturmedium durch eine Kombination aus ISF-1 Medium mit RPMI ersetzt.

3.1.2 Passagieren der Zelllinien hTert und HaCaT

Wenn die hTert-Zellen zu ca. 90% konfluent den Boden der T-25 Zellkulturflasche bedeckten, musste eine Subkultivierung der Zellen durchgeführt werden, um die Zelldichte zu reduzieren. Zur Vermeidung einer Kontamination durch Fremdmikroorganismen erfolgte die Subkultivierung in der Sterilbank unter sterilen Bedingungen. Zunächst wurde das verbrauchte Nährmedium entfernt und anschließend mit 5 ml PBS/0,05% EDTA für max. 10 min bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert, sodass die Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen chelatiert wurden. Nach Entfernung der PBS/0,05% EDTA-Lösung wurde für 2 bis 3 min 200 µl Trypsinlösung zugegeben, sodass die Zellen sowohl von der Oberfläche der Zellkulturflasche als auch voneinander gelöst wurden. Nach optischer Kontrolle am Mikroskop wurde die Trypsinwirkung durch Zugabe von 800 µl PBS/2% FBS neutralisiert. Die 1 ml Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 1300 rpm zentrifugiert. Der

Flüssigkeitsüberstand wurde entfernt und das Zellpellet mit 1 ml 0,05 mM CaCl₂ KGM 2 Nährmedium resuspendiert. Zur Herstellung einer neuen Subkultur wurden 150 µl der Zellsuspension in eine frische T-25 Kulturflasche überführt und mit 5 ml KGM 2 Nährmedium aufgefüllt.

Die HaCaT-Zellen wurden ebenfalls unter sterilen Bedingungen passagiert. Nach Entfernung des verbrauchten Nährmediums wurden die Zellen mit 5 ml PBS/0,05% EDTA für ca. 10 min bei 37°C und 5% CO₂ Partialdruck im Brutschrank inkubiert. Nach Entfernung der PBS/0,05% EDTA-Lösung wurde 500 µl Trypsinlösung zugeben und erneut für 10 min bei 37°C und 5% CO₂ Partialdruck im Brutschrank inkubiert. Zur Inaktivierung des Trypsins wurde 500 µl DMEM + + + + (**Tab. 10**) hinzugegeben. Die gesamte Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Um eine neue Subkultur zu etablieren, wurden 100 µl der Zellsuspension in eine T-25 Kulturflasche überführt und mit 5 ml DMEM + + + + Nährmedium ergänzt.

3.1.3 Zellzählung und Aussäen in Zellkulturplatten

Um die Zellzahl zu bestimmen, wurde in einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß 20 µl von der Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau vermischt. Die 10 µl von der verdünnten Zellsuspension wurde unter das Deckgläschen auf der Neubauer-Kammer appliziert. Durch das Mikroskop wurden die verteilten Zellen in der Neubauer-Kammer sichtbar. Die Zellzahl auf den Kammern wurden jeweils gezählt und anschließend der Durchschnitt berechnet. Da die Zellsuspension 1:2 mit Trypanblau verdünnt wurde, musste der Durchschnittswert verdoppelt werden. Die Quadrate weisen eine Fläche von 1 mm² und eine Kammerhöhe von 0,1 mm auf, daher beträgt ein Quadrat Volumen 0,1 µl. Aus diesem Grund muss der Wert verzehnfacht werden, um die Zellzahl pro µl zu erhalten. Für eine 24-Well-Platte wurden 20.000 Zellen pro Well ausgesät. Für die 12-Well-Platte wurden 40.000 Zellen pro Well benötigt und für die 6-Well-Platte 60.000 Zellen pro Well.

3.1.4 Kryokonservierung von Zellen

Zu Beginn wurden die Zellen in einer T-25 Zellkulturflasche ausgesät und inkubiert bis die Zellen 90% Konfluenz erreichten. Nach 10 min Waschen mit PBS/0,05% EDTA wurden die Zellen trypsinisiert und mit PBS/2% FBS in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Nach Zentrifugation mit 1300 rpm für 5 min wurde der Flüssigkeitsüberschuss abpipettiert und mit 1 ml Einfriermedium (FBS + 10% DMSO) suspendiert. Die Zellsuspension, versetzt mit Einfriermedium, wurde in Kryoröhrchen gegeben und zur

kontrollierten Abkühlung zunächst in einem Mr. Frosty-Gefrierbehälter mit Isopropanol bei -80°C über Nacht gelagert. Am folgenden Tag erfolgte die Umlagerung der Kryoröhrchen in Lagerboxen bei -150°C, um die langfristige Kryokonservierung sicherzustellen.

3.1.5 Behandlung der Zellen mit anti-Dsg3- und Kontroll- (Ktrl) IgG-Antikörpern

Nach Erreichen der Konfluenz in den ausgesäten Well-Platten mit hTert-Zellen wurde das Medium durch KGM 2 mit 2 mM CaCl₂ ersetzt. Die Zellen wurden für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Vorbereitung der Zusätze durchgeführt, gefolgt von der Behandlung der Zellen mit Antikörpern. Die Antikörper wurden in einer Konzentration von 75 µg/ml appliziert. Die benötigte Antikörpermenge für ein Well einer 24-Well-Platte wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{AK Menge in } \mu\text{l} = \frac{0,075 \mu\text{g}/\mu\text{l} \cdot 350 \mu\text{l}}{c} ; c = \text{Stock Konzentration}$$

3.1.6 Modulation des cAMP-Spiegels mit Forskolin und Rolipram

Zur Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels wurden die Zellen mit 5 µM Forskolin und 10 µM Rolipram für 24 h behandelt. Forskolin wirkt als Aktivator der Adenylatcyclase (AC) und fördert dadurch die Synthese von cAMP aus ATP. Gleichzeitig hemmt Rolipram die PDE-4, wodurch die Degradation von cAMP zu AMP verhindert wird (Spindler et al. 2010). Die Behandlung mit dem pathogenen Antikörper mAK23 oder Kontrollantikörper (Ktrl IgG) erfolgte kurz nach dem Austausch des Nährmediums, das entweder mit oder ohne Forskolin/Rolipram zugesetzt wurde.

Für die HaCaT-Zellen entfiel der Mediumwechsel mit erhöhtem Calciumgehalt, da DMEM-Medium bereits eine hohe Calciumkonzentration enthält. Nach Erreichen der Konfluenz konnten die Zellen direkt mit Forskolin/Rolipram und/oder Antikörpern behandelt werden. Für die HaCaT-Keratinocyten wurde eine Konzentration von 20 µM Forskolin und 20 µM Rolipram verwendet, da diese Konzentrationen als wirksam identifiziert wurden.

3.1.7 Gewinnung aus Einzelzellklonen

Um Flot1- oder Flot2-defiziente hTert-Zellen zu erzeugen, wurden die Zellen mithilfe der CRISPR-Cas9-Technik und lentiviraler Transduktion durch Benedikt Beckert hergestellt. Um eine homogene Zellkultur zu etablieren, wurde daher eine zielgerichtete Selektion

eines Einzelzellklons durchgeführt (**Abb. 7**). Zunächst wurden die hTert-Zellen in einer T-25 Kulturflasche ausgesät und kultiviert bis eine Konfluenz von 90% erreicht wurde. Nach 10 min Waschen mit 5 ml PBS/0,05% EDTA wurden die Zellen mit 200 µl Trypsinlösung trypsiniert. Nach 3 min Inkubation wurden die Zellen mit 800 µl 2% FBS/PBS verdünnt. Die Zellzahl wurde mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt und anschließend berechnet. Anhand der bestimmten Zellzahl wurde die Zellsuspension verdünnt, dass eine Konzentration von 2 Zellen pro Well erreicht wurde. Die 100 µl der verdünnten Zellsuspension wurden in jedes Well einer 96-Well-Platte pipettiert. Die einzelnen Wells wurden regelmäßig mikroskopisch überwacht und dokumentiert, um Wells mit einem Einzelzellklon zu identifizieren. Nach Erreichen einer 90% Konfluenz wurden die Einzelzellklone aus den identifizierten Wells in eine 24-Well-Platte überführt. Das Vorgehen zur Zellablösung folgte dem zuvor beschriebenen Protokoll, mit 200 µl PBS/0,05% EDTA, gefolgt von der Zugabe von 50 µl Trypsinlösung und einer Inaktivierung mit 200 µl 2% FBS/PBS. Die Übertragung erfolgte dann in eine 12-Well-Platte. Aus den konfluenten Wells wurden Proben hergestellt, um die Zellen mithilfe der WB-Methode zu charakterisieren.

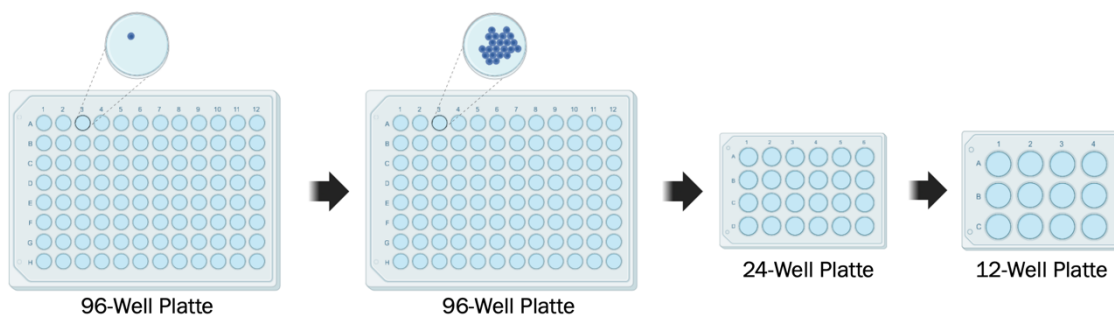


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Gewinnung von Einzelzellklonen (erstellt mit BioRender (<https://BioRender.com>))

Die hTert-Keratinocyten wurden in eine 96-Well-Platte mit 2 Zellen pro Well ausgesät. Die konfluenten Wells wurden in eine 24-Well-Platte überführt und anschließend in zwei 12-Well-Platten, sodass Zellen kryokonserviert und WB-Proben zur Analyse geerntet werden konnten.

3.1.8 Monolayer-Dissoziationsassay

Um die Stabilität der Zell-Zell-Adhäsion nach Stimulation mit pathogenen anti-Dsg3-Antikörpern wie mAK23 zu untersuchen, wurde der Monolayer-Dissoziationsassay verwendet (**Abb.8**) (Ishii et al. 2005; Zakrzewicz et al. 2022). In eine 24-Well-Platte

wurden 20.000 hTert-Zellen pro Well ausgesät. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert, bis eine vollständige Konfluenz erreicht war. Anschließend wurde das Kulturmedium durch KGM 2 mit 2 mM CaCl₂ ersetzt, um die Ausbildung desmosomaler Zell-Zell-Kontakte zu fördern. Die Zellen wurden für weitere 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Das Kulturmedium wurde auf 350 µl pro Well reduziert, welches zum Teil mit Zusätzen wie Forskolin und Rolipram versetzt wurde. Im Anschluss wurden die Antikörper mit einer Konzentration von 75 µg/ml in die Wells pipettiert. Die Zellen wurden erneut für 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert, bevor der Dissoziationsassay begonnen wurde. Zunächst wurde das Enzym Dispase II in HBSS zu einer Konzentration von 2,5 U/ml vorbereitet. Nach Entfernen des alten Mediums wurden die Wells mit 500 µl HBSS pro Well gewaschen, sodass 350 µl von der Dispase-Lösung pro Well zugegeben werden konnte. Die Platte wurde für 30 min bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert, um die Zellmonolayer von der Oberfläche der Wells zu lösen. Danach wurde die Dispase-Lösung vorsichtig mit einer Pipette entfernt, um die Monolayer nicht zu beschädigen. Zur Visualisierung der Zellmonolayer wurden 20 µl MTT pro Well zugegeben. Die Zellen wurden für 15 min bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert, bis sich eine sichtbare Färbung der Zellmonolayer ergab. Um die desmosomale Adhäsion abschätzen zu können, wurden die Zellmonolayer einer mechanischen Belastung ausgesetzt. Dazu wurden die Monolayer durch definiertes Pipettieren mechanisch beansprucht. Die benutzten Pipettenspitzen wurden mit einer 1% BSA-Lösung beschichtet. Beim Pipettieren wurde mit der positiven Kontrollgruppe begonnen. Die Monolayer dieser Wells wurde so lange wiederholt auf- und abpipettiert, bis die erste Fragmentierung sichtbar wurde. Die Anzahl der Pipettierschritte bis zur Fragmentierung wurde als Referenz festgelegt. Die gleiche Anzahl an Pipettierschritten wurde dann auf die restlichen Wells angewendet. Nach der mechanischen Belastung wurden die Fragmentierungsgrade der Zellmonolayer dokumentiert. Dies erfolgte durch eine visuelle Aufnahme der 24-Well-Platte mittels eines Scanners. Das Pipettieren wurde so lange wiederholt, bis auch die Monolayer der Negativkontrollgruppe fragmentierten. Zur Quantifizierung der Fragmentierung wurden die gescannten Bilder der Well-Platte auf DIN-A4 Papier ausgedruckt und manuell gezählt. Der Mittelwert der drei Replikate wurde als Maß für den Grad der Fragmentierung verwendet.

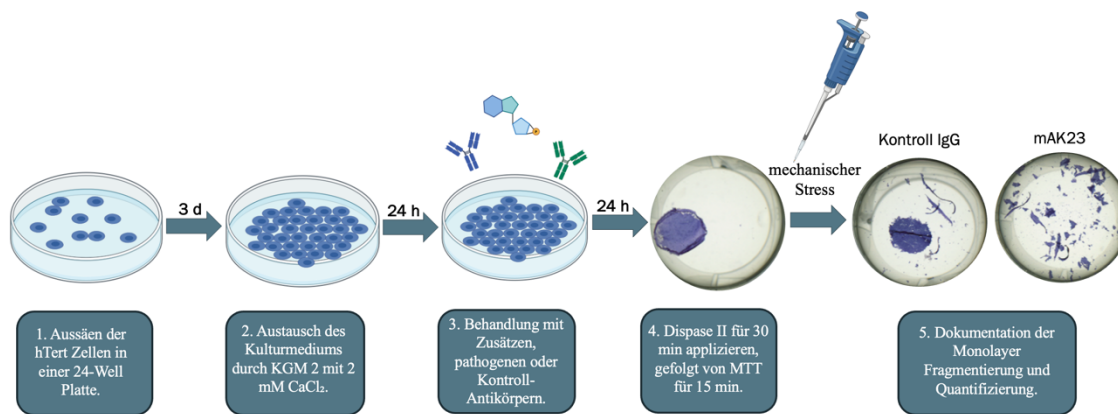


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Monolayer-Dissoziationsassay (erstellt mit BioRender (<https://BioRender.com>))

(1) Die hTert-Keratinocyten wurden in eine 24-Well-Platte ausgesät. (2) Nach drei Tagen erreichten die Zellen Konfluenz, sodass das Kulturmedium durch KGM 2 mit 2 mM CaCl₂ ersetzt werden konnte. (3) Nach 24 h wurden die Zellen mit 350 µl Kulturmedium ausgetauscht, welches mit Zusätzen wie Forskolin und Rolipram versetzt wurde. Im Anschluss wurden die Kontrollantikörper oder mAK23 einzeln in die Wells pipettiert. (4) Nach weiteren 24 h konnte der Dissoziationsassay eingeleitet werden. Das Enzym Dispase II wurde für 30 min in die Wells appliziert, um die Monolayer von dem Plattenboden zu lösen. Im Anschluss wurde die Dispase-Lösung abpipettiert. Zur Visualisierung der Zellmonolayer wurden die Zellen für 15 min mit MTT behandelt. Durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren der Monolayer wurden die Zell-Zell-Kontakte unter mechanischer Belastung getestet. (5) Die Zellmonolayer wurden mit einem Scanner erfasst und die Bilder zur Quantifizierung der Zell-Zell-Kontakte ausgewertet.

3.2 Biochemischen Methoden

3.2.1 Herstellung der Zellysate

Zur Herstellung von Zellysaten wurden die Zellen in 12-Well-Platten kultiviert. Nach der Behandlung der Zellen wurden diese geerntet. Zunächst wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 70 µl von dem Stürmerlysepuffer mit PI (1:100) in jedes Well hinzugegeben und für 10 min inkubiert, um die Lyse der Zellmembran einzuleiten. Die Zellen wurden dann mit dem Zellschaber mechanisch von dem Boden der Well-Platte entfernt und mit dem Lysepuffer vermischt. Die Zellysate wurden in jeweils 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für mind. 1 h bei -20°C gelagert. Dann wurden die Zellysate durch Ultraschallbehandlung (Sonikation) homogenisiert, um Zelltrümmer zu zerkleinern und Proteine freizusetzen. Im Anschluss wurde das Lysat für 10 min bei 15.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das klare Zellysate

wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, während das Zellpellet am Boden des Gefäßes zurückblieb. Die Zellysate wurden entweder auf Eis gelagert, wenn die Proteinbestimmung unmittelbar erfolgen sollte, oder bei -20°C eingefroren, falls die Analyse zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt wurde.

3.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Proteinbestimmung wurde die Bradford-Methode angewendet (Bradford 1976). Die Proteinproben wurden mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:40 oder 1:75 verdünnt, sodass die Konzentrationen der Proben innerhalb des messbaren Bereichs lagen. Auf einer 96-Well Mikroplatte wurden eine Standardreihe für die ersten neun Reihen mit jeweils 10 µl pro Well in Triplikaten pipettiert. Die Standardlösungen hatten die folgenden festgelegten BSA-Konzentrationen: S0: dest. H₂O, S1: 0,02 mg/ml, S2: 0,05 mg/ml, S3: 0,1 mg/ml, S4: 0,15 mg/ml, S5: 0,2 mg/ml, S6: 0,25 mg/ml, S7: 0,3 mg/ml. Die zu untersuchenden, verdünnten Proteinproben wurden ebenfalls in Triplikaten nach der Standardreihe in die freien Wells der 96-Well-Platte pipettiert. Mit der Multipipette wurde in jedes Well 200 µl Bradford-Reagenz mit destillierten H₂O verdünnt zu 1:5 zugegeben. Vor der Messung an dem Plattenphotometer muss mind. 5 min gewartet werden, sodass die Farbreaktion stattfinden kann. Die Absorption der Proben wurde mit einem Plattenphotometer (Tecan Mikroplattenleser) gemessen, wobei das Absorptionsmaximum bei 595 nm detektiert wurde. Die Proteinkonzentration der Proben wurde durch Vergleich der gemessenen Absorptionen mit der Standardkurve berechnet.

3.2.3 SDS-PAGE und Western Blot zur Proteincharakterisierung

Die SDS-PAGE Methode dient der molekularen Auftrennung von Proteinen entsprechend der Molekulargröße. Die Proteine wandern durch eine Polyacrylamid-Gelmatrix, wobei kleinere Proteine schneller als größere migrieren können. Das im Polyacrylamid-Gel enthaltene Natriumdodecylsulfat ummantelt die Proteine, sodass alle eine einheitliche negative Ladung erhalten. Als Folge wandern die Proteine im elektrischen Feld in Richtung der Anode.

Es wurden SDS-PAGE Gele mit 10%igem Polyacrylamidgehalt hergestellt, die aus einem Trenngel (10%) und Sammelgel (4%) bestehen (**Tab. 12**). Das Sammelgel bewirkt eine Fokussierung der Proteine durch die geringere Polyacrylamidkonzentration, wodurch eine gleichmäßige Proteinbandenbildung gewährleistet wird.

Tabelle 12: SDS-PAGE Gele

	Trenngel 10%	Sammelgel 4%
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	12,5 mM	/
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	/	4,2 mM
SDS 20%	0,1%	0,1%
AA	10%	4%
APS	0,5%	0,5%
TEMED	0,1%	0,1%

Zur Proteinprobenvorbereitung wurde die zu pipettierende Probenmenge (in μl) für eine Proteinmenge von 10 μg anhand der bestimmten Proteinkonzentration berechnet. Die Proteinproben wurden mit 4x Ladepuffer versetzt und mit destilliertem Wasser auf 50 μl aufgefüllt. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben für 5 min bei $+95^{\circ}\text{C}$ erhitzt. Es wurden 10 μl Proteinproben und 2 μl Proteinmarker auf die Gelspur pipettiert. Die SDS-Gelelektrophorese mit dem Lämmli-Puffer wurde an eine Stromquelle angeschlossen und lief zu Beginn mit einer Stromstärke von 15 mA pro Gel. Nachdem die Proteinfront die Hälfte des Gels erreicht hatte, wurde die Stromstärke auf 30 mA pro Gel erhöht. Nach 90 min Laufzeit wurde das Polyacrylamid-Gel mit den aufgetrennten Proteinen auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, um die WB-Methode durchzuführen. Das Polyacrylamid-Gel und die Nitrocellulosemembran wurden in einer Kompressionskassette zwischen zwei Filterpapieren und Schwämmen luftblasenfrei positioniert. Die Kompressionskassetten wurden in die Kammer mit dem Transferpuffer zwischen die Anode und die Kathode platziert. Die Proteinübertragung erfolgte bei einer Stromstärke von 400 mA für 90 min. Die negativ geladenen Proteine wanderten von der Kathode in Richtung Anode, wodurch die Proteine auf der Nitrocellulosemembran fixiert wurden. Zur Kontrolle der Proteinübertragung wurde die Membran temporär mit der Ponceau-Färbelösung behandelt, die Proteine unspezifisch sichtbar macht. Die Ponceau-Lösung wurde nach der Überprüfung der Proteinübertragung mit einigen Waschschritten TBST-Puffer entfernt.

Um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu verhindern, wurden die hydrophoben Bindungsstellen der Membran blockiert. Dazu wurde die Membran für 1 h in einer 5%igen Magermilchlösung in TBST inkubiert. Nach Waschen der Membran mit TBST wurde der Primärantikörper hinzugeben (**Tab. 7**), der an das spezifisch gewünschte

Protein bindet. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Am folgenden Tag erfolgten drei Waschschrte mit TBST für jeweils 10 min, um überschüssige, ungebundene Antikörper zu entfernen. Danach wurde der Sekundärantikörper für 1 h auf die Membran gegeben, der mit HRP (Peroxidase) konjugiert ist und gleichzeitig an den Primärantikörper bindet. Die überschüssigen Sekundärantikörper (**Tab. 8**) wurden durch dreimalige Waschschrte für 10 min mit TBST entfernt.

Um die Proteine mit den gebundenen Primär- und Sekundärantikörpern sichtbar zu machen, wurde das ECL (*Enhanced Chemiluminescence*) WB-Substrat verwendet. Das Substrat wurde aus zwei Lösungen I und II im Verhältnis 1:1 angemischt und auf die Membranen für 3 min appliziert. Die mit HRP konjugierten Sekundärantikörper katalysieren die Oxidation von Luminol (Bestandteil von Lösung I) durch H₂O₂ (Bestandteil von Lösung II). Diese chemische Reaktion führt zur Bildung von instabilen Dioxetan-Derivaten, die in den Grundzustand zurückkehren und dabei Licht emittieren. Das emittierte Licht wurde mit einem Chemilumineszenz-Lesegerät (z. B. LICOR) detektiert und dokumentiert. Die Quantifizierung erfolgte mit der Software ImageJ, womit die Intensitäten der Grauwerte analysiert wurden (**Abschnitt 3.5**).

3.2.4 Messung des cAMP-Spiegels

Die intrazellulären cAMP-Konzentrationen wurden mithilfe des cAMP Enzyme Immunoassay Kits (EIA, Kat.-Nr. CA-200, Sigma-Aldrich) quantifiziert. Dazu wurden konfluente hTert-Keratinocyten bis zu maximal 6 h mit Forskolin (5 µM; Sigma-Aldrich) und Rolipram (10 µM; Sigma-Aldrich) oder DMSO behandelt. Nach der Behandlung wurden die Zellen gewaschen und in 0,1 M HCl lysiert. Die gewonnenen Zelllysate wurden bei 600 g für 10 min zentrifugiert und die Überstände wurden gemäß den Anweisungen des Herstellers für die Messung verwendet. Die Intensität der Farbänderung wurde mit einem Tecan Infinite 200 Plattenlesegerät und der Magellan Software Version V7.2 gemessen. Die cAMP-Konzentration wurde anhand der intern gemessenen Standardkurve berechnet.

3.3 Aufreinigung von mAK23 und Kontrollantikörpern

Für die Experimente wurde der monoklonale Antikörper mAK23 eingesetzt, um den pathogenen Effekt der Akantholyse an Zell-Zell-Verbindungen zu induzieren (Tsunoda et al. 2003). Zur Produktion des monoklonalen Antikörpers wurden Hybridomazellen

verwendet, die von der Arbeitsgruppe Amagai aus Japan bereitgestellt wurden. Nach einer 10-tägigen Kultivierung der Hybridomazellen in Zellkulturflaschen wurde der Flüssigkeitsüberstand entnommen und in 50 ml Aliquots bei -20°C gelagert. Die Kontrollantikörper wurden aus Mäuseserum isoliert, das im Rahmen des „Versuchstierkundlichen Kurses“ der JLU Gießen gewonnen wurde. In diesem Kurs üben die Teilnehmenden die Blutentnahme an Versuchstiermäusen, wobei die entnommenen Blutproben zur Verfügung gestellt wurden.

Zur Aufreinigung der monoklonalen Antikörper wurde die Affinitätschromatographie eingesetzt (**Abb. 9**). Am ersten Tag wurden die 50 ml Aliquots der Hybridoma-Überständen aufgetaut und für 10 min bei 5.000 rpm zentrifugiert, um Zellrückstände zu entfernen. Anschließend wurde der pH-Wert durch Zugabe von 20 bis 40 μl 2 M Na_2CO_3 auf einen Wert über 8 angehoben, um die Bindung der Antikörper an Protein G zu ermöglichen. Zunächst wurden die Protein G Sepharose Beads durch mehrfaches Waschen mit Natriumphosphat für den Antikörper mAK23 vorbereitet. Dann wurden 0,5 bis 0,75 ml Protein G Sepharose 4 Fast Flow in 2 bis 3 ml Natriumphosphatpuffer resuspendiert und zu dem Hybridoma-Überstand gegeben. Die 50 ml Falcons wurden mit Parafilm verschlossen und über Nacht bei 4°C unter kontinuierlichem Rollen inkubiert.

Am folgenden Tag wurde das Gemisch erneut zentrifugiert, sodass der Flüssigkeitsüberstand verworfen werden konnte. Die verbliebende Protein G-mAK23-Suspension wurde mit der Restflüssigkeit vermischt und in eine Filtersäule überführt. Die Säule wurde mehrfach mit mind. 10 ml Natriumphosphatpuffer gewaschen und bei 5 min bei 5.000 rpm zentrifugiert. Die Bindung zwischen dem Antikörper und dem Antigen am Protein G wurde durch Zugabe von 2,5 ml 20 mM Zitronensäure (pH 2,4) gelöst. Um eine Neutralisierung der Zitronensäure zu gewährleisten, wurde im Sammelgefäß der Elutionsfraktion 50 μl 2 M Na_2CO_3 appliziert. Der Elutionsschritt wurde wiederholt, um die maximale Ausbeute an Antikörpern zu erzielen. Abschließend wurden die Antikörper mit einem Amicon-Konzentrator aufkonzentriert. Die Antikörperkonzentration wurde mit der Bradford-Methode (**Abschnitt 3.2.2**) bestimmt, um die für die Experimente benötigte Antikörpermenge berechnen zu können.

Die Mäuseblutproben wurden zentrifugiert, sodass die Serumanteile mit den enthaltenen IgG Kontrollantikörpern gepoolt werden konnten. Für die Aufreinigung der Kontrollantikörper wurde das gleiche Verfahren wie bei der Aufreinigung der monoklonalen Antikörper mAK23 angewandt. Nach der Zentrifugation des Serums und der Erhöhung des pH-Werts auf über 8 wurde das Protein G Sepharose 4 Fast Flow mit

dem Serum inkubiert. Nach der Übernacht-Inkubation bei 4 °C und der Zentrifugation wurden die Antikörper ähnlich wie bei mAK23 über eine Filtersäule aufgereinigt und eluiert. Die abschließende Bestimmung der Antikörperkonzentration erfolgte ebenfalls mittels der Bradford-Methode.

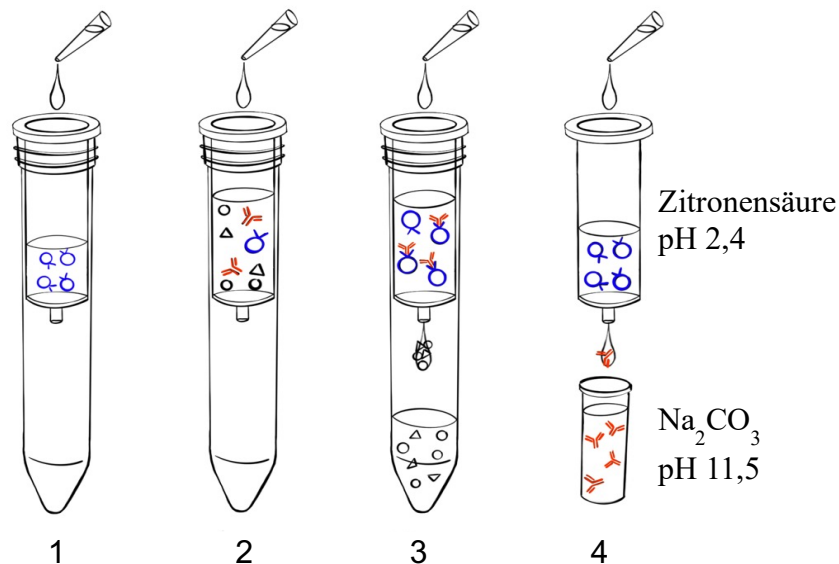


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Affinitätschromatographie (modifiziert nach <https://www.abcam.com>)

(1) Die Waschsäule enthält die Protein G beschichteten Beads (**blau**), die durch mehrfaches Waschen mit Natriumphosphatpuffer auf die Bindung der Antikörper mAK23 vorbereitet werden. (2) Der Hybridoma-Überstand mit den enthaltenden Antikörpern (**rot**) wird zu den Protein G beschichteten Beads in die Waschsäule gegeben. (3) Die Antikörper binden spezifisch an die Protein G beschichteten Beads, sodass diese nicht durch die Membran gelangen können. Um unerwünschte Substanzen aus dem Hybridoma-Überstand zu entfernen, wird die Säule mehrfach mit Natriumphosphatpuffer gewaschen. (4) Die gebundenen Antikörper werden durch Zugabe eines sauren Elutionspuffers von den Beads gelöst. Nach dem Durchlaufen der Membran fallen die Antikörper in eine Lösung mit basischem pH-Wert, sodass der saure pH-Wert neutralisiert wird.

3.4 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung und Mikroskopie

Zur Visualisierung von gewünschten Antigenen wurde die Methode der indirekten Immunfluoreszenz eingesetzt, die auf einem zweistufigen Inkubationsverfahren basiert. Zunächst bindet der primäre Antikörper spezifisch an die Antigene innerhalb der Zelle. Im zweiten Schritt bindet ein AF488-konjugierter sekundärer Antikörper an den primären Antikörper. Diese Methode ermöglicht eine Signalverstärkung und erlaubt die

gleichzeitige Detektion mehrerer Antigene durch den Einsatz unterschiedlicher primärer Antikörper und Fluorochrome.

In einer 12-Well-Platte wurden Deckgläschen (\varnothing 15 mm) in jedem Well mit einer sterilen Pinzette positioniert. Anschließend wurden 20.000 hTert-Keratinocyten pro Well ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurde das Kulturmedium durch KGM 2 mit 2 mM CaCl₂ ersetzt, sodass die Keratinocyten ihre desmosomale Adhäsion aufbauen können. Nach einem Tag Inkubation wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. Zur Fixierung der Zellstrukturen wurden die Zellen für 8 min mit 1 ml kaltem Methanol bei -20°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf den Deckgläschen dreimal mit PBS gewaschen, um Reste des Fixiermittels zu entfernen. Für die Antikörper-Inkubation wurden die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten auf 30 μ l 1% BSA/PBS-Lösung auf einem Parafilm mit markiertem Raster platziert. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte für mind. 10 min. Anschließend wurden die Deckgläschen auf 30 μ l der verdünnten Lösung des primären Antikörpers (in 1% BSA/PBS) gelegt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die genaue Verdünnung der primären Antikörper ist in **Tab. 7** angegeben. Nach der Inkubation wurden die Deckgläschen dreimal für jeweils 5 min mit PBS gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurden die Deckgläschen für 1 h im Dunkeln auf 30 μ l des verdünnten sekundären Antikörpers (**Tab. 8**), ebenfalls in 1% BSA/PBS gelegt. Auch hier erfolgten im Anschluss drei Waschschrte mit PBS jeweils für 5 min sowie ein abschließender Waschschrte mit destilliertem Wasser. Zur Einbettung der Zellen wurden die Deckgläschen auf einem Objektträger mit 8 μ l Roti®-Mount FluorCARE DAPI-Lösung positioniert, wobei die Zellseite nach unten zeigte. Das DAPI-haltige Einbettmedium ermöglicht die Anfärbung der DNA in den Zellkernen. Die Objektträger wurden über Nacht bei 4 °C gelagert, um eine ausreichende Aushärtung des Einbettmediums sicherzustellen.

Die Fluoreszenzdetektion und Bildaufnahme erfolgte mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (Aurox Clarity, Aurox). Die Lichtquelle im Mikroskop regt die Fluorophore des sekundären Antikörpers durch laserbasierte Anregung an und erfasst die Lichtemission mit hoher Sensitivität.

3.5 Bildbearbeitung und statistische Auswertung

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit der Software ImageJ hinsichtlich Kontrastes und Helligkeit angepasst. Abgesehen von diesen Anpassungen

wurden keine weiteren Bildmanipulationen vorgenommen. Die digitalen WB-Bilder wurden zur quantitativen Analyse ebenfalls mit dem Programm ImageJ ausgewertet, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen und mögliche Messungenauigkeiten zu minimieren. Die WB-Bilder im TIFF-Format wurden mit ImageJ geöffnet. Nach Entfernung des Hintergrundes wurden die Proteinsignale manuell markiert, sodass die Intensitäten der Signale gemessen und in Form eines Balkendiagrammes visualisiert werden konnte. Die Intensitätswerte der Graustufen der Proteinsignale wurden durch Normalisierung an die Intensitätswerte der Lade-Kontrollprotein GAPDH relativiert. Die statistische Analyse sowie die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgten mit der Software GraphPad Prism 5. Die Datenauswertung umfasste ein- und zweifaktorielle Varianzanalysen (ANOVA) mit Bonferroni-Post-hoc-Korrektur. Die Messergebnisse wurden in den Graphen als Mittelwerte mit zugehörigen Standardabweichungen (SD) dargestellt. Bei einem berechneten Wert von $p \leq 0,05$ gilt es als signifikant (*), Werte mit $p \leq 0,01$ als hoch signifikant (**) und Werte mit $p \leq 0,001$ als sehr hoch signifikant (***). Sofern nicht anders angegeben, wurden die Experimente mind. dreimal durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung und Charakterisierung der Flotillin-Knockout hTert- und HaCaT-Keratinocyten

Meine Arbeit konzentrierte sich auf die Rolle von Flotillin-Proteinen in einem durch cAMP-vermittelten Schutzmechanismus, der unter Einfluss von anti-Dsg3-Antikörpern den desmosomalen Zellkontaktverlust verhindern kann. Es ist bereits bekannt, dass Flotilline mit den desmosomalen Cadherinen interagieren. Daher weisen Zellen mit fehlender Flotillin-Expression eine schwache desmosomale Adhäsion auf, ähnlich wie bei dem Krankheitsbild Pemphigus vulgaris (Völlner et al. 2016). Um die Funktion von Flotillinen im cAMP-vermittelten protektiven Mechanismus zu untersuchen, habe ich mit hTert- und HaCaT-Keratinocytenzelllinien gearbeitet, bei denen mittels der CRISPR-Cas9-Genom-Editing Technik das *FLOT1*- oder *FLOT2*-Gen ausgeschaltet wurde. Die Knockout-Zelllinie wurde von der Arbeitsgruppe (AG) Tikkanen bereitgestellt.

Die hTert- und HaCaT-Keratinocyten werden häufig zur Untersuchung der epidermalen Zell-Zell-Adhäsion und der Pemphigus-Pathogenese verwendet (Beckert et al. 2019; Boukamp et al. 1988; Sigmund et al. 2023). Die HaCaT-Keratinocyten stammen aus einer periläsionalen Region eines Hauttumors und sind spontan immortalisiert (Boukamp et al. 1988). Im Vergleich dazu wurden die hTert-Zellen, die aus der Vorhaut stammen, durch Expression von Telomerase und Cdk4 immortalisiert. Die hTert-Keratinocyten ähneln daher am nächsten den primären Keratinocyten, da bei HaCaT-Keratinocyten häufig Chromosomenaberrationen und Mutationen im Verlauf der Passagen auftreten können (Boukamp et al. 1988, 1997).

4.1.1 Validierung der Flotillin-Expression in hTert-Keratinocyten mittels WB

Die bereitgestellten hTert WT-, Flot1-KO-, Flot2-KO- und Flot1/2-KO-Zelllinien wurden zunächst auf die Expression von Flot1 und Flot2 überprüft. Die Zellen wurden in 12-Well-Platten mit dem Nährmedium KGM 2 mit 0,05 mM CaCl₂ kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurde das Nährmedium auf KGM 2 mit 2 mM CaCl₂ für 24 h ausgetauscht, da die Zellen eine erhöhte Calciumkonzentration benötigen, um die desmosomalen Strukturen aufbauen zu können (Beckert et al. 2019). Die Zellen wurden lysiert und die Proben vorbereitet, sodass anschließend mithilfe der WB-Methode die Expression der Flotilline mit den passenden Antikörpern überprüft werden konnte. GAPDH diente als Ladekontrolle, um die Proteinmengen anzupassen. Die

Quantifizierung erfolgte mit der Software ImageJ, womit die Intensitäten der Grauwerte analysiert wurden.

Als Kontrolle zeigte der WT die entsprechende Expression der Flotilline. Im Vergleich zum WT wies der Flot1-KO-Klon eine signifikant reduzierte Expression von Flot2 auf, während Flot1 nicht nachweisbar war. Der Flot2-KO- und Flot1/2-KO-Klon wiesen ein tieferliegendes Signal für Flot2 auf, welches ein verkürztes Protein vermuten lässt. Interessanterweise zeigte der Flot2-KO-Klon eine statistisch signifikant reduzierte Expression von Flot1. Der Flot1/2-KO-Klon zeigte keine Flot1-Expression (**Abb. 10 A, B**).

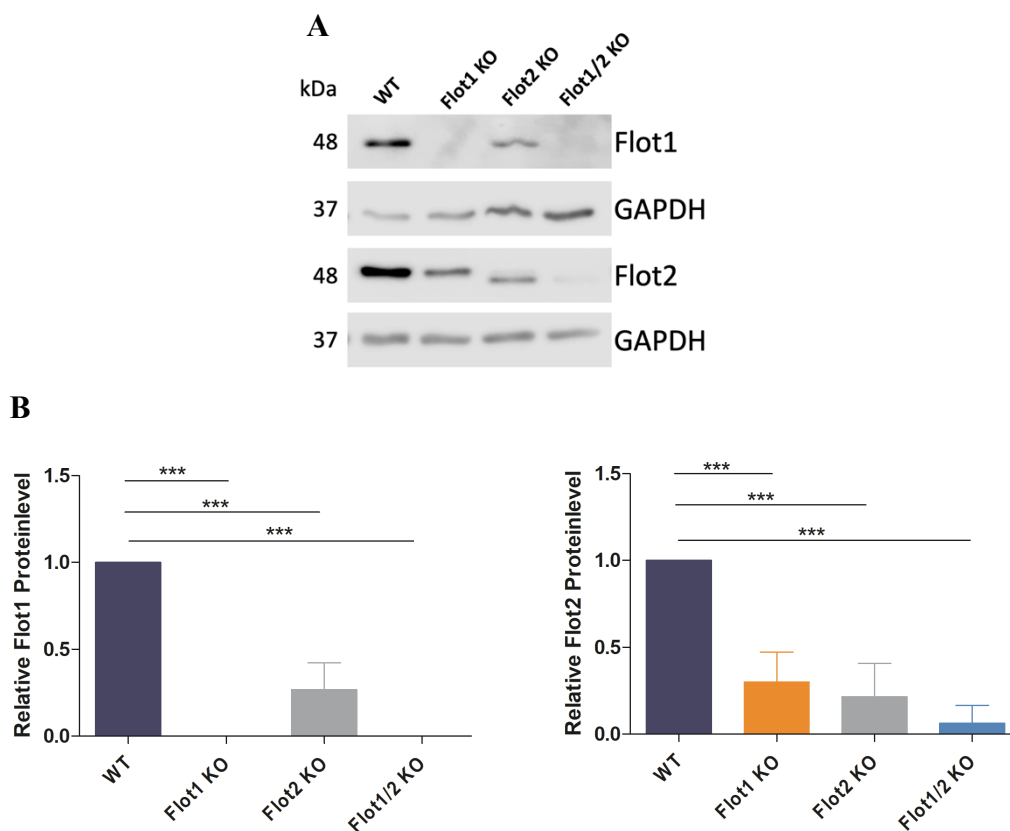


Abbildung 10: Nachweis von Flot-Expression in hTert-Keratinozyten mittels WB.

Die hTert WT-, Flot1-KO-, Flot2-KO- und Flot1/2-KO-Zelllinien wurden für drei Tage in KGM 2 Medium kultiviert. Nach Austausch des Mediums mit 2 mM CaCl₂ wurden die Zellen nach einem Tag geerntet und lysiert. Nach Durchlaufen des SDS-Gels und Übertragung durch den WB auf die Membran wurden die Proteine mit den passenden Antikörpern detektiert. Die Quantifizierung erfolgte mit der Software ImageJ, womit die Intensitäten der Grauwerte analysiert wurden. **(A)** Flotilline sind bei 48 kDa und GAPDH bei 37 kDa dargestellt. **(B)** Die Graphiken zeigen die Grauintensitäten der Signale von Flot1 und Flot2 der vorliegenden Zellsysteme WT, Flot1-KO, Flot2-KO und Flot1/2-KO. GAPDH diente als Ladekontrolle und die Signalintensitäten wurden zur Quantifizierung relativ zum GAPDH-Signal normalisiert. Die

statistische Analyse wurde mithilfe der zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede sind in den Abbildungen durch *** $p \leq 0,001$ gekennzeichnet. Der Fehlerbalken stellt die Standardabweichung der Werte dar, die in mind. vier unabhängigen Experimenten ermittelt wurden.

4.1.2 Validierung der Flotillin-Expression in hTert-Keratinocyten mittels IF

Zur Bestätigung der WB-Ergebnisse wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit anti-Flot1- und anti-Flot2-Antikörpern durchgeführt. Dafür wurden die hTert-Zellen auf Deckgläschen in einer 12-Well-Platte kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz erfolgte eine Inkubation bei 2 mM CaCl_2 Medium für 24 h, sodass die Zellen die desmosomale Adhäsion aufbauen konnten. Anschließend wurden die Keratinozyten mit Methanol fixiert und mit anti-Flot1-, anti-Flot2-Antikörpern (**Tab. 7**), gefolgt von AF488-gekoppelten Sekundärantikörpern (**Tab. 8**) angefärbt. Nach Eindeckeln im DAPI-haltigen Einbettmedium konnten die Deckgläschen mikroskopiert werden. Im WT zeigte das Protein Flot1 eine perinukleäre Lokalisation, während Flot2 zusätzlich teilweise an der Zellmembran anzutreffen war. Beim Flot1-KO konnte kein Flot1 detektiert werden, während Flot2 eine diffuse Verteilung in der Zelle aufwies. Der Flot2-KO zeigte eine perinukleäre Lokalisation von Flot1, während Flot2 diffus in der Zelle vorhanden war. Der Flot1/2-KO wies kein Flot1 Signal und ein schwaches diffuses Signal von Flot2 auf (**Abb. 11**). Da die in **Abb. 10** und **11** dargestellten Ergebnisse zeigten, dass Flot2- und Flot1/2-KO keine vollständig fehlende Flot2-Expression aufwiesen, wurde versucht neue Einzelzellklone mit Knockout von Flot2 und Flot1/2 zu generieren.

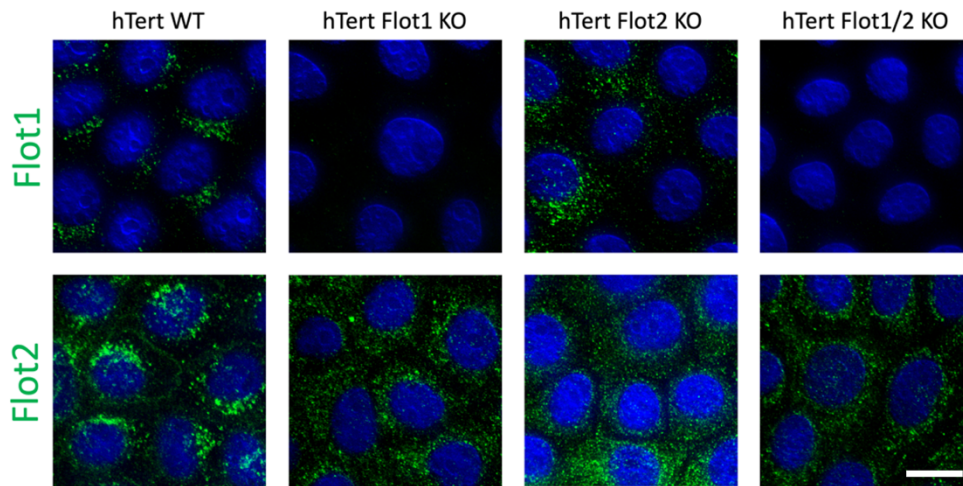


Abbildung 11: Nachweis von Flot-Expression in hTert-Keratinocyten mittels IF.

Nach Kultivierung der hTert-Zellen auf Deckgläschen in einer 12-Well-Platte und Inkubation bei 2 mM CaCl_2 Medium für 24 h konnten die Zellen mit Methanol fixiert und mit anti-Flot1- oder anti-Flot2-Antikörpern und anschließend AF488-gekoppelten Sekundärantikörpern angefärbt werden. Nach Positionierung im DAPI-haltigen Einbettmedium konnten die Deckgläschen mikroskopiert werden. Der Maßstab beträgt 20 μm .

4.1.3 Gewinnung von Einzelzellklonen mit Knockout von Flot2 oder Flot1/2

Die Flot-Knockout hTert-Keratinocyten wurden von Benedikt Beckert aus AG Tikkanen unter Anwendung der CRISPR/Cas9-Genom Editing-Technik hergestellt und sollten aus Einzelzellklonen stammen. Die Pools, die für die Einzelklone als Grundlage gedient hatten, wurden aufgetaut und kultiviert. Nach der Herstellung von Zelllysaten wurde ein WB und IF-Färbung durchgeführt, um die Pools zu analysieren, ob der Knockout-Prozess von Flot1 und/oder Flot2 in bestimmten Zellen erfolgreich war.

Der Flot2-KO-Pool zeigte ein Flot2-Doppelsignal, wobei das eine Signal auf der gleichen Ebene wie der WT und das zweite Signal leicht unter 48 kDa lag. Im Flot1/2-KO-Pool war ein sehr schwaches, tieferliegendes Flot2-Signal zu erkennen (**Abb. 12 A**). Die Klone von Flot2-KO und Flot1/2-KO zeigten ähnliche Ergebnisse wie in **Abb. 10A** dargestellt. Wie in **Abb. 11** beschrieben, wurde ebenso eine IF-Färbung durchgeführt. Die Immunfluoreszenz des Flot2-KO-Pools zeigte eine heterogene Flot2-Färbung, wobei einige Zellen eine starke, andere eine schwache oder keine Färbung aufwiesen. Im Flot1/2-KO-Pool war die Flot2-Signaldetektion sehr schwach bis kaum wahrnehmbar (**Abb. 12 B**). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass es sich um eine gemischte Zellpopulation handelt, die sowohl einen effektiven Knockout als auch Zellen mit geringer Flot2-Expression umfasst.

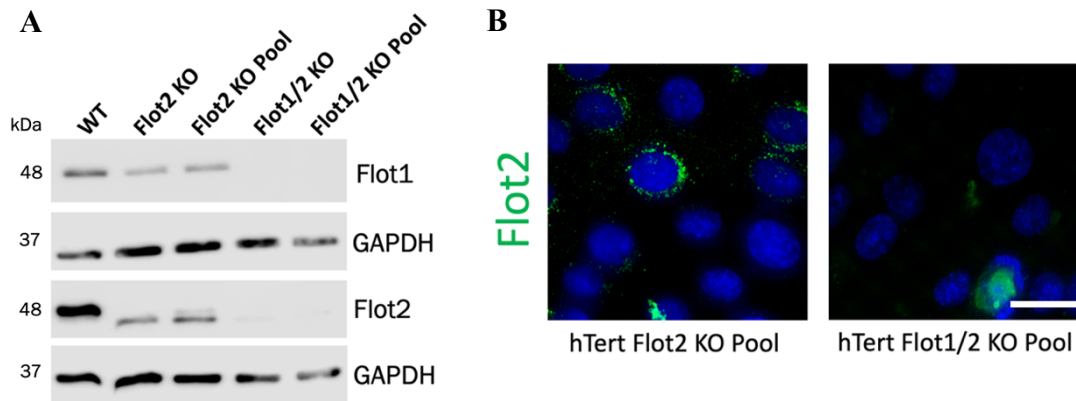


Abbildung 12: Expression von Flot in hTert Flot2-KO- und Flot1/2-KO-Pools.

(A) Zellpools, die mithilfe der CRISPR/Cas9-Genom-Editing-Technik hergestellt wurden, waren bereits vorhanden. Die Zellen wurden kultiviert und lysiert, um einen WB durchzuführen. GAPDH diente als Ladekontrolle. (B) Das in Abb. 10 beschriebene Vorgehen wurde angewendet, um Flot2 in den Flot2-KO- und Flot1/2-KO-Pools anzufärben. Der Maßstab beträgt 20 μ m.

Um Einzelzellklone zu isolieren, wurden die Zellen aus den Flot2-KO- oder Flot1/2-KO-Pools in eine 96-Well-Platte verdünnt ausgesät und konfluent gewordene Wells sukzessive in eine 24-Well-Platte und später folgend in eine 12-Well-Platte überführt. Nach Herstellen der Zellproben wurde der WB durchgeführt. Durch Verdünnung des Flot2-KO-Pools konnten drei Klone selektiert werden, die keine Flot2-Expression aufwiesen. Die Klone 3.1, 7.1 und 19.1 zeigten gleichzeitig eine sehr geringe Flot1-Expression. Da Klon 3.1 das schwächste und Klon 7.1 das stärkste Flot1-Signal zeigten, wurde Klon 19.1 mit mittlerer Flot1-Expression für nachfolgende Experimente ausgewählt (Abb. 13).

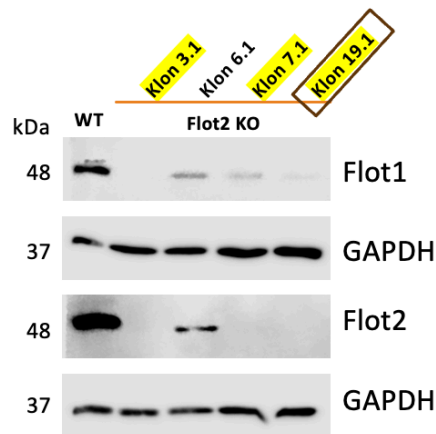


Abbildung 13: Validierung der Flot-Expression in hTert Flot2-Knockout-Einzelzellklonen.

Nach Herstellung der Zellysaten wurde ein WB durchgeführt. Der WT diente als Positivkontrolle und GAPDH als Ladekontrolle.

Der gleiche Ansatz der Einzelzellenisolierung wurde auch für den Flot1/2-KO-Pool durchgeführt. Allerdings wiesen die isolierten Klone stets ein sehr schwaches, tieferliegendes Flot2-Signal auf (**Abb. 14 A, B**). Nach zahlreichen erfolglosen Versuchen wurde die Isolation von Flot1/2-KO-Einzelklonen abgebrochen und der Fokus auf die Flot1-KO- und Flot2-KO-Klone gelegt.

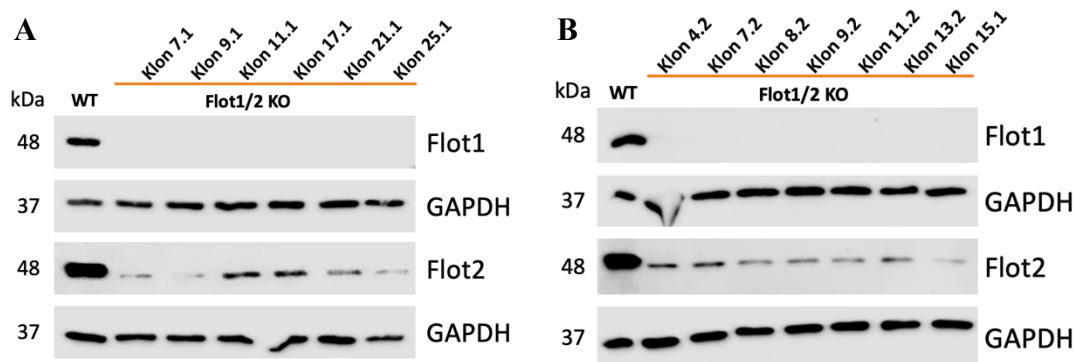
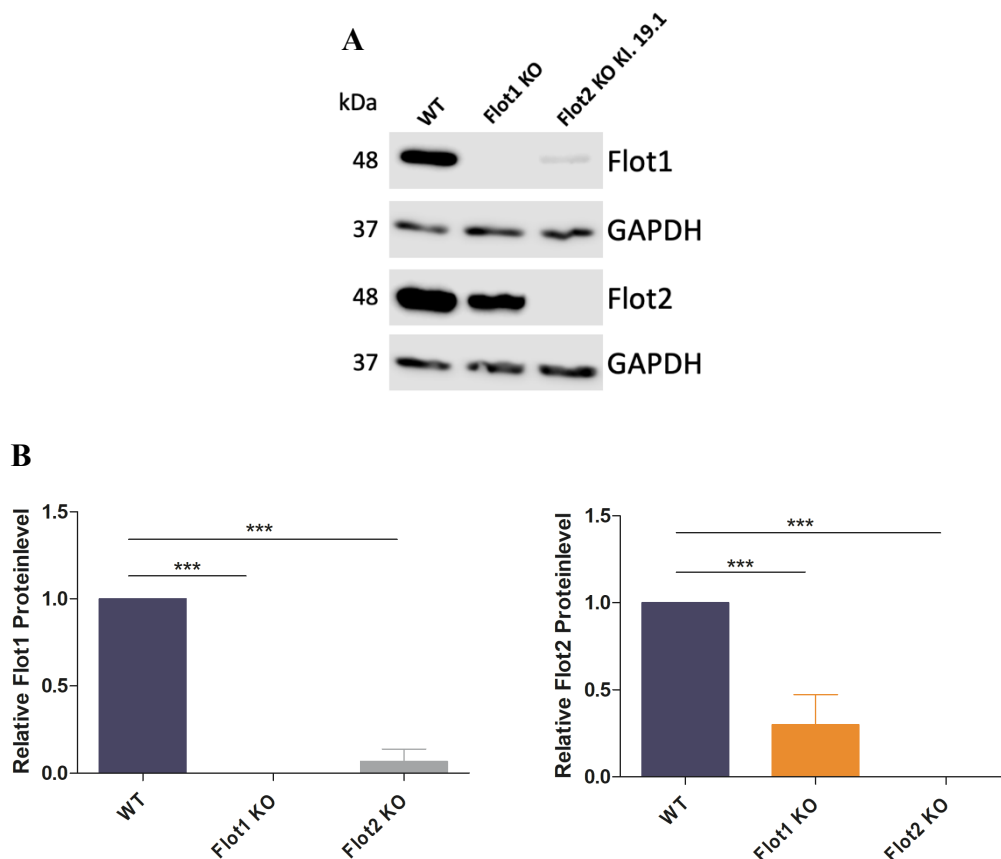


Abbildung 14: Validierung der Flot-Expression in hTert Flot1/2-Knockout-Einzelzellklonen.

Nach Herstellung der Zellysaten wurde ein WB durchgeführt. Der WT diente als Positivkontrolle und GAPDH als Ladekontrolle. (A) und (B) stellen Beispiel-WBs von überprüften Flot1/2-KO-Klonen dar.

4.1.4 Charakterisierung der neu generierten hTert-Zelllinien

Mit dem neu isolierten Flot2-KO-Klon 19.1 wurden zusammen mit dem WT und Flot1-KO vier weitere WBs (Vorgehen wie in **Abb. 10** dargestellt) sowie IF-Färbung (Vorgehen wie in **Abb. 11** dargestellt) durchgeführt, um die Expression von Flot1 und Flot2 zu bestimmen. Im WB zeigte der neue Flot2-KO Klon 19.1 das Fehlen der Flot2-Expression, während gleichzeitig eine signifikant reduzierte Flot1-Expression festgestellt wurde. Im Vergleich dazu zeigte der Flot1-KO das Fehlen der Flot1-Expression und eine geringfügige Reduktion der Flot2-Expression (**Abb. 15 A, B**). In den IF-Bildern wies der WT eine perinukleäre Färbung des Proteins Flot1 auf, während Flot2 zusätzlich teilweise an der Zellmembran lokalisiert war. Die Flot1-KO-Keratinocyten hatten keine Flot1-Färbung, jedoch eine diffuse intrazelluläre Färbung von Flot2. Im Gegensatz dazu zeigte der Flot2-KO keine Flot2-Färbung und eine sehr geringe Flot1-Färbung (**Abb. 15 C**).



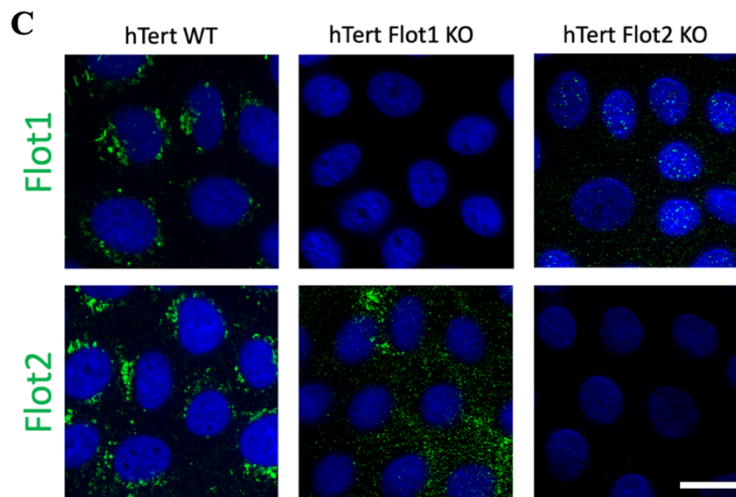


Abbildung 15: Charakterisierung der endgültigen hTert WT-, Flot1-KO- und Flot2-KO-Keratinozytenklonen.

(A) Nach Herstellung der Zelllysaten wurde der WB durchgeführt. (B) Die Graphiken zeigen die analysierten Grauintensitäten der Signale von Flot1 und Flot2 der vorliegenden Zellsystemen WT, Flot1-KO und Flot2-KO. GAPDH diente als Ladekontrolle und die Signalintensitäten wurden zur Quantifizierung relativ zum GAPDH-Signal normalisiert. Die statistische Analyse wurde mithilfe der zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede sind in den Abbildungen durch *** $p \leq 0,001$ gekennzeichnet. Der Fehlerbalken stellt die Standardabweichung der Werte dar, die in mind. vier unabhängigen Experimenten ermittelt wurden. (C) Wie in **Abb. 11** beschrieben, wurden IF-Färbung von den hTert-Zellen angefertigt. Es wurden anti-Flot1- und anti-Flot2-Antikörpern mit anschließender AF488-gekoppelten Sekundäntikörpern verwendet. Der Maßstab beträgt 20 μm .

4.1.5 Validierung von Flotillin-Expression in HaCaT-Keratinozyten

Wie bei den hTert-Keratinozyten wurden die vorliegenden HaCaT-Zellklone WT, Flot1-KO und Flot2-KO zunächst nach Expression von Flot1 und Flot2 überprüft. Die Keratinozyten wurden in einer 12-Well-Platte kultiviert. Da bereits im DMEM + + + + Medium ausreichend Calcium enthalten ist, entfällt der Mediumwechsel mit höherem Calciumgehalt. Nach Lysieren und Vorbereitung der Proben wurde der WB durchgeführt. Die Detektion der Proteinlevel von Flot1, Flot2 und GAPDH erfolgte mithilfe spezifischer Antikörper und wurde durch unterschiedliche Intensitäten der Grauwertsignale dargestellt. Die Quantifizierung erfolgte mit der Software ImageJ. Wie bei den hTert-Zellen zu beobachten, hatten die Flot2-KO-Keratinozyten keine Flot2-Expression und ein schwächeres Flot1-Proteinlevel als der WT. Im dargestellten WB

zeigte der Flot1-KO ebenfalls keine Flot1-Expression und ein signifikant schwächeres Flot2-Proteinlevel (Abb. 16 A, B).

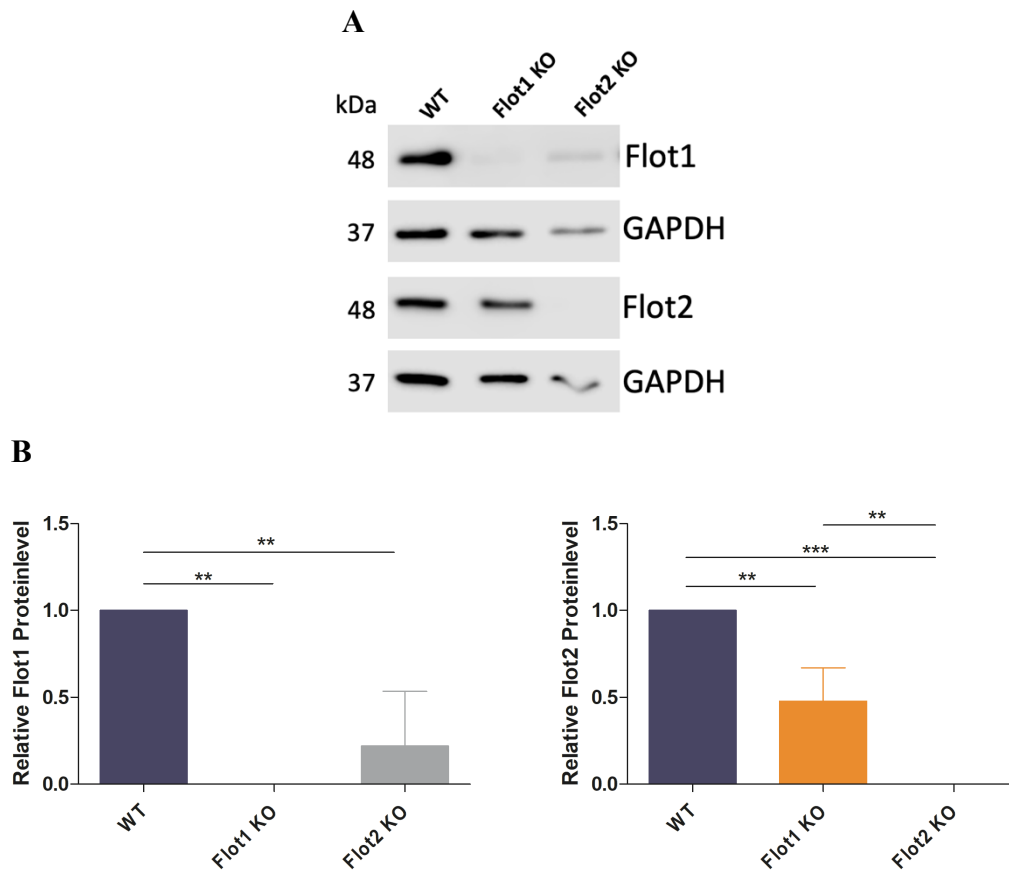


Abbildung 16: Charakterisierung der Flotillin-Expression in HaCaT-Zelllinien.

(A) Nach der Herstellung der Zellysate wurden WBs durchgeführt und die Intensitäten der Grauwerte quantifiziert. (B) Die Graphiken zeigen die Intensitätswerte der Graustufensignale von Flot1 und Flot2 der vorliegenden Zellsystemen WT, Flot1-KO und Flot2-KO. GAPDH diente als Ladekontrolle und die Signalintensitäten wurden zur Quantifizierung relativ zum GAPDH-Signal normalisiert. Die statistische Analyse wurde mithilfe der zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede sind in den Abbildungen durch ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ gekennzeichnet. Der Fehlerbalken stellt die Standardabweichung der Werte dar, die in mind. vier unabhängigen Experimenten ermittelt wurden.

4.2 Protektiver Effekt von cAMP auf die Monolayerstabilität von hTert-WT- und HaCaT-WT-Keratinocyten

4.2.1 Behandlung mit Forskolin/Rolipram führt zur Induktion von cAMP in hTert-Zellen

In anderen Studien wurde gezeigt, dass Forskolin (F), ein Aktivator der AC, und Rolipram (R), ein Hemmer der PDE4, den intrazellulären cAMP-Spiegel in HaCaT-Keratinocyten nach 24 h signifikant erhöhen können. Diese Ergebnisse konnten durch ELISA-Messungen bestätigt werden, die zeigten, dass auch in hTert-Keratinocyten das cAMP-Level durch Behandlung mit Forskolin und Rolipram um das Fünffache im Vergleich zur DMSO-Kontrolle anstieg (Abb. 17).

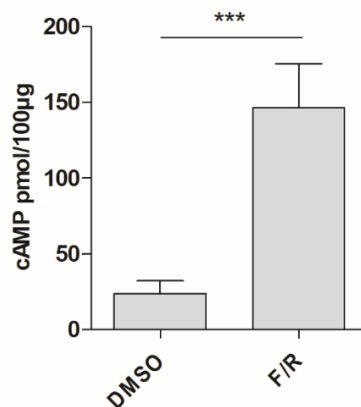


Abbildung 17: ELISA-Nachweis der Erhöhung des cAMP-Levels nach Behandlung mit Forskolin/Rolipram in hTert-Keratinocyten.

Konfluente hTert-Zellen wurden mit F (5 µM) und R (10 µM) oder DMSO für 6 h behandelt. Nach der Behandlung wurden die Zellen gewaschen und mit HCl lysiert. Nach Zentrifugation wurden die Überstände auf das Plattenlesegerät pipettiert. Nach Zugabe der Bradford-Reagenzlösung wurden die messbaren Signalintensitäten mit einem Plattenlesegerät gemessen und die cAMP-Konzentration anhand einer Standardkurve berechnet. Die Graphiken zeigen die cAMP-Konzentration in pmol/100 µg Gesamtprotein in Abhängigkeit von der Behandlung. Die statistische Analyse wurde mithilfe der zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede sind in den Abbildungen durch *** $p \leq 0,001$ gekennzeichnet. Der Fehlerbalken stellt die Standardabweichung der Werte dar, die in mind. vier unabhängigen Experimenten ermittelt wurden.

4.2.2 cAMP-Erhöpfung reduziert den anti-Dsg3-induzierten Adhäsionsverlust von hTert-WT-Keratinocyten

Frühere Studien haben zudem belegt, dass eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels den durch PV-IgG-Antikörper induzierten desmosomalen Adhäsionsverlust reduzieren kann (Sigmund et al. 2023; Spindler et al. 2010). Zur Analyse der desmosomalen Haftung zwischen den Keratinocyten hat sich der sogenannte Monolayer-Dissoziationsassay als Standardmethode etabliert (Schmidt et al. 2022; Zakrzewicz et al. 2022). Dabei wurden Keratinocyten in einer 24-Well-Platte kultiviert und nach Erreichen der Konfluenz für 24 h mit Substanzen stimuliert und/oder mit Antikörpern behandelt. Anschließend wurde die Zellmonolayer mithilfe des Enzyms Dispase II von der Plattenoberfläche gelöst, sodass die Zellschicht frei in der Flüssigkeit schwamm. Durch Zugabe von MTT für 15 min wurden die Zellmonolayer sichtbar gemacht. Um die Integrität der Monolayer unter Belastung zu testen, wurde die Zellschicht gleichmäßig pipettiert, was eine mechanische Belastung simuliert. Die resultierende Fragmentierung der Zellschicht wurde schrittweise dokumentiert, indem die 24-Well-Platte mit einem Scanner erfasst und die entstandenen Fragmente gezählt wurden.

In den Experimenten wurde der monoklonale mAK23 verwendet, der spezifisch an Dsg3 bindet, wodurch Dsg3 über Endozytose in die Zelle gelangt und es zu einer lysosomalen Degradation kommt (Grando et al. 2009; Waschke 2008). Dieser Effekt soll die Pathogenese der Autoimmunerkrankung Pemphigus vulgaris vereinfacht simulieren.

In dem Monolayer-Dissoziationsassay zeigen unbehandelte Keratinocyten oder solche, die mit Kontrollantikörpern behandelt werden eine weitgehende intakte Zellmonolayer und nur wenig Fragmentierung. Beim Einsatz von PV-IgG oder anti-Dsg3 Antikörper mAK23 verlieren die Zellen ihre desmosomale Haftung, was zu einer starken Fragmentierung führt (Ishii et al. 2005). Die gleichzeitige Behandlung mit Forskolin/Rolipram und PV-IgG oder mAK23 kann die Fragmentierung deutlich reduzieren (Spindler et al. 2010).

Die hTert-WT-Zellen wurden in einer 24-Well-Platte ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz für 24 h in dem Medium mit 2 mM CaCl₂ inkubiert. Die Behandlungen wurden in Triplikaten durchgeführt. Um die Zell-Zell-Adhäsion zwischen den Keratinocyten gezielt zu stören, wurde der pathogene anti-Dsg3-Antikörper mAK23 eingesetzt. Die einzelnen Wells wurden für 24 h behandelt. Mithilfe des Monolayer-Dissoziationsassays konnte der protektive Effekt des erhöhten cAMP-Spiegels bei Zugabe des pathogenen Antikörpers mAK23 in hTert-Keratinocyten bestätigt werden. Bei Vorliegen von mAK23

fragmentierte sich die Monolayer, was signifikant durch die Forskolin/Rolipram-Behandlung reduziert wurde (**Abb. 18 A, B**).

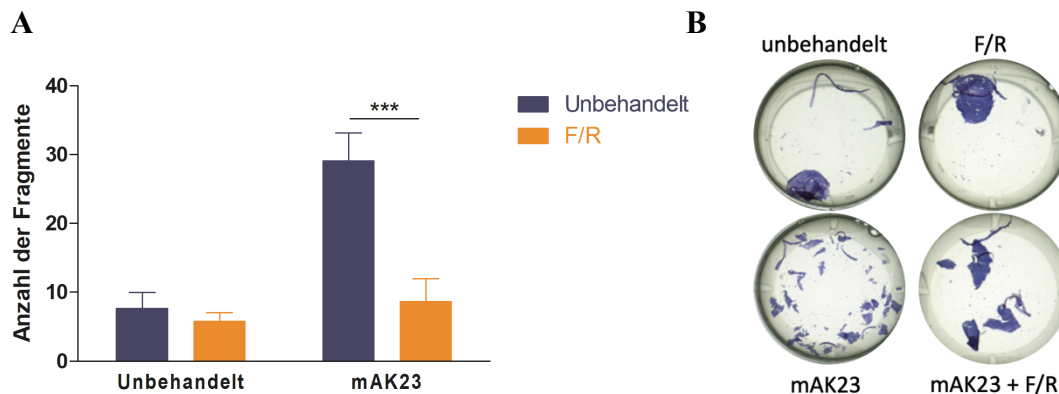


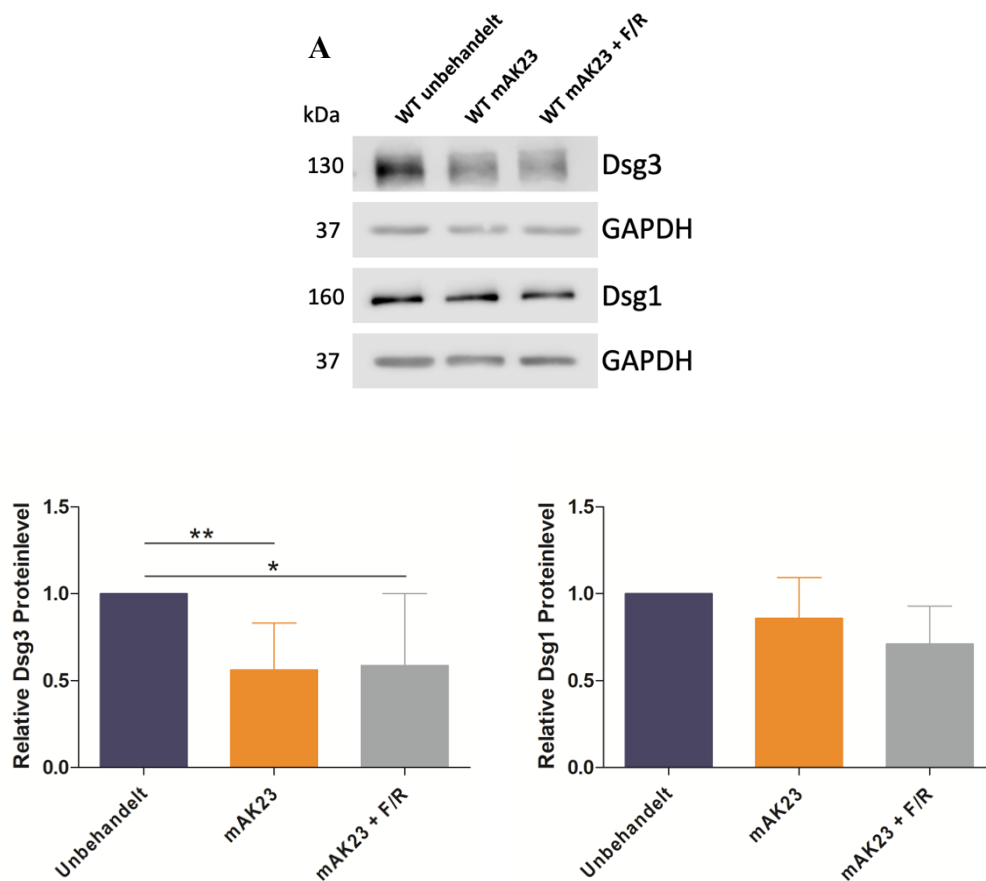
Abbildung 18: Protektiver Effekt von Forskolin/Rolipram auf die Monolayerstabilität von hTert-WT-Keratinozyten.

Die hTert-Keratinozyten wurden in einer 24-Well-Platte inkubiert und nach Erreichen der Konfluenz in 2 mM CaCl₂ Medium für 24 h kultiviert. Für die vorgesehenen Wells wurde das Medium mit F/R zugesetzt und mit mAK23 für 24 h behandelt. Nach Lösen und Darstellen der Zellmonolayer wurden diese gleichmäßig auf- und abpipettiert. Die resultierende Fragmentierung der Zellmonolayer wurden schrittweise mit einem Scanner dokumentiert und die entstandenen Fragmente gezählt. **(A)** Die Graphik zeigt die Anzahl an Fragmenten in hTert-WT-Keratinozyten in Abhängigkeit von Behandlung mit F/R und/oder Stimulation mit mAK23. Die statistische Analyse wurde mithilfe der zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede sind in den Abbildungen durch *** $p \leq 0,001$ gekennzeichnet. Der Fehlerbalken stellt die Standardabweichung der Werte dar, die in mind. vier unabhängigen Experimenten ermittelt wurden. **(B)** Die Bilder zeigen beispielhafte Darstellung der Monolayer nach Durchführung des Monolayer-Dissoziationsassays.

4.2.3 cAMP-Erhöhung hat keinen Effekt auf den durch mAK23-induzierten Dsg3-Abbau

Zusätzlich wurden WBs durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Behandlung mit mAK23 oder die Kombination aus mAK23 und Forskolin/Rolipram einen Einfluss auf das Proteinlevel von Dsg oder Flot hat. Dazu wurden die hTert-Zellen in einer 12-Well-Platte kultiviert und nach Erreichen der Konfluenz mit mAK23 und/oder Forskolin/Rolipram behandelt. Nach einem Tag wurden die Zelllysate vorbereitet und ein WB durchgeführt. In Übereinstimmung mit zuvor veröffentlichten Daten führte die Behandlung mit mAK23

zu einer signifikanten Reduktion des Dsg3-Proteinlevels (Yamamoto et al. 2007). Eine simultane Inkubation mit Forskolin/Rolipram konnte den Dsg3-Verlust nicht verhindern. Das Proteinlevel von Dsg1 blieb durch die Behandlung unverändert (**Abb. 19 A, B**). Bei der Kombination aus mAK23 und Forskolin/Rolipram war eine signifikante Reduktion der Flot1-Expression erkennbar. Die Flot1-Expression zeigte bei Behandlung mit mAK23 keine signifikante Veränderung aufgrund starker Variation zwischen den Experimenten. Die Flot2-Expression dagegen zeigte eine signifikante Reduktion, sowohl bei der Behandlung mit mAK23 als auch bei der kombinierten Behandlung mit mAK23 und Forskolin/Rolipram (**Abb. 19 C, D**). Zusammenfassend führte die Behandlung mit mAK23 zu einer Reduktion von Dsg3 und Flot2, was nicht durch Behandlung mit Forskolin/Rolipram verhindert werden konnte.



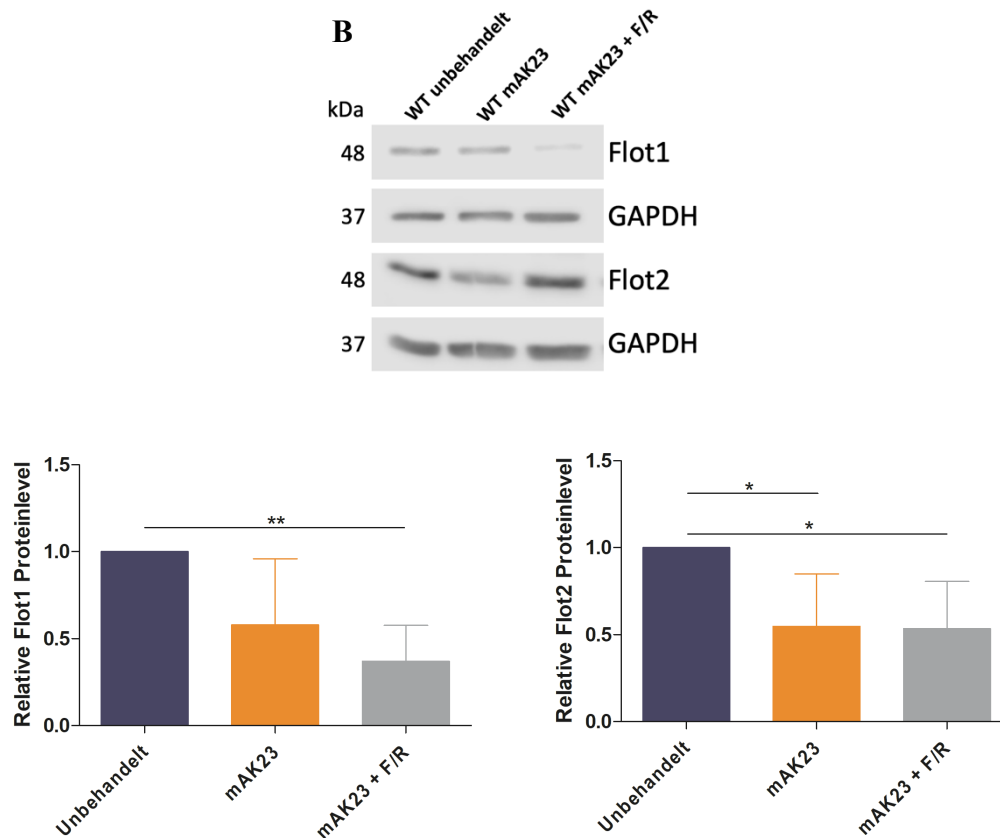


Abbildung 19: Effekt von Forskolin/Rolipram auf die Expression von Dsg und Flot in hTert-WT-Keratinocyten behandelt mit mAK23.

Die Zellen wurden auf eine 12-Well-Platte ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz mit mAK23 oder mAK23 mit F/R behandelt. **(A)** Nach einem Tag konnten die Zelllysate hergestellt und ein WB zur Darstellung von Dsg1 und Dsg3 durchgeführt werden. Die Graphiken zeigen die Grauintensitäten der Signale von Dsg1 und Dsg3 in den hTert-WT-Zellen. GAPDH diente als Ladekontrolle und die Signalintensitäten wurden zur Quantifizierung relativ zum GAPDH-Signal normalisiert. Die statistische Analyse wurde mithilfe der zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede sind in den Abbildungen durch * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,01$ gekennzeichnet. Der Fehlerbalken stellt die Standardabweichung der Werte dar, die in mind. vier unabhängigen Experimenten ermittelt wurden. **(B)** Wie bei (A) wurden WB zur Darstellung von Flot1 und Flot2 durchgeführt. Die Graphiken zeigen die Grauintensitäten der Signale von Flot1 und Flot2 in den hTert-WT-Zellen.

4.2.4 Behandlung mit Forskolin/Rolipram reduziert den anti-Dsg3 induzierten Adhäsionsverlust von HaCaT-WT-Keratinocyten

Die HaCaT-WT-Zellen wurden in einer 24-Well-Platte ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz erfolgte die Stimulation der Zellen für 24 h. Da die bei hTert-Keratinocyten verwendeten Konzentrationen von 5 μM Forskolin und 10 μM Rolipram keine

signifikante Reduktion der Fragmentierung bewirkten, wurden die Konzentrationen sukzessive erhöht. Eine deutliche Verringerung der Fragmentierung konnte bei einer Konzentration von 20 μM Forskolin und Rolipram festgestellt werden (**Abb. 20 A, B**). Aus diesem Grund wurde diese höhere Forskolin/Rolipram-Konzentration für die Behandlung der HaCaT-Zellen gewählt. Mithilfe dem Monolayer-Dissoziationsassay konnte ebenfalls in HaCaT-Keratinocyten der protektive Effekt eines erhöhten cAMP-Spiegels bei Zugabe des pathogenen Antikörpers mAK23 nachgewiesen werden.

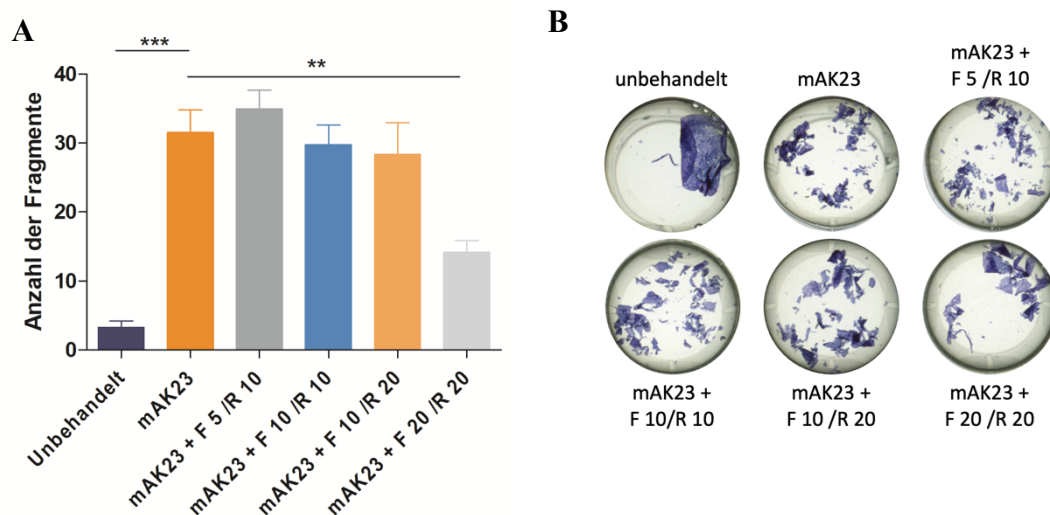


Abbildung 20: Protektiver Effekt von Forskolin/Rolipram auf die Monolayerstabilität von HaCaT-WT-Keratinocyten.

Gleicher Versuchsaufbau wie in **Abb. 17**. In die vorgesehenen Wells wurde das Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen von F (5 bis 20 μM) und R (5 bis 20 μM) ergänzt. **(A)** Die dargestellte Graphik zeigt die Anzahl der Fragmente in HaCaT-WT-Keratinocyten in Abhängigkeit von Behandlung mit F/R und/oder Stimulation mit mAK23. Die statistische Analyse wurde mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede sind in den Abbildungen durch ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ markiert. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen der Ergebnisse aus mind. vier unabhängigen Experimenten. **(B)** Die Bilder zeigen beispielhafte Darstellung der Monolayer nach Durchführung des Monolayer-Dissoziationsassays.

4.2.5 Behandlung mit mAK23 und Forskolin/Rolipram hat keinen Effekt auf Dsg- und Flot-Expression in HaCaT-WT-Keratinocyten

Wie bei den hTert-Zellen wurden WB-Analysen durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Behandlung mit mAK23 oder mAK23 in Kombination mit Forskolin/Rolipram das Proteinlevel von Dsg und Flot in HaCaT-WT-Keratinocyten beeinflusst. Die Ergebnisse

der WB zeigten jedoch eine hohe Variabilität, wie die ausgeprägten Standardabweichungen verdeutlichen, sodass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Grauintensitäten feststellbar war (**Abb. 21 A, B**).

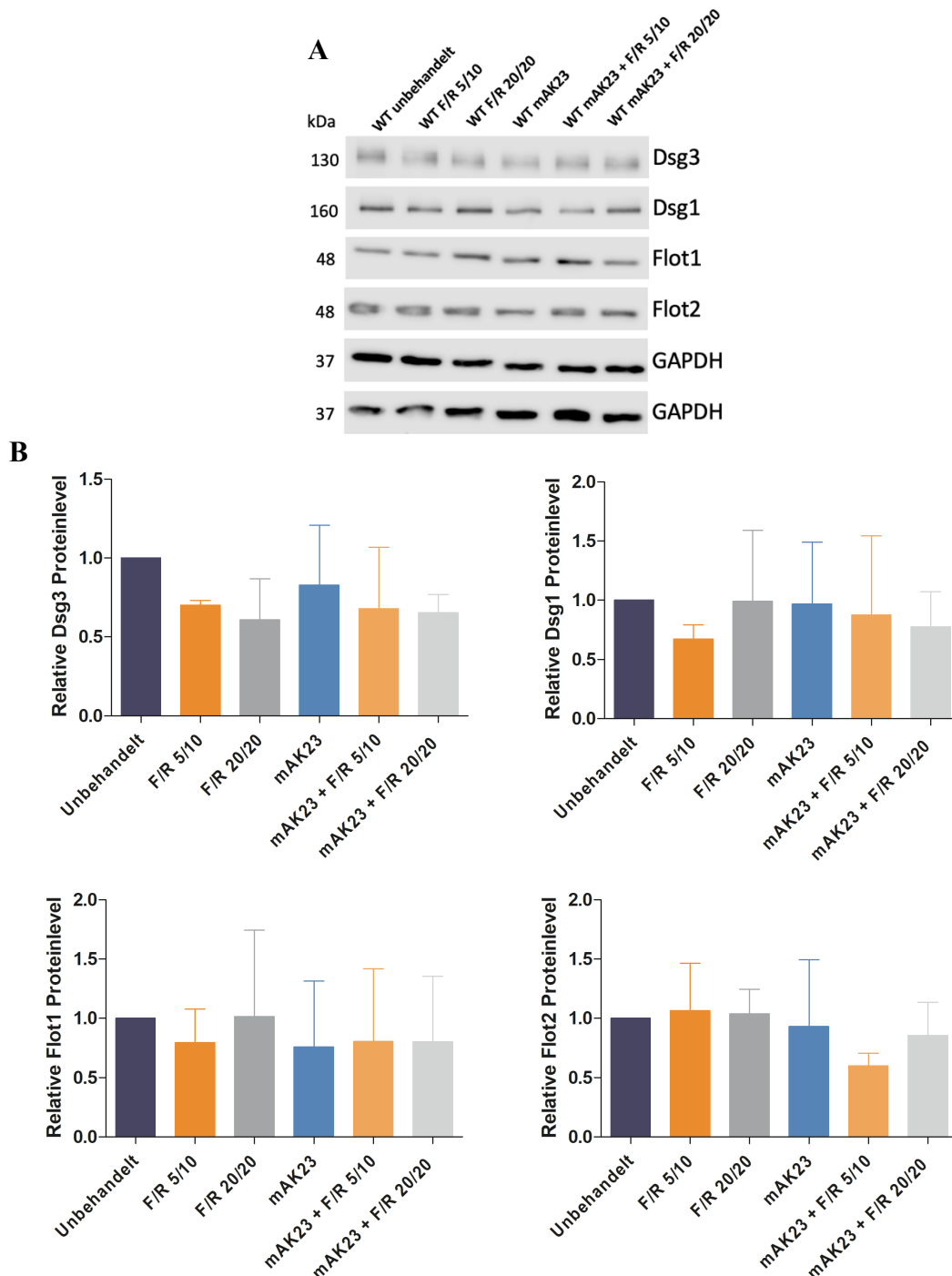


Abbildung 21: Effekt von mAK23 oder mAK23 mit Forskolin/Rolipram auf die Expression von Dsg und Flot in HaCaT-WT-Keratinozyten.

(A) Die Zellen wurden auf eine 12-Well-Platte ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz mit mAK23 oder mAK23 mit F/R behandelt. Nach einem Tag konnten die Zelllysate hergestellt und WB durchgeführt werden. (B) Die Graphiken zeigen die Grauintensitäten der Signale von Dsg1,

Dsg3, Flot1 und Flot2 in den HaCaT-WT-Zellen. GAPDH diene als Ladekontrolle und die Signalintensitäten wurden zur Quantifizierung relativ zum GAPDH-Signal normalisiert. Die statistische Analyse wurde mithilfe der zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Der Fehlerbalken stellt die Standardabweichung der Werte dar, die in mind. vier unabhängigen Experimenten ermittelt wurden.

4.3 Rolle von Flotillinen im cAMP-induzierten protektiven Mechanismus

4.3.1 Effekt von erhöhtem cAMP auf die Monolayerstabilität von Flotillin-Knockout hTert-Keratinocyten

Das cAMP hat eine protektive Wirkung auf die Zelladhäsion und Barriereintegrität (Sigmund et al. 2023; Spindler et al. 2010), während Flotilline eine wichtige Rolle in der Organisation von Zell-Zell-Kontakten und der Stabilisierung von Adhäsionskontakten wie Desmosomen spielen (Völlner et al. 2016). Es konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden, dass HaCaT-Zellen mit shRNA gegen die mRNA von Flot1 oder Flot2 eine signifikant höhere Fragmentierung der Zellmonolayer aufweisen als Kontrollzellen (Völlner et al. 2016). Die Verbindung von cAMP-Signalen mit der Funktion von Flotillinen in Bezug auf die Monolayerstabilität ist jedoch bisher nicht umfassend untersucht worden.

Um den möglichen Zusammenhang zwischen Flotillinen und den durch Forskolin/Rolipram induzierten protektiven Mechanismus zu untersuchen, wurde in Flot1-KO- und Flot2-KO-Zellen der intrazelluläre cAMP-Spiegel erhöht und die Stabilität der Zellmonolayer mithilfe des Monolayer-Dissoziationsassays analysiert.

Für die Experimente wurden hTert-Keratinocyten (WT, Flot1-KO und Flot2-KO) auf einer 24-Well-Platte kultiviert und nach Erreichen der Konfluenz für 24 h in dem Medium mit 2 mM CaCl₂ inkubiert. Die Behandlungen wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Zellen wurden mit Forskolin/Rolipram für 24 h inkubiert, um den intrazellulären cAMP-Spiegel zu erhöhen. Mithilfe des Enzyms Dispase II konnten die Zellmonolayer von der Oberfläche gelöst werden und anhand der mechanischen Dissoziation der Monolayers konnte auf die relative Stärke der desmomenalen Adhäsion geschlossen werden. Die Ergebnisse des Monolayer-Dissoziationsassays zeigten, dass unbehandelte Flot2-KO-Zellen eine signifikant stärkere Fragmentierung aufwiesen als die WT und Flot1-KO-Zellen. Die Behandlung mit Forskolin/Rolipram reduzierte die Fragmentierung signifikant in Flot1-KO- und Flot2-KO-Zellen (**Abb. 22 A, B**). Dies deutet darauf hin,

dass cAMP-vermittelte Mechanismen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Zelladhäsion in Flot-KO-Zellen spielen.

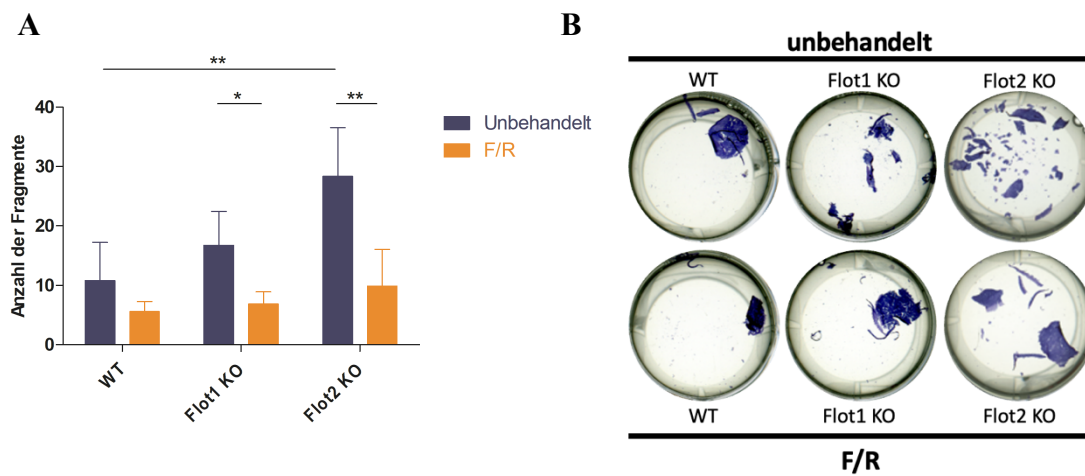


Abbildung 22: Protektiver Effekt von Forskolin/Rolipram auf die Monolayerintegrität von Flot-KO hTert-Keratinocyten.

Der gleiche Versuchsaufbau wie in **Abb. 17** wurde verwendet. Für die vorgesehenen Wells wurde das Medium mit F/R zugesetzt. **(A)** Die Graphik zeigt die Anzahl an Fragmenten in hTert WT-, Flot1-KO- und Flot2-KO-Keratinocyten in Abhängigkeit von Behandlung mit F/R. Die statistische Analyse wurde mithilfe der zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede sind in den Abbildungen durch * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,01$ gekennzeichnet. Der Fehlerbalken stellt die Standardabweichung der Werte dar, die in mind. vier unabhängigen Experimenten ermittelt wurden. **(B)** Die Bilder zeigen beispielhafte Darstellung der Monolayer nach Durchführung des Monolayer-Dissoziationsassays.

4.3.2 Beteiligung von Flotillinen am cAMP-vermittelten Mechanismus zur Verhinderung des mAK23-induzierten Verlustes der Zell-Zell-Adhäsion in hTert-Zellen

Um die Beteiligung von Flotillinen an den durch cAMP vermittelten protektiven Mechanismen weiter zu untersuchen, wurden Experimente mit Zugabe des pathogenen monoklonalen Antikörpers mAK23 durchgeführt. Nach Erreichen der Konfluenz wurde das Medium auf 2 mM CaCl_2 für 24 h erhöht. Die Zellen wurden mit Forskolin/Rolipram vorinkubiert, um den intrazellulären cAMP-Spiegel zu erhöhen und anschließend mit 75 $\mu\text{g/ml}$ Kontrollantikörper (Ktrl IgG) oder pathogenen anti-Dsg3 mAK23 für 24 h behandelt. Danach wurden die Monolayer-Dissoziationsassays durchgeführt und die resultierenden Fragmente gezählt.

Die Ergebnisse der Experimente mit WT und Flot1-KO zeigten, dass Flot1-KO-Zellen bereits unter Kontrollantikörperbedingungen eine höhere Instabilität als die WT-Zellen aufwiesen, die durch Forskolin/Rolipram Behandlung reduziert werden konnte. Die Behandlung mit mAK23 erhöhte signifikant die Fragmentierung der WT- und Flot1-KO-Zellmonolayer, dieser Effekt konnte jedoch durch gleichzeitige Behandlung mit Forskolin/Rolipram signifikant reduziert werden (**Abb. 23 A, B**).

In den Experimenten mit WT- und Flot2-KO-Zellen führte mAK23 ebenfalls zu einer signifikanten Fragmentierung der Zellmonolayer. Jedoch zeigte die Behandlung mit Forskolin/Rolipram in den Flot2-KO-Zellen keine signifikante Reduktion der Fragmente. Wie durch **Abb. 22** bereits bekannt, wiesen Flot2-KO-Zellen unter Kontrollantikörperbedingungen eine erhöhte Instabilität auf, die durch Forskolin/Rolipram Behandlung reduziert werden kann (**Abb. 23 C, D**).

Diese Daten deuten auf eine mögliche Rolle von Flot2 auf den protektiven cAMP-Mechanismus unter pathogenen Bedingungen hin, insbesondere bei der Behandlung mit mAK23. Die Flot1-KO-Zellen scheinen sowohl unter Kontroll- als auch unter pathogenen Antikörperbedingungen stärker auf die von Forskolin/Rolipram induzierte Stabilisierung zu reagieren.

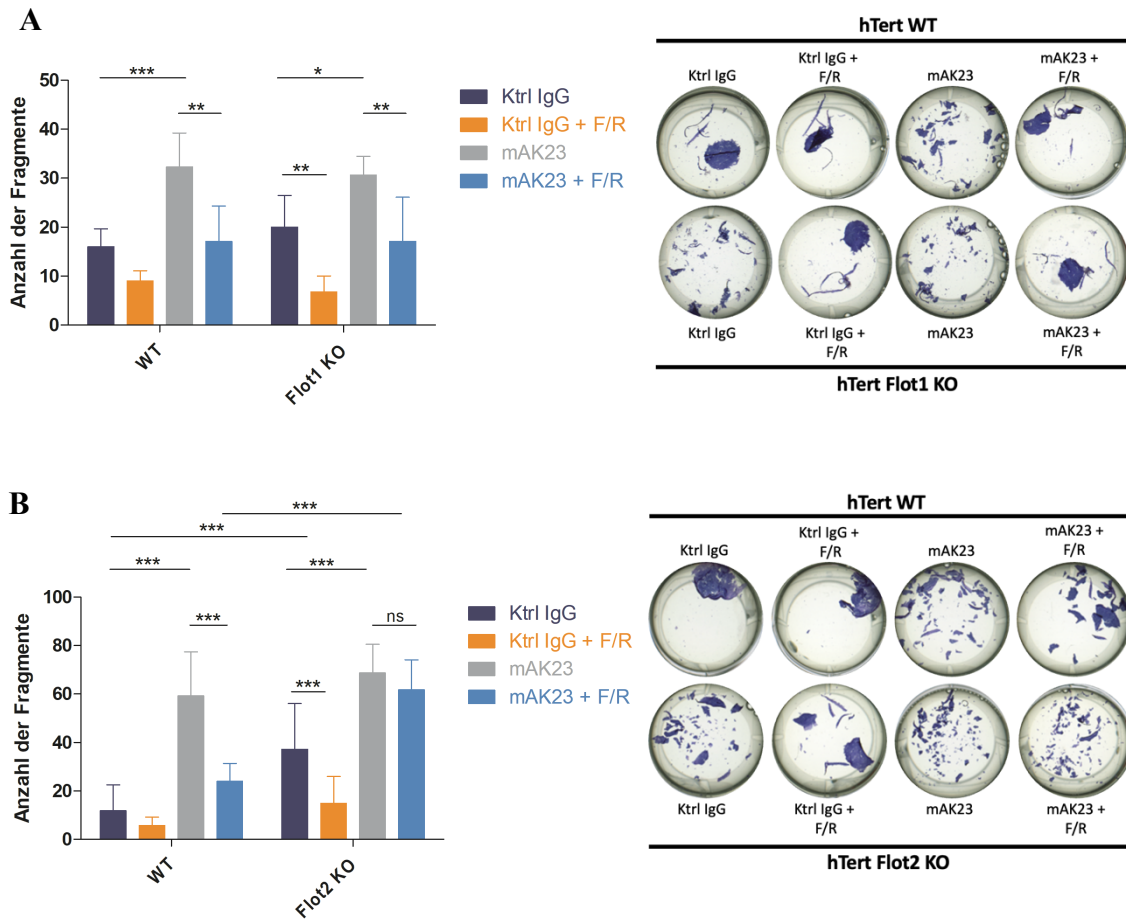


Abbildung 23: Effekt von Forskolin/Rolipram auf den mAK23 induzierten Verlust der Zell-Zell-Adhäsion in Flot-KO hTert-Keratinocyten.

(A) Der Versuchsaufbau ist wie in **Abb. 17** beschrieben. Für die vorgesehenen Wells wurde das Medium mit F/R zugesetzt. Danach wurden die Zellen mit Kontrollantikörpern (Ktrl IgG) oder mAK23 für 24 h behandelt. Die Graphik zeigt die Anzahl an Fragmenten in hTert-WT- und Flot1-KO-Keratinocyten in Abhängigkeit von Behandlung mit F/R und/oder mAK23. Die statistische Analyse wurde mithilfe der zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede sind in den Abbildungen durch * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ *** oder $p \leq 0,001$ gekennzeichnet. Der Fehlerbalken stellt die Standardabweichung der Werte dar, die in mind. vier unabhängigen Experimenten ermittelt wurden. Die Bilder zeigen beispielhafte Darstellung der Monolayer nach Durchführung des Monolayer-Dissoziationsassays.

(B) Der gleiche Experimentaufbau wie bei (A) wurde für hTert WT- und Flot2-KO-Keratinocyten angewendet. Die Bilder zeigen beispielhafte Darstellung der Monolayer nach Durchführung des Monolayer-Dissoziationsassays.

4.3.3 Expression von Dsgs und Flots nach Behandlung mit mAK23 und Forskolin/Rolipram in Flot-KO-Keratinocyten

In hTert-WT-Keratinocyten wurde bereits gezeigt, dass mAK23 die Proteinlevel von Dsg3 und Flot2 reduzieren kann und dass ein erhöhtes intrazelluläres cAMP-Level diesen Effekt nicht verhindern kann (**Abb. 19**). Daher wurde untersucht, welchen Einfluss mAK23 und der cAMP-induzierte Schutzmechanismus auf die Proteinlevel von Dsg und Flot in Flot-KO-Keratinocyten haben. Hierfür wurde der gleiche Versuchsaufbau mit hTert Flot1-KO- und Flot2-KO-Zellen durchgeführt wie bei den hTert-WT-Zellen (**Abb. 19**). Ähnlich wie im hTert WT konnte in den hTert Flot1-KO-Keratinocyten eine Reduktion des Dsg3-Levels nach Behandlung mit mAK23 sowie mit der Kombination aus mAK23 und Forskolin/Rolipram beobachtet werden. Die Dsg1- und Flot2-Expression zeigten keine signifikanten Unterschiede (**Abb. 24 A, B**).

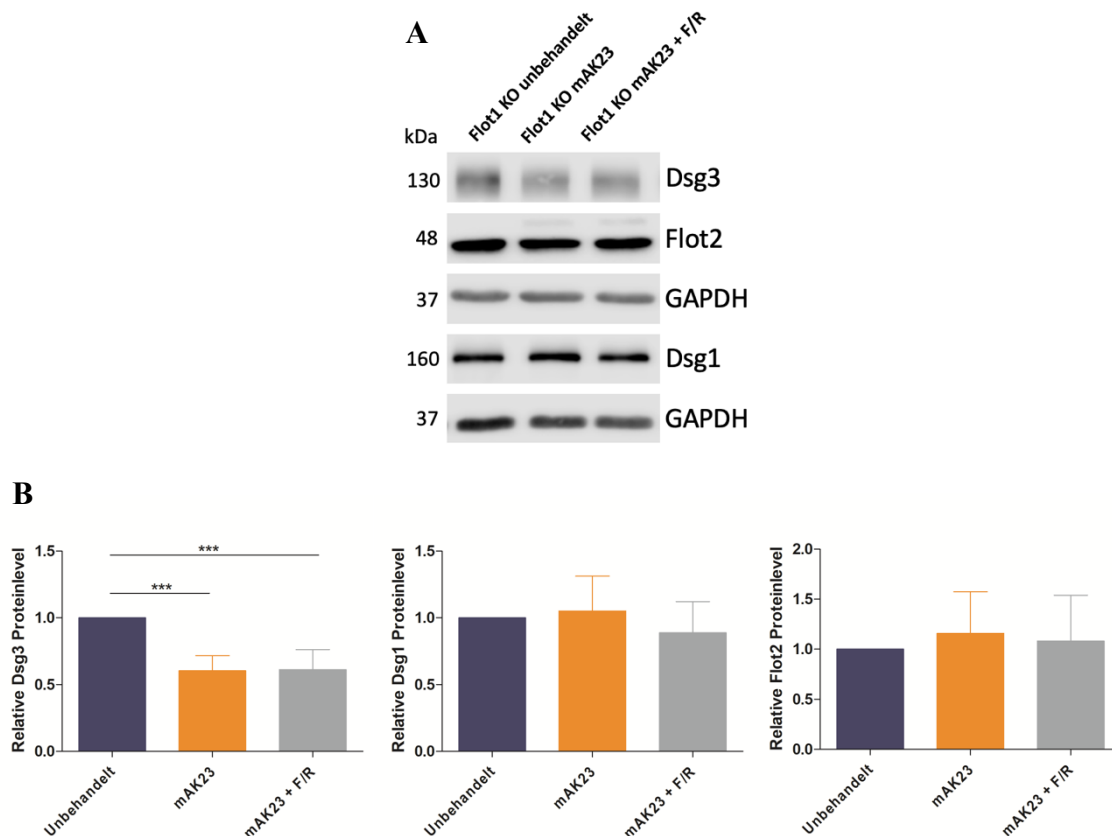


Abbildung 24: Effekt von Forskolin/Rolipram auf die Expression von Dsg und Flot in Flot1-KO-Keratinocyten behandelt mit mAK23.

Der gleicher Versuchsaufbau wie beschrieben in **Abb. 19** wurde verwendet. **(A)** Es wurden WBs durchgeführt zur Darstellung der Dsg1-, Dsg3- und Flot2-Expression. **(B)** Die Graphiken zeigen die Grauintensitäten der Signale von Dsg1, Dsg3 und Flot2 in den hTert Flot1-KO-Zellen. GAPDH diente als Ladekontrolle und die Signalintensitäten wurden zur Quantifizierung relativ

zum GAPDH-Signal normalisiert. Die statistische Analyse wurde mithilfe der zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede sind in den Abbildungen durch *** $p \leq 0,001$ gekennzeichnet. Der Fehlerbalken stellt die Standardabweichung der Werte dar, die in mind. vier unabhängigen Experimenten ermittelt wurden.

Die hTert Flot2-KO-Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Dsg1-, Dsg3- und Flot1-Expression, obwohl die WB-Analyse eine sichtbare Reduktion des Dsg3- und Flot1-Proteinlevels nach Behandlung mit mAK23 zeigte (**Abb. 25 A, B**). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die statistische Signifikanz möglicherweise aufgrund einer hohen Variabilität nicht erreicht wurde.

Zusammenfassend belegen die Ergebnisse in Flot1-KO-Zellen, dass die Behandlung mit mAK23 sowie mit der Kombination aus mAK23 und Forskolin/Rolipram zu einer Reduktion der Dsg3- und Flot2-Expression führte. Die Flot2-KO-Zellen zeigten keine signifikanten Veränderungen, obwohl eine Tendenz zur Reduktion der Dsg3-Expression und eine Erhöhung der Flot1-Expression im WB erkennbar war.

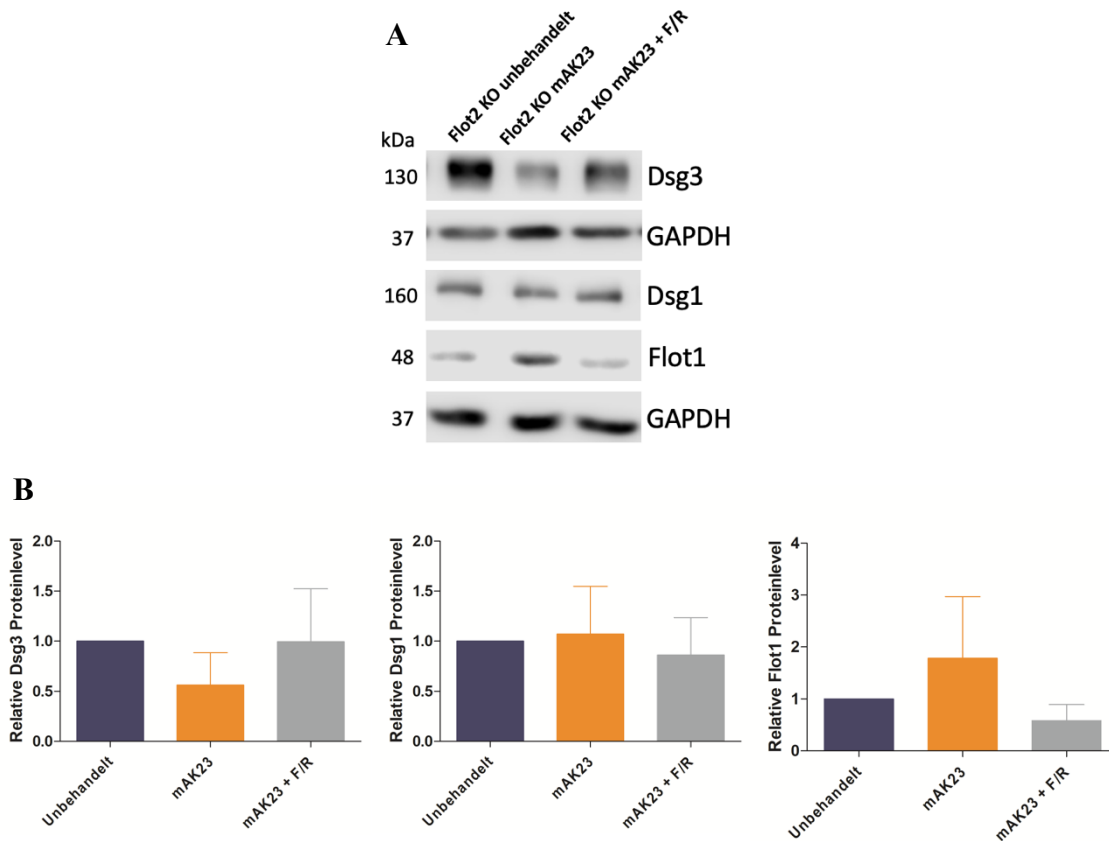


Abbildung 25: Effekt von Forskolin/Rolipram auf die Expression von Dsg und Flot in Flot2-KO-Keratinocyten behandelt mit mAK23.

Der gleiche Versuchsaufbau wie beschrieben in **Abb. 19** wurde verwendet. **(A)** Es wurden WBs zur Darstellung der Dsg1-, Dsg3- und Flot1-Expression durchgeführt. **(B)** Die Graphiken zeigen die Grauintensitäten der Signale von Dsg1, Dsg3 und Flot1 in den hTert Flot2-KO-Zellen. GAPDH diente als Ladekontrolle und die Signalintensitäten wurden zur Quantifizierung relativ zum GAPDH-Signal normalisiert. Die statistische Analyse wurde mithilfe der zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Der Fehlerbalken stellt die Standardabweichung der Werte dar, die in mind. vier unabhängigen Experimenten ermittelt wurden.

4.3.4 Beteiligung von Flot am cAMP-vermittelten Mechanismus zur Verhinderung des mAK23-induzierten Verlustes der Zell-Zell-Adhäsion in HaCaT-Zellen

Der gleiche experimentelle Versuchsaufbau wie in **Abb. 23** wurde auch auf HaCaT-Keratinocyten übertragen, um die gewonnen Erkenntnisse in einer weiteren Zelllinie zu validieren. Die Flot1-KO- und Flot2-KO-Zellen wurden separat mit WT-Zellen in einer 24-Well-Platte kultiviert. Nach der Behandlung der Zellen wurde der Monolayer-

Dissoziationsassay durchgeführt. Die daraus resultierenden Zellfragmentierungen wurden dokumentiert und die Anzahl der Fragmente wurde quantifiziert.

Die Analyse der Flot1-KO-Zellen zeigte, dass die Behandlung mit dem pathogenen mAK23 zu einer signifikanten Erhöhung der Fragmentanzahl führte. Die Behandlung mit Forskolin/Rolipram reduzierte die Fragmentierung signifikant. Zusammenfassend war jedoch kein Unterschied zwischen WT- und Flot1-KO-Zellen festzustellen (**Abb. 24 A, B**).

Wie bei den hTert-Keratinocyten (**Abb. 23 C, D**) induzierte mAK23 auch in HaCaT WT- und Flot2-KO-Zellen eine signifikant stärkere Fragmentierung der Zellmonolayer. Im Gegensatz zu den WT-Zellen konnte die Behandlung mit Forskolin/Rolipram in Flot2-KO-Zellen keine signifikante Reduktion der Fragmentanzahl bewirken. Darüber hinaus zeigten HaCaT Flot2-KO-Zellen unter Kontrollantikörperbedingungen ebenfalls eine erhöhte Instabilität, die durch Behandlung mit Forskolin/Rolipram jedoch verringert werden konnte (**Abb. 26 C, D**).

Diese Ergebnisse stimmen mit den Befunden der Experimente mit hTert-Keratinocyten überein und deuten darauf hin, dass Flot2 eine zentrale Rolle im protektiven cAMP-abhängigen Mechanismus unter pathogenen Bedingungen spielt, insbesondere bei der Behandlung mit mAK23. Im Gegensatz dazu wirkte die durch Forskolin/Rolipram induzierte cAMP-Erhöhung protektiv nach Behandlung mit pathogenen Antikörpern auf die Zellmonolayer der Flot1-KO-Zellen.

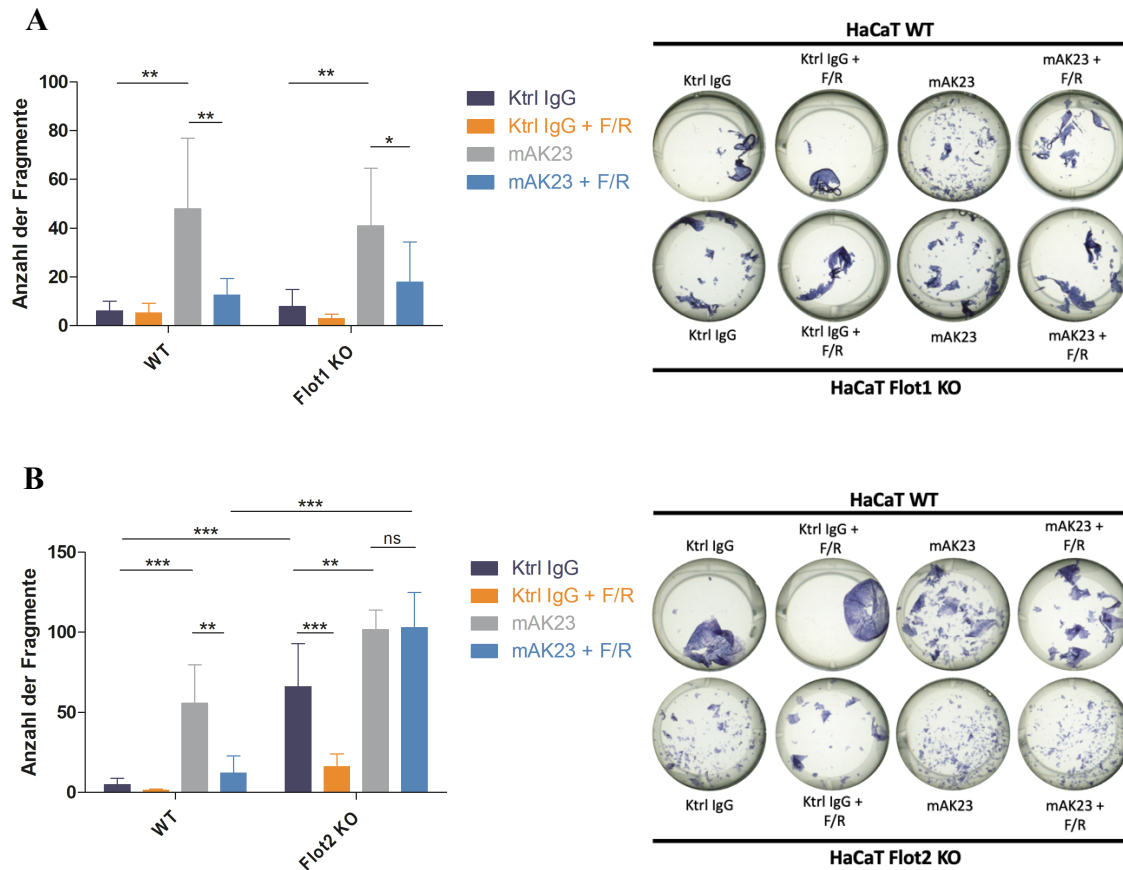


Abbildung 26: Effekt von Forskolin/Rolipram auf den mAK23-induzierten Verlust der Zell-Zell-Adhäsion in Flot-KO HaCaT-Keratinocyten.

(A) Der gleiche Versuchsaufbau wie in **Abb. 23** wurde für HaCaT-Zellen verwendet. Die Graphik zeigt die Anzahl an Fragmenten in HaCaT WT- und Flot1-KO-Keratinocyten in Abhängigkeit von Behandlung mit F/R und/oder Stimulation mit mAK23. Die statistische Analyse wurde mithilfe der zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede sind in den Abbildungen durch * $p \leq 0,05$ oder ** $p \leq 0,01$ gekennzeichnet. Der Fehlerbalken stellt die Standardabweichung der Werte dar, die in mind. drei unabhängigen Experimenten ermittelt wurden. Die Bilder zeigen beispielhafte Darstellung der Monolayer nach Durchführung des Monolayer-Dissoziationsassays. (B) Der gleiche Experimentaufbau wie bei (A) wurde für HaCaT WT- und Flot2-KO-Keratinocyten angewendet. Die Bilder zeigen beispielhafte Darstellung der Monolayer nach Durchführung des Monolayer-Dissoziationsassays.

4.4 Einfluss der Phosphorylierung von Flot2 an Tyr163 auf die Monolayerstabilität in Keratinozyten

4.4.1 Charakterisierung der HaCaT Flot2-KO-Zelllinien mit Überexpression von Flot2-WT oder Y163F-Mutante

Physiologisch wird Flot2 durch die Src-Kinase, die z.B. durch den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) aktiviert wird, an mehreren Tyrosinresten phosphoryliert, was eine Endozytose von Flot2 in HeLa-Zellen induziert. Neumann-Giesen et al. zeigten, dass die Flot2-Y163F-Mutante den stärksten Effekt auf das Ausbleiben der EGF-induzierten Endozytose hatte. Die Punktmutation an Position 163 führt zu einem Austausch der Aminosäure Tyrosin (Tyr, Y) durch Phenylalanin (Phe, F), wodurch diese Stelle nicht mehr phosphoryliert werden kann und daher verbleibt die Y163F-Mutante an der Plasmamembran (Neumann-Giesen et al. 2007).

Zur Untersuchung des Einflusses der Phosphorylierung an Tyr163 auf die Monolayerstabilität wurde die Flot2-Mutante Y163F in HaCaT-Zellen analysiert. Ziel der Untersuchung war es, den potenziellen Einfluss der Tyr-Phosphorylierung auf die desmosomale Adhäsion und den protektiven cAMP-abhängigen Mechanismus zu analysieren.

Für die Experimente wurden die Zelllinien Flot2-Y163F und Flot2-WT verwendet, die beide am C-Terminus von Flot2 mit einem EGFP-Tag markiert waren und daher die Proteingröße von 48 kDa auf etwa 75 kDa erhöht wurde. Diese Zellen wurden durch eine stabile genomische Integration eines Flot2-WT-EGFP- oder Flot2-Y163F-EGFP-Konstrukts in Flot2-KO-HaCaT-Zellen hergestellt (Doktorarbeit von Inga Lisa Nordhues). Dies ermöglicht den Vergleich der Y163F-Mutante mit einem WT-Flot2-Protein, das die gleiche Molekülmasse wie die Mutante aufweist, um potenzielle Effekte aufgrund der EGFP-Markierung auszuschließen.

Zur Validierung der Expression der Flot2-Y163F- und Flot2-WT-Proteine wurden die Zellen in 6-Well-Platten kultiviert und nach Erreichen der Konfluenz lysiert. Es wurden WB-Experimente durchgeführt, um die Expression von Flot1 und Flot2 zu überprüfen. Da sowohl Flot2-Y163F als auch Flot2-WT mit EGFP markiert sind, wurde der monoklonale Antikörper anti-GFP zur Detektion eingesetzt, der als prominentes Signal bei etwa 75 kDa zu beobachten ist. Beim Einsatz von anti-Flot2 Antikörpern wurden im WB mehrere Signale im Bereich von 48 bis 75 kDa sichtbar, wobei die prominentesten Signale bei 48 und 75 kDa lagen. Im Vergleich dazu zeigten die HaCaT WT-Zellen ein

einzelnes Signal bei 48 kDa, das der endogenen Form von Flot2 entspricht. GAPDH diente als Ladekontrolle. Die Flot2-WT-Zellen zeigten im Vergleich zur Flot2-Y163F-Mutante eine geringere Expression von Flot2 sowie Flot1 (**Abb. 27 A, B**). Insgesamt wurde aber bestätigt, dass Flot2-Y163F und Flot2-WT exprimiert werden.

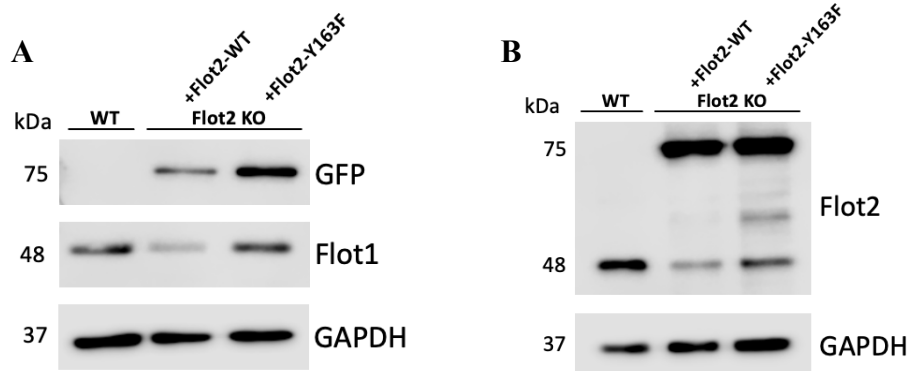


Abbildung 27: Validierung der Überexpression von Flot2-WT oder Y163F-Mutante in HaCaT Flot2-KO-Zellen.

(A) Nach der Herstellung der Zellysate wurde ein WB durchgeführt und anschließend die Expression von Flot2 mit anti-GFP und Flot1 mit anti-Flot1 Antikörpern überprüft. (B) Wie in (A) wurde ein WB mit anschließender Detektion der Flot2-Expression mit anti-Flot2 Antikörpern durchgeführt. GAPDH diente als Ladekontrolle.

4.4.2 Bedeutung der Tyr163-Phosphorylierung für die Monolayerstabilität

Um die Bedeutung der Tyr163-Phosphorylierung auf die Monolayerstabilität zu überprüfen, wurde mithilfe des Monolayer-Dissoziationsassays die Mutante Flot2-Y163F mit der Flot2-WT-Zelllinie verglichen. Der Versuchsaufbau entsprach dem in **Abb. 23** dargestellten Protokoll. In den HaCaT Flot2-WT-Zellen führte die Behandlung mit Kontrollantikörpern oder die Zugabe von Forskolin/Rolipram zu keiner Veränderung der Fragmentierung. Im Gegensatz dazu bewirkte der pathogene Antikörper mAK23 eine signifikante Zunahme der Fragmente. Dieser Effekt konnte durch die Forskolin/Rolipram-Behandlung signifikant reduziert werden, was die protektive Wirkung eines erhöhten cAMP-Spiegels in Anwesenheit von Flot2-WT-EGFP bestätigt. Interessanterweise zeigte die Mutante Flot2-Y163F unabhängig von der Antikörperbehandlung oder Forskolin/Rolipram-Stimulation eine stark erhöhte Fragmentierung der Zellmonolayer und der protektive Effekt blieb weitestgehend aus (**Abb. 28 A, B**).

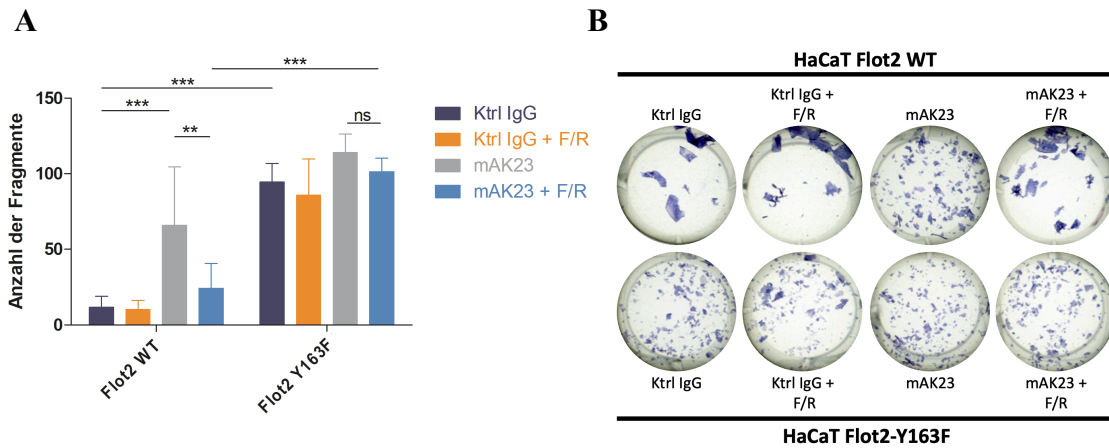


Abbildung 28: Effekt von Forskolin/Rolipram auf den mAK23-induzierten Verlust der Zell-Zell-Adhäsion in Flot2-Y163F-überexprimierenden HaCaT-Zellen im Vergleich zu Flot2-WT-überexprimierenden HaCaT.

(A) Der gleiche Versuchsaufbau wie in Abb. 23 wurde für HaCaT-Zellen verwendet. Die HaCaT Flot2-WT-Zellen stellen die Kontrollgruppe im Vergleich zu der Mutante Flot2-Y163F dar. Die Graphik zeigt die Anzahl an Fragmenten in HaCaT Flot2-WT- und Flot2-Y163F-Keratinocyten in Abhängigkeit von Behandlung mit F/R und/oder Stimulation mit mAK23. Die statistische Analyse wurde mithilfe der zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede sind in den Abbildungen durch ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ gekennzeichnet. Der Fehlerbalken stellt die Standardabweichung der Werte dar, die in mind. vier unabhängigen Experimenten ermittelt wurden. (B) Die Bilder zeigen beispielhafte Darstellung der Monolayer nach Durchführung des Monolayer-Dissoziationsassays.

Im nächsten Schritt wurde die Mutante Flot2-Y163F mit den Flot2-KO HaCaT-Zellen verglichen, um die hohe Grundfragmentierung der Mutante besser einordnen zu können. Die Flot2-KO-Zellen zeigten unter dem Einfluss von Kontrollantikörpern (Ktrl-IgG) ebenfalls eine erhöhte Fragmentierung. Diese Fragmentierung konnte durch Forskolin/Rolipram-Zugabe signifikant reduziert werden. Nach Behandlung mit mAK23 wurde jedoch keine Veränderung bei der Zugabe von Forskolin/Rolipram festgestellt. Interessanterweise war die Fragmentierung der Zellmonolayer in den Flot2-Y163F-Zellen unter Kontrollbedingungen sogar signifikant höher als in den Flot2-KO-Zellen. Auch unter Zugabe von Forskolin/Rolipram und Kontrollantikörpern war die Fragmentierung in der Flot2-Y163F-Mutante signifikant höher als in den Flot2-KO-Zellen (Abb. 29 A, B).

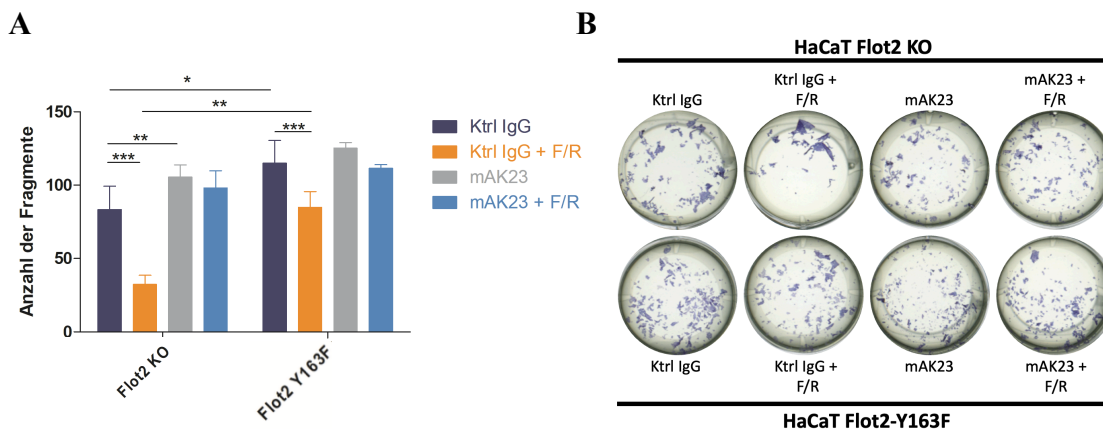


Abbildung 29: Effekt von Forskolin/Rolipram auf den mAK23-induzierten Verlust der Zell-Zell-Adhäsion in Flot2-Y163F-überexprimierenden HaCaT-Zellen im Vergleich zu HaCaT Flot2-KO.

(A) Der gleiche Versuchsaufbau wie in **Abb. 23** wurde für HaCaT-Zellen verwendet. Die HaCaT Flot2-KO-Zellen wurden mit der Mutante Flot2-Y163F verglichen. Die Graphik zeigt die Anzahl an Fragmenten in HaCaT Flot2-KO und Flot2-Y163F-Keratinocyten in Abhängigkeit von Behandlung mit F/R und/oder Stimulation mit mAK23. Die statistische Analyse wurde mithilfe der zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede sind in den Abbildungen durch * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ oder *** $p \leq 0,001$ gekennzeichnet. Der Fehlerbalken stellt die Standardabweichung der Werte dar, die in mind. vier unabhängigen Experimenten ermittelt wurden. (B) Die Bilder zeigen beispielhafte Darstellung der Monolayer nach Durchführung des Monolayer-Dissoziationsassays.

Zuletzt wurde die Mutante Flot2-Y163F mit den endogenen HaCaT WT-Zellen verglichen. Der Versuchsaufbau entsprach dem in **Abb. 23** dargestellten Protokoll. Die HaCaT WT-Zellen zeigten den gleichen protektiven Effekt bei der cAMP-Behandlung wie die HaCaT Flot2-WT-Zellen (**Abb. 28**). Da in **Abb. 27** eine geringe Expression von Flot1 und Flot2 in HaCaT Flot2-WT-EGFP-Zellen festgestellt werden konnte, könnte dies die leicht erhöhte Fragmentierung der Zellmonolayer der Flot2-WT-überexprimierenden HaCaT unter Kontrollantikörperbedingung im Vergleich zu HaCaT WT-Zellen erklären. Die Mutante Flot2-Y163F zeigte in diesem Vergleich das ähnliche Bild wie zuvor in **Abb. 28, 29** beobachtet (**Abb. 30 A, B**). Somit konnte mit dem WT und dem Flot2-WT als Kontrollgruppen das gleiche Ergebnis bestätigt werden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Phosphorylierung an Tyr163 von Flot2 entscheidend für die Funktion des protektiven cAMP-abhängigen Mechanismus sein

kann. Sowohl die HaCaT WT-Zellen als auch die Flot2-WT-Zelllinie zeigten eine signifikante Reduktion der mAK23-induzierten Fragmentierung nach Forskolin/Rolipram-Behandlung. Im Gegensatz dazu war die Forskolin/Rolipram-Behandlung bei den Flot2-Y163F und Flot2-KO-Zellen nicht in der Lage, die Fragmentierung zu reduzieren. Interessanterweise zeigte die Flot2-Y163F Mutante eine höhere Grundfragmentierung als die Flot2-KO-Zellen, was darauf hinweist, dass die Mutation möglicherweise nicht nur die Funktion von Flot2 beeinträchtigt, sondern auch die Integrität der Zell-Zell-Verbindungen weiter destabilisiert. Diese Ergebnisse betonen die Bedeutung der Tyrosin-Phosphorylierung von Flot2 für die Aufrechterhaltung der Zellmonolayer-Stabilität und die protektive Wirkung des cAMP.

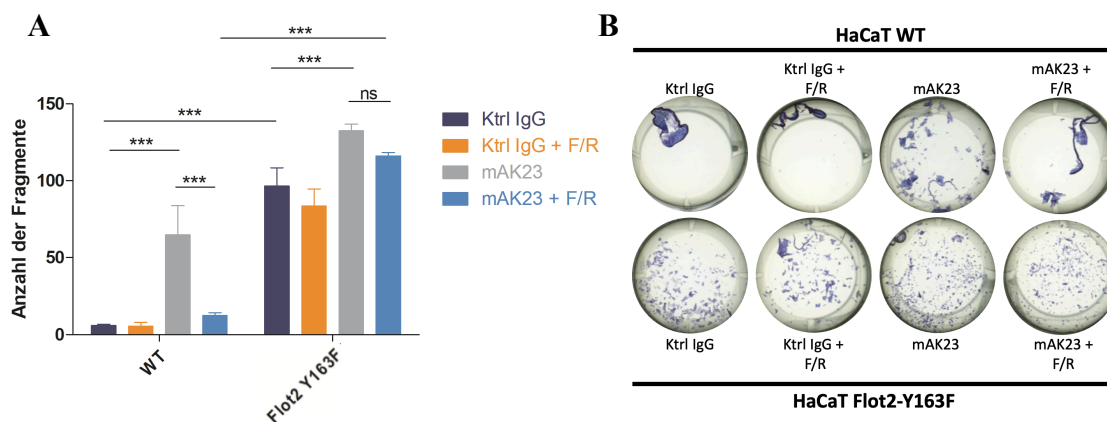


Abbildung 30: Effekt von Forskolin/Rolipram auf den mAK23-induzierten Verlust der Zell-Zell-Adhäsion in Flot2-Y163F-überexprimierenden HaCaT-Zellen im Vergleich zu HaCaT-WT-Zellen.

(A) Der gleiche Versuchsaufbau wie in Abb. 23 wurde für HaCaT-Zellen verwendet. Die HaCaT-WT-Zellen stellen die Kontrollgruppe dar, die in **Abb. 20** bereits beschrieben wurde, im Vergleich zu der Mutante Flot2-Y163F dar. Die Graphik zeigt die Anzahl an Fragmenten in HaCaT-WT und Flot2-Y163F-Keratinocyten in Abhängigkeit von Behandlung mit F/R und/oder Stimulation mit mAK23. Die statistische Analyse wurde mithilfe der zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede sind in den Abbildungen durch $*** p \leq 0,001$ gekennzeichnet. Der Fehlerbalken stellt die Standardabweichung der Werte dar, die in mind. vier unabhängigen Experimenten ermittelt wurden. (B) Die Bilder zeigen beispielhafte Darstellung der Monolayer nach Durchführung des Monolayer-Dissoziationsassays.

5 Diskussion

In der Anwesenheit von mAK23, einem monoklonalen Antikörper gegen Dsg3, wird die Zellkohäsion beeinträchtigt, was zu einer Akantholyse von Keratinozyten führt (Walter et al. 2017). Der cAMP-Signalweg wirkt protektiv bei der durch PV verursachten Blasenbildung. Die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels kann die Blasenbildung und den Verlust der Zellkohäsion durch die Aktivierung der PKA und die Hemmung der p38MAPK-Aktivierung verhindern (Spindler et al. 2010). Dies geschieht durch die Stabilisierung der Desmosomenstruktur und die Verbesserung der zytoskelettalen Verankerung von Dsg3, was die Zelladhäsion stärkt und die pathologischen Effekte von mAK23 reduziert. Flotilline sind bekannt dafür, dass sie mit dem zytoplasmatischen Anteil von Dsg interagieren und die Zelladhäsion stabilisieren (Völlner et al. 2016). Ich habe in meiner Arbeit untersucht, ob Flotilline eine Rolle bei dem bekannten cAMP-vermittelten Schutzmechanismus spielen, um den Zelladhäsionsverlust, der durch pathogene Anti-Dsg3-Antikörper induziert wird, zu verhindern.

5.1 Die hTert- und HaCaT-Zelllinien als Modellsysteme zur Untersuchung der desmosomalen Adhäsion

Zur Untersuchung von Mechanismen, wie die Desmosomenadhäsion oder Pathogenese von PV, werden hauptsächlich Zelllinien wie hTert- und HaCaT-Keratinozyten oder primäre Keratinozyten verwendet (Beckert et al. 2019; Walter et al. 2019). Die Wahl eines geeigneten Keratinozyten-Zellmodells war für meine Arbeit entscheidend. Die hTert-Zelllinie kann durch die Expression der katalytischen Untereinheit der Telomerase unbegrenzt proliferieren (Beckert et al. 2019; Ramirez et al. 2003). Die Zellen weisen eine stabile Desmosomen-Cadherin-Expression auf und ermöglichen reproduzierbare Experimente, da Variationen, die in primären Keratinozyten vorhanden sind, entfallen (Beckert et al. 2019; Smits et al. 2017). Die hTert-Zellen spiegeln die physiologische Funktion gut wieder, sind jedoch nicht gut transfizierbar (Farwell et al. 2000; Smits et al. 2017). Im Vergleich zu hTert-Zellen sind HaCaT-Zellen einfach zu kultivieren, gut transfizierbar und eignen sich für genetische Modifikationen, um z.B. für meine Arbeit Flotillin-Aminosäuresequenz zu modulieren. Die Zellen weisen jedoch chromosomale Aberrationen und eine veränderte Differenzierung auf, was ihre physiologische Relevanz einschränkt (Beckert et al. 2019; Deyrieux und Wilson 2007; Jahn et al. 2024). Im Vergleich dazu bieten primäre Keratinozyten die höchste physiologische Relevanz, da sie

die natürliche Zellbiologie und Pathophysiologie am genauesten widerspiegeln (Sprenger et al. 2013). Allerdings stellen ihre begrenzte Lebensdauer, die donorbedingten Variationen und die Herausforderung der genetischen Modifikation bedeutende Einschränkungen dar (Beckert et al. 2019; Jahn et al. 2024). Zusammenfassend wurde für diese Arbeit die Kombination aus Experimenten mit den hTert- und HaCaT-Zelllinien gewählt, sodass die experimentelle Flexibilität und die physiologische Aussagekraft optimiert wird.

5.1.1 Generierung einer neuen Flot2-KO hTert-Keratinocyten Zelllinie

Bei meinen ersten Experimenten habe ich festgestellt, dass die Flot2- und Flot1/2-KO hTert-Zelllinien, generiert mit der CRISPR/Cas9-Technik, keinen vollständigen Verlust der Flot2-Expression aufwiesen. Stattdessen zeigte sich ein schwaches Signal bei einem niedrigen Molekulargewicht (MW) im WB, welches auf ein trunkiertes Protein hinweist. Es liegt wahrscheinlich ein Verlust bestimmter Aminosäuresequenzen vor, was in vielen Fällen mit einem Funktionsverlust einhergeht. Eine DNA-Sequenzierung bzw. Analyse der vorhandenen mRNA-Spleißvarianten wäre notwendig, um diese Vermutung zu bestätigen (Den Dunnen und Van Ommen 1999; Fortelny et al. 2015; Prokisch 2019). Mehrere Ursachen könnten zur Entstehung des verkürzten Flot2-Proteins geführt haben, darunter alternative Spleißvarianten, vorzeitige Terminationscodons oder partieller Abbau. Alternative Spleißvarianten können durch Veränderungen in der mRNA-Prozessierung entstehen oder infolge neu entstandener Spleiß-Konsensus-Sequenzen sowie dem Verlust regulatorischer Sequenzen (Rosen et al. 2020). Frameshift-Mutationen, die vorzeitige Terminationscodons erzeugen können, sind ebenfalls eine häufige Ursache für verkürzte Proteine (Novodvorsky et al. 2015). In der Publikation von Kapahnke et al. wurde gezeigt, dass eine einzelne Basenänderung im Ziel-Exon, die durch CRISPR/Cas9 vermittelt wird, zu zufälligem Spleißen mehrerer Exons führen kann (Kapahnke et al. 2016). Diese Veränderungen entstehen wahrscheinlich durch Mutationen in spleißregulatorischen Sequenzen. Interessanterweise zeigte die Publikation von Smits et al., dass bei einer Analyse der verkürzten Proteinen BRD4, DNMT1 und NGLY1 die Proteinfunktion trotz genetischer Modifikationen teilweise erhalten blieb. Dies kann durch Translation von N-terminal verkürzten Proteinen oder durch Exon-Skipping geschehen, was zu funktionellen Proteinisoformen führen kann (Smits et al. 2019). Neben den biologischen Gründen könnte auch die verwendete CRISPR/Cas9-Technik die Effizienz der Generierung beeinflusst haben. Optimierungen, wie die Nutzung anderer

Cas9-Varianten, verbesserter gRNAs oder selektierbarer Marker (z. B. Antibiotikaresistenz), könnten die Klonierung und Selektion verbessern.

Ich konnte zeigen, dass in dem nicht-selektierten Zellpool nach Anwendung der CRISPR/Cas9-Technik eine gemischte Zellpopulation vorhanden war, wobei einige Zellen mit vollständigem Knockout der Flot2-Expression aufwiesen. Durch Isolierung von Einzelklonen aus diesem Flot2-KO-Pool konnten drei Flot2-KO-Klone erfolgreich generiert werden, die einen vollständigen Verlust der Flot2-Expression zeigten. Im Gegensatz dazu konnten keine geeigneten Flot1/2-KO-Klone isoliert werden. Eine Begründung für die vielen Fehlschläge ist, dass der Flot1/2-KO-Pool basierend auf einem Flot2-KO-Klon generiert wurde, welcher eine Flot2-Expression mit verkürzter Proteinelänge aufwies.

Da die Generierung einer Flot2-KO hTert-Zelllinie erfolgreich war, konnte mit dieser in den folgenden Experimenten gearbeitet werden. Die hTert-Keratinocyten wurden mittels WB und IF-Färbung charakterisiert. Wie erwartet zeigte sich bei der Charakterisierung der Flot2-KO-Klone eine reduzierte Flot1-Expression, ähnlich wie die reduzierte Flot2-Expression in den Flot1-KO-Klonen. Der in meiner Arbeit isolierte Flot2-KO-Klon bietet ein gutes Zellmodell zur Untersuchung der Rolle von Flotillinen in der PV-Pathogenese. Insbesondere mit dem Hintergrund des cAMP-modulierenden Mechanismus in der Desmosomenadhäsion bieten diese Klone Potenzial für weiterführende Studien.

5.2 Monoklonale Anti-Dsg3 Antikörper als wertvolle Werkzeuge in der Pemphigusforschung

Wie bereits beschrieben, wurde zur Untersuchung der Pathogenese von PV der monoklonale Anti-Dsg3-Antikörper mAK23 gewählt. Dieser Antikörper hat sich als eine zuverlässige und gut charakterisierte Option erwiesen, da er spezifisch an die EC1-Domäne von Dsg3, ein wichtiges Hauptzielantigen bei PV, bindet und effektiv PV-ähnliche Blasenbildung induziert. Durch die Bindung an ein calciumabhängiges Epitop von Dsg3 hemmt mAK23 direkt die Zelladhäsion und aktiviert Signalwege wie p38MAPK, Src oder Akt, die für die Krankheit zentral sind (Schmitt et al. 2023; Walter et al. 2017). Experimentelle Modelle mit mAK23 zeigen suprabasale Akantholyse, Desmosomenverlust und Dsg3-Depletion (Egu et al. 2020; Tsunoda et al. 2003). Diese Eigenschaften machen mAK23 zu einem ausgezeichneten Werkzeug für die Forschung, besonders für die Erkrankung PV. Alternativ können polyklonale PV-IgG aus

Patientenseren verwendet werden, die aus einer Ansammlung aus verschiedenen Autoantikörpern bestehen. Allerdings weisen diese Seren Einschränkungen hinsichtlich der Standardisierung und Reproduzierbarkeit auf, was ihre Nutzung erschwert (Saito et al. 2012). Zusammenfassend bietet mAK23 durch seine Spezifität, die Aktivierung relevanter Signalwege und seine konsistente Pathogenität ein gutes Werkzeug zur Erforschung der PV-Mechanismen. Der pathogene Antikörper mAK23 stellt eine bevorzugte Wahl gegenüber anderen Antikörpern dar, insbesondere aufgrund seiner Fähigkeit, die zentralen pathologischen Merkmale von PV zuverlässig nachzubilden.

5.3 Protektiver Effekt von cAMP auf die Monolayerstabilität in hTert- und HaCaT-Keratinocyten

5.3.1 Die cAMP-Erhöhung schützt die hTert- und HaCaT-Keratinocyten vor mAK23-induzierten desmosomalem Adhäsionsverlust

Frühere Studien zeigten, dass cAMP-modulierende Substanzen wie Forskolin/Rolipram oder Apremilast vor den Effekten pathogener mAK23- bzw. PV-IgG-Antikörper schützen können. Dieser Effekt wurde *in vitro* in HaCaT-Zellen, *ex vivo* in menschlicher Haut und *in vivo* im s.g. passiven Transfermodell in der Maus nachgewiesen (Sigmund et al. 2023; Spindler et al. 2010).

In meiner Arbeit konnte ich den protektiven Effekt des cAMP-Signalwegs in hTert-WT- und HaCaT-WT-Keratinocyten unter Einfluss des pathogenen mAK23-Antikörpers reproduzieren, was die zentrale Rolle dieses Signalwegs in der durch mAK23 oder PV-IgG-Antikörper induzierten Pathogenese unterstreicht (Sigmund et al. 2023; Spindler et al. 2010). Allerdings zeigte die Konzentration von 5 μ M Forskolin/10 μ M Rolipram, die in hTert-WT-Keratinocyten als auch in der Studie von Spindler et al. verwendet wurde, keinen signifikanten Effekt in HaCaT-Zellen. Eine schrittweise Erhöhung der Forskolin/Rolipram-Konzentration ergab, dass eine Konzentration von jeweils 20 μ M Forskolin/Rolipram am effektivsten den durch mAK23 induzierten Adhäsionsverlust der Zellmonolayer verhinderte. Ein möglicher Grund für die fehlende Wirkung der niedrigen Konzentration könnte in zellulären Veränderungen von HaCaT-Zellen mit zunehmender Passagenzahl liegen. Die HaCaT-Zellen entwickeln mit der Kultivierungsdauer Chromosomenaberrationen und Mutationen, welche die Signaltransduktion und Substanzsensitivität beeinflussen können (Boukamp et al. 1988). Eine höhere Passagenzahl könnte daher eine erhöhte Forskolin/Rolipram-Konzentration erforderlich

machen, um ein vergleichbares intrazelluläres cAMP-Level, wie in Zellen mit niedriger Passagenzahl, zu erreichen. Um dies zu überprüfen, sollten ELISA-Messungen zur Bestimmung des intrazellulären cAMP-Spiegels in HaCaT-WT-Keratinocyten durchgeführt werden. Zusammenfassend deutet die erhöhte erforderliche Konzentration von Forskolin/Rolipram in HaCaT-Zellen darauf hin, dass sowohl die Passagenzahl als auch zelllinien- oder protokollspezifische Faktoren die Effektivität des protektiven Mechanismus beeinflussen könnten. Weitere Untersuchungen zur Bestimmung des cAMP-Levels und eine Standardisierung der Kulturbedingungen sind erforderlich, um diese Faktoren weiter zu charakterisieren.

5.3.2 Effekt von cAMP auf die Dsg- und Flot-Expression

Bereits aus früheren Studien ist bekannt, dass die pathogenen Anti-Dsg3-Antikörper und der intrazellulär erhöhte cAMP-Spiegel einen Einfluss auf die Dsg- und Flot-Expression haben. In der Studie von Spindler et al. bewirkten die pathogenen PV-IgG- oder mAK23-Antikörpern in HaCaT-Zellen eine Reduktion des Dsg3-Proteinlevels, während die Behandlung mit Forskolin/Rolipram eine Stabilisierung des Dsg3-Spiegels und einen Schutz vor PV-IgG-induzierter Dsg3-Depletion bewirken konnte (Spindler et al. 2010). Die pathogenen Antikörper binden an das desmosomale Cadherin Dsg3 und aktivieren intrazelluläre Signalwege, die zur Endozytose und lysosomalen Degradation von Dsg3 führen. Die Dsg3-Depletion beeinträchtigt die Zell-Zell-Adhäsion und verursacht einen interzellulären Kontaktverlust (Grando et al. 2009; Waschke 2008). Im Gegensatz zeigte die Studie von Sigmund et al., dass die Behandlung mit Apremilast keine Wirkung auf die Dsg3-Depletion oder die Anzahl der Desmosomen hatte, jedoch wurde die Keratinverankerung durch Desmoplakin-Assemblierung und Plakoglobin-Phosphorylierung verstärkt (Sigmund et al. 2023).

In meinen Experimenten induzierte mAK23 eine Dsg3-Depletion in hTert-WT und Flot-defizienten Zellen. In Übereinstimmung mit Sigmund et al. stellte ich keine Erhöhung des Dsg3-Spiegels unter dem Einfluss von Forskolin/Rolipram fest, unabhängig von der Flotillin-Expression. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass desmosomale Cadherine in desmosomalen als auch in extra-desmosomalen Pools an der Plasmamembran vorliegen. Da der cAMP-Signalweg primär die Stabilität bereits assemblierten Desmosomen fördert, könnte der extra-desmosomale Pool unbeeinflusst bleiben (Völlner et al. 2016). Zudem habe ich untersucht, ob ein Einfluss auf die Flot-Expression besteht. In den hTert-WT-Zellen war unter Behandlung mit mAK23 eine

Reduktion der Flot2-Expression zu beobachten. Flotilline stabilisieren die desmosomale Adhäsion und ihr Fehlen fördert die dynaminabhängige Endozytose sowie den lysosomalen Abbau von Dsg3. Die beobachtete Reduktion von Flot2 könnte daher mit dem Mechanismus der Dsg3-Depletion in Zusammenhang stehen, da Flot2 eine entscheidende Rolle bei der Stabilisierung der desmosomalen Adhäsion spielt (Völlner et al. 2016). Unter gleichzeitiger Forskolin/Rolipram-Behandlung und mAK23 zeigte sich in hTert-WT-Keratinocyten zudem eine Reduktion der Flot1- und Flot2-Spiegel, was darauf hindeutet, dass cAMP-modulierende Substanzen auch hier vorrangig auf den desmosomalen Flotillin-Pool wirken könnten.

Da Flotilline als Oligomere vorliegen, beeinflusst die Reduktion von Flot2 ebenfalls den Flot1-Spiegel (Meister und Tikkanen 2014; Solis et al. 2007). Interessanterweise zeigten die Flot2-defizienten Zellen eine Tendenz zur erhöhten Flot1-Expression, wodurch die Zellen möglicherweise versuchen den Verlust von Flot2 unter mAK23-Behandlung zu kompensieren. Dieser kompensatorische Mechanismus scheint jedoch durch die zusätzliche Erhöhung des cAMP-Spiegels gestört zu werden. In den Experimenten mit den Flot2-defizienten hTert-Zellen konnte keine statistisch signifikante Veränderung der Dsg- und Flot1-Proteinlevels festgestellt werden, obwohl in den WB eine Dsg3-Reduktion und Erhöhung der Flot1-Expression unter Behandlung mit mAK23 zu erkennen war. Die mangelnde Signifikanz könnte durch die hohe Variabilität der Ergebnisse erklärt werden.

In meinen Experimenten mit den HaCaT-WT-Zellen war eine höhere Konzentration an Forskolin/Rolipram erforderlich, um signifikante, protektive Effekte mit cAMP zu erzielen. Dies könnte erklären, warum keine signifikanten Veränderungen der Dsg- und Flot-Proteinlevel festgestellt wurden. Zudem zeigte sich eine hohe Variabilität der Ergebnisse, sodass mehrere Wiederholungen notwendig waren. Diese Variabilität könnte durch Unterschiede in den Zellantworten oder experimentelle Bedingungen bedingt sein und unterstreicht die Notwendigkeit standardisierter Versuchsbedingungen für reproduzierbare Ergebnisse. Die Studie von Spindler et al. zeigte, dass die Dsg3-Depletion und der Verlust der Dsg3-Färbung in HaCaT-Zellen, die für 3 Tage in einem hochcalciumhaltigen Medium inkubiert wurden, prominent waren, jedoch weniger ausgeprägt in HaCaT-Kulturen nach 8 Tagen (Spindler et al. 2011).

Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse die zentrale Rolle von Dsg3 und Flotillinen für die Zell-Zell-Adhäsion, während cAMP-modulierenden Substanzen wie Forskolin/Rolipram keinen signifikanten Einfluss auf die durch mAK23 induzierten

Proteinspiegelveränderungen hatten. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die spezifischen Mechanismen der Proteindepletion sowie die spezifischen Wirkungen der Substanzen auf Cadherine und Flotilline zu klären.

5.4 Flot2 ist obligatorisch für den protektiven cAMP-Mechanismus im Zusammenhang mit dem durch mAK23 induzierten Verlust der Zell-Zell-Adhäsion in hTert- und HaCaT-Keratinocyten

Frühere Studien haben gezeigt, dass eine reduzierte Expression von Flot1 und Flot2, induziert durch zielspezifische *small interfering* RNA (siRNA), mit einem Verlust der desmosomalen Adhäsion einhergeht. Der Adhäsionsverlust, der durch die Flotillin-Reduktion in der HaCaT-Zelllinie verursacht wird, war vergleichbar mit dem Adhäsionsverlust, der durch pathogene PV-IgG-Antikörper im Rahmen von PV hervorgerufen wird. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Flot2 direkt mit Dsg1 und Dsg3 interagiert, wodurch die Stabilisierung der Desmosomen an der Plasmamembran unterstützt wird (Völlner et al. 2016).

Mithilfe neu generierter hTert- und HaCaT-Zelllinien mit vollständiger Flot1- oder Flot2-Defizienz konnte ich die bisherigen Ergebnisse nur teilweise reproduzieren. Während das Fehlen von Flot2 erwartungsgemäß zu einer signifikanten Reduktion der desmosomalen Adhäsion führte, zeigte sich beim vollständigen Fehlen von Flot1 kein signifikanter Effekt. Diese Diskrepanz lässt sich möglicherweise durch Unterschiede in der Methodik erklären. Die siRNA-Methode ermöglicht eine temporäre schnelle und teilweise Reduktion der Genexpression, während die CRISPR/Cas9-Technologie eine dauerhafte und vollständige Unterdrückung des Zielgens bewirkt. Ein dauerhafter Proteinverlust kann bestimmte Kompensationsmechanismen aktivieren, welche die experimentellen Ergebnisse beeinflussen können (Wang et al. 2018).

Um zu prüfen, ob Flotilline eine zentrale Rolle im cAMP-vermittelten Schutzmechanismus spielen, untersuchte ich die Wirkung von Forskolin/Rolipram auf Flotillin-Knockout Keratinocyten. Das Ergebnis zeigte, dass der cAMP-Schutzmechanismus auch beim Fehlen von Flot1 oder Flot2 wirksam ist und möglicherweise bestehende Desmosomen stabilisieren kann. Dies könnte auf die Fähigkeit des cAMP-Signalwegs zurückzuführen sein, andere stabilisierende Mechanismen oder Proteine zu aktivieren, welche die Funktion von Flotilline teilweise kompensieren.

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, inwiefern Flot1 und Flot2 für den protektiven Effekt des cAMP-Signalwegs in dem mAK23 induziertem Adhäsionsverlust erforderlich ist. In hTert- und HaCaT-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter cAMP-Spiegel in Flot2-defizienten Zellen keinen protektiven Effekt gegenüber dem mAK23-induzierten Adhäsionsverlust vermittelt. Die Flot2-Knockout hTert-Zellen wiesen bereits unter Basalbedingungen eine höhere Grundfragmentierung auf als die Flot1-Knockout Zellen. Dies legt nahe, dass Flot2 für die Wirkung des cAMP-vermittelten Schutzmechanismus erforderlich ist. In den WB-Analysen zeigten die Flot2-Knockout hTert- und HaCaT-Zellen eine reduzierte Flot1-Expression. Dies deutet darauf hin, dass Flot1 ebenfalls eine unterstützende Rolle im Schutzmechanismus spielen könnte und nicht vollständig irrelevant für die cAMP-vermittelte Stabilisierung der Desmosomen ist. Während in Flot1-defizienten Zellen der protektive Effekt von Forskolin/Rolipram erhalten blieb, war dieser in Flot2-defizienten Zellen vollständig aufgehoben. Die Rolle von Flot2 scheint daher nicht nur strukturell an der Organisation der Desmosomen beteiligt zu sein, sondern möglicherweise auch funktionell an der Signaltransduktion innerhalb des cAMP-Signalwegs. Es ist bekannt, dass Flot2 eine wichtige Funktion bei der Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts im Rahmen von Wachstumsprozessen spielt (Amaddii et al. 2012; Banning et al. 2018; Neumann-Giesen et al. 2004, 2007). Es ist daher denkbar, dass Flot2 als Gerüstprotein fungiert, das die Organisation von Signalplattformen für cAMP-vermittelte Prozesse unterstützt. Da Flot2 direkt an die zytoplasmatische Domäne von Dsg3 bindet (Völlner et al. 2016), könnte Flot2 zusätzlich eine Funktion bei der Stabilisierung der Verankerung von Keratinfilamenten übernehmen, die durch cAMP-abhängige Prozesse reguliert wird.

Zusätzlich beeinflussen Flotilline als membranassoziierte Proteine auch den intrazellulären Proteintransport. Studien zeigten, dass Flotilline in Signalnetzwerke eingebunden sind, die das cAMP-Level regulieren. Beispielsweise beschreiben Amatya et al. eine Interaktion von Sorting Nexin 19 (SNX19) mit Caveolin-1 und Flot1 und untersuchten deren Einfluss auf die D1R-Signalübertragung. Die Ergebnisse zeigten, dass der D1R-Agonisten Fenoldopam (FEN) die Bindung von SNX19 an Flot1 und Caveolin-1 verstärken. Die Deletion der Bindungsmotive für Flot1 oder Caveolin-1 in SNX19 führte zu einer verminderten Kollokalisierung und einer reduzierten cAMP-Produktion nach FEN-Stimulation (Amatya et al. 2025). Auch Watanabe et al. zeigten, dass das humane Neuroglobin (Ngb) die Abnahme der cAMP-Konzentration unter oxidativem Stress hemmt, was zur Zellschutzfunktion beiträgt. Die Bindung von Ngb an Flot1

bewirkt die Hemmung von $G\alpha(i/o)$, sodass die durch den oxidativen Stress induzierte Reduktion von cAMP verhindert wird (Watanabe et al. 2012). Eine andere Studie konnte darstellen, dass Flotilline wichtig für die Aktivität der Phosphodiesterase-3B (PDE3B) sein könnte, da eine Ko-Elution von PDE3B mit Caveolae- und Lipid-Raft-Markern mittels Superose-6-Chromatographie nachgewiesen wurde (Nilsson et al. 2006).

Interessanterweise scheint Flot2 relevant für den protektiven cAMP-Mechanismus unter dem Einfluss von pathogenen anti-Dsg3 mAK23-Antikörpern zu sein. In Abwesenheit von mAK23 kann das erhöhte intrazelluläre cAMP-Level den Adhäsionsverlust von Flotillin-defizienten Zellen stabilisieren. Hypothetisch wird Flot2 als Brücke oder Anker für cAMP-abhängige Stabilisierungssignale funktionell notwendig, nur wenn Dsg3 direkt gestört wird, beispielsweise durch mAK23.

Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass Flotilline – insbesondere Flot2 – das cAMP-Level über die Interaktion mit dem cAMP-Signalweg, wie PKA, $G\alpha$, FEN oder PDE modulieren und somit eine Schlüsselrolle bei der Stabilisierung des Desmosomenkomplexes einnehmen. Um diese Hypothese zu bestätigen, sollten zukünftige Studien das cAMP-Level in Flotillin-defizienten Zellen quantitativ erfassen, beispielsweise mittels ELISA.

5.5 Bedeutung der Tyr-Phosphorylierung an Position 163 in Flot2 für die Aufrechterhaltung der Zellmonolayer-Stabilität

Die zentrale Bedeutung von Flot2 im cAMP-vermittelten Schutzmechanismus konnte durch die Untersuchung der Phosphorylierung an Tyr163 in Flot2 bestärkt werden. Bisher ist bekannt, dass PV-Antikörper verschiedene Signalwege aktivieren, wie EGFR und andere Kinasen, wie Src und p38MAPK (Bektas et al. 2013; Berkowitz et al. 2006; Chernyavsky et al. 2007). Flot2 wird durch den EGF phosphoryliert, insbesondere an der Tyrosinposition 163, was zur Endozytose von Flotillinen führt (Neumann-Giesen et al. 2007). Jedoch gibt es derzeit keinen Beleg, dass PV-Antikörper die Phosphorylierung von Flotillinen induzieren. Zur Untersuchung der Auswirkung der Phosphorylierung an Tyr163 wurde mit der Mutante Flot2-Y163F in HaCaT-Zellen gearbeitet.

Interessanterweise zeigte die HaCaT-Mutante Flot2-Y163F eine stark erhöhte Fragmentierung, unabhängig von der Behandlung, und deutlich höhere Fragmentierungsraten als HaCaT WT und HaCaT mit überexprimierten Flot2-WT. Dennoch konnte klar gezeigt werden, dass die Y163F-Mutante einen verstärkten

Adhäsionsverlust aufwies, der über den Effekt des Flot2-Knockouts hinausgeht und nicht durch Forskolin/Rolipram reduziert werden konnte. Eine Erklärung für den dominant-negativen Effekt der Punktmutation an Position 163 könnte sein, dass die Phosphorylierung an Y163 für die Funktion von Flot2 als Gerüstprotein oder Signalmodulator entscheidend sein kann, der über einen einfachen Funktionsverlust hinausgeht (Kwiatkowska et al. 2020; Neumann-Giesen et al. 2007; Wisniewski et al. 2023). Eine Hypothese könnte sein, dass die Mutation spezifische Interaktionen von Flot2 mit cAMP-regulierten Effektoren wie PKA oder PDE4 stören, oder sie beeinträchtigt die cAMP-Produktion selbst. Zwar ist bekannt, dass Flot2 an der Organisation von Signalplattformen beteiligt ist, aber es wurde bisher keine direkte Beeinträchtigung von cAMP-regulierten Effekten wie PKA, PDE4 oder der cAMP-Produktion selbst nachgewiesen. Dies könnte zu einer gravierenderen Beeinträchtigung der basalen Stabilisierung der Zell-Zell-Adhäsion führen als ein vollständiges Fehlen von Flot2.

Ein weiterer Aspekt ist die mögliche Destabilisierung des Keratinzytoskeletts. Die Mutation könnte die Fähigkeit von Flot2, Signalplattformen für cAMP-abhängige Prozesse zu organisieren, erheblich beeinträchtigen. Flot2 ist bekannt dafür, die Interaktion mit Desmosomenproteinen zu modulieren und die Verankerung von Keratinfilamenten zu unterstützen (Völlner et al. 2016). Der Verlust dieser Funktionen könnte erklären, warum die Grundfragmentierung bei der Y163F-Mutante höher ist als im Flot2-Knockout. Zusätzlich könnte die Mutation die Bildung dysfunktionaler Proteinaggregate fördern oder falsche Signalwege aktivieren, was zu toxischen Effekten führt.

Zusammenfassend unterscheiden sich die Effekte des vollständigen Verlusts von Flot2 im Flot2-Knockout und der Y163F-Mutante deutlich. Diese Mutation könnte sowohl einen Funktionsverlust darstellen als auch toxische Effekte hervorrufen, was sie zu einem besonders interessanten Modell macht, um die Signalmodulations- und Gerüstfunktionen von Flot2 zu untersuchen. Dies unterstreicht die Notwendigkeit weiterer Studien, um die spezifischen Mechanismen zu klären, durch die die Y163F-Mutation die Stabilität der Zell-Zell-Adhäsion und die Signaltransduktion beeinflusst.

5.6 Mögliche Rolle von Flotillinen im cAMP-vermittelten Schutzmechanismus

Um den Zusammenhang zwischen Flotillinen und dem protektiven cAMP-Mechanismus im Kontext des durch PV-IgG induzierten Zelladhäsionsverlustes zu verstehen, sollte zunächst die Pathogenese von Pemphigus und die beteiligten Schlüsselsignalwege betrachtet werden (**Abb. 31**). Die wichtigsten pathogenen PV-Autoantikörper sind anti-Dsg3 und anti-Dsg1, welche an die EC-1-Domäne von Dsg3 und/oder Dsg1 binden und dadurch deren Endozytose bewirken (Kasperkiewicz et al. 2017). Dies führt zusammen mit der Desorganisation der Desmosomen zu einer Retraktion der Keratinfilamente von der Zelloberfläche in Richtung Zellkern (Hu et al. 1978). Allerdings reicht diese direkte, sterische Hemmung allein nicht aus, um einen vollständigen Adhäsionsverlust der Keratinozyten zu verursachen. Vielmehr ist anerkannt, dass sowohl die direkte Blockierung der Dsg-Interaktion durch Autoantikörper als auch die induzierten Signalwege zur Regulation der Zelladhäsion beitragen (Schmitt und Waschke 2021).

Ein zentraler Bestandteil in der Pathogenese des Pemphigus ist p38MAPK, welches durch Bindung von PV-IgG in Keratinozyten *in vitro* und *in vivo* durch Phosphorylierung an Threonin 180 und Tyrosin 182 aktiviert wird (Berkowitz et al. 2006). Anschließend aktiviert p38MAPK über die MAP-Kinase-aktivierte Proteinkinase 2 (MAPKAPK2) das Hitzeschockprotein 27 (HSP27), das mit dem Keratin-Zytoskelett assoziiert ist und sowohl das Aktin- als auch das Intermediärfilamentsystem reguliert (Berkowitz et al. 2005). Experimente haben gezeigt, dass die spezifische Hemmung von p38MAPK *in vitro*, *in vivo* und *ex vivo* den Adhäsionsverlust deutlich reduziert (Berkowitz et al. 2006; Egu et al. 2017).

Ein weiteres Schüsselmolekül im komplexen Signalnetzwerk ist der epidermale EGFR. Der EGFR kann ligandengebunden, wie z.B. durch EGF oder transformierender Wachstumsfaktor (TGF), als auch ligandenunabhängig, wie z.B. durch PV-IgG oder mAK23, aktiviert werden. Letztere Aktivierung erfolgt über die p38MAPK- und Src-Signalwege (Bektas et al. 2013; Biscardi et al. 1999; Chernyavsky et al. 2007; Oda et al. 2005; Schulze et al. 2012; Walter et al. 2019). EGFR fördert die Endozytose von Dsg3 und PG, was zu einer Schwächung der Zelladhäsion führt (Bektas et al. 2013). Zusätzlich ist der EGFR-abhängige Ras/Raf/Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase (MEK)/extrazellulär regulierten Kinasen (ERK)-Signalweg besonders für die PV-Pathogenese relevant, da ERK1/2 eine Endozytose von Dsg3, die Retraktion der Keratinfilamente und

den Verlust der Zell-Zell-Adhäsion bewirken, was zur Blasenbildung und Akantholyse führt (Schlögl et al. 2018; Walter et al. 2019). Die Hemmung von EGFR und ERK1/2 konnte die durch PV-IgG induzierte Blasenbildung verhindern, was die Bedeutung dieses Signalwegs in der Pathogenese des Pemphigus unterstreicht (Egu et al. 2024).

Neben diesen pathogenen Mechanismen existieren jedoch auch protektive Signalwege. Studien zeigen, dass PV-IgG die cAMP-Produktion in Keratinozyten erhöhen kann. Eine gezielte pharmakologische Erhöhung von cAMP hemmt *in vitro* die PV-IgG induzierte Akantholyse und reduziert die Hautblasenbildung in Mäusen *in vivo*. Dabei wirkt die durch cAMP aktivierte PKA schützend gegen die p38MAPK-Aktivierung (Spindler et al. 2010). Ein zweiter protektiver cAMP-Wirkmechanismus wurde bei der Apremilast-Anwendung, einem PDE4-Inhibitor, gezeigt. Die PKA-vermittelte Phosphorylierung von Plakoglobin an S665 bewirkt eine modulierende Verstärkung der Desmosomenadhäsion (Sigmund et al. 2023). Ebenfalls konnte die Studie von Barbier et al. zeigen, dass die Behandlung von Zellen mit einem nicht-hydrolysierbaren cAMP-Analogon, 8-(4-chlorophenylthio)-cAMP, die EGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung von zellulären Proteinen sowie die Aktivierung des EGFR verringerte. Diese Hemmung erfolgt durch die Aktivierung der cAMP-abhängigen PKA, die den EGFR an Serinresten phosphoryliert und dadurch seine Tyrosinkinaseaktivität und Signaltransduktion reduziert. Diese Ergebnisse wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bestätigt (Barbier et al. 1999; Waschke et al. 2025).

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, zu untersuchen, welche Rolle die Flotilline in dem Zusammenhang der zwei Theorien zum cAMP-Schutzmechanismus auf die bekannten Signalwege in der PV-Pathogenese spielen. Flotilline, die als Signalplattformen innerhalb spezialisierter Membrandomänen agieren, haben ein diverses Funktionsspektrum (Glebov et al. 2006; Solis et al. 2007). Das Protein Flot1 interagiert direkt mit dem EGFR und erleichtert dessen Clusterbildung sowie Aktivierung, was zur Aktivierung nachgeschalteter MAP-Kinase-Signalwege wie ERK1/2 führt (Amaddii et al. 2012). Flot1 bildet Komplexe mit CRAF, MEK1, ERK und KSR1 und ist entscheidend für die Aktivierung der MAP-Kinase-Signalkaskade. Der Knockdown von Flot1 reduziert die EGFR-Aktivierung und führt zu einer ineffizienten Aktivierung nachgeschalteter MAP-Kinase-Signalkaskade, einschließlich ERK1/2 in HeLa-Zellen (Amaddii et al. 2012). Interessanterweise zeigt sich in Flot2-KO-Mäusen eine verstärkte Aktivierung von ERK1/2, was auf eine regulierende Rolle von Flot2 bei der Aktivierung dieses Signalwegs hindeutet (Banning et al. 2014a). In meinen Experimenten zeigte die Erhöhung des

cAMP-Spiegels in Flot2-KO-Zellen keine protektive Wirkung. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass Flot2 entscheidend als negativer Regulator der MAP-Kinase-Signalkaskade, besonders von ERK1/2, fungiert (Banning et al. 2014b). Es ist bekannt, dass ERK2 die PDE4 an S579 phosphoryliert, um eine verstärkte Degradation von cAMP zu AMP zu bewirken (Hoffmann et al. 1999). In den Flot2-KO-Zellen könnte daher die Überaktivität von ERK1/2 den Effekt von cAMP eliminieren, indem der Botenstoff vermehrt abgebaut wird. Um diese Theorie zu überprüfen, wären ELISA-Experimente zur Messung der cAMP-Konzentration in Flot2-KO-Zellen notwendig. Zusätzlich könnten Flotilline auch entscheidend bei der Regulation der p38MAPK-Signalkaskade sein. Daher wäre es sinnvoll, die Kinase-Aktivität und Expression in Flotillin-Knockout-Zellen unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen.

In meinen Untersuchungen zeigten HaCaT-Keratinocyten mit einer Mutation an Tyrosin 163 in Flot2 einen dominant-negativen Effekt, was darauf hindeutet, dass die physiologische Funktion von Flot2 und die EGFR-vermittelte Signaltransduktion beeinträchtigt sind. Flot2 spielt eine wichtige Rolle bei der Organisation von Signalplattformen in lipidreichen Membrandomänen (Lipid Rafts) und bei der Regulation der EGFR-Aktivierung und -Degradation. Eine Mutation an Tyrosin 163 könnte daher die Interaktion von Flot2 mit weiteren Signalproteinen stören und zu einer veränderten Zellantwort führen.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Flotilline, insbesondere Flot2, eine zentrale Rolle in der Regulation des cAMP-Schutzmechanismus im Rahmen der PV-Pathogenese spielen (**Abb. 31**). Während Flot1 als Verstärker der EGFR-Aktivierung fungiert, reguliert Flot2 negativ die ERK1/2-Aktivierung. Eine Dysregulation von Flot2 könnte die protektive Wirkung von cAMP aufheben, indem eine verstärkte PDE4-Aktivität den cAMP-Spiegel senkt. Zukünftige Untersuchungen zur Interaktion zwischen Flotillinen, cAMP und den relevanten Signalwegen könnten neue therapeutische Ansatzpunkte zur Modulation der Pemphigus-Pathogenese liefern.

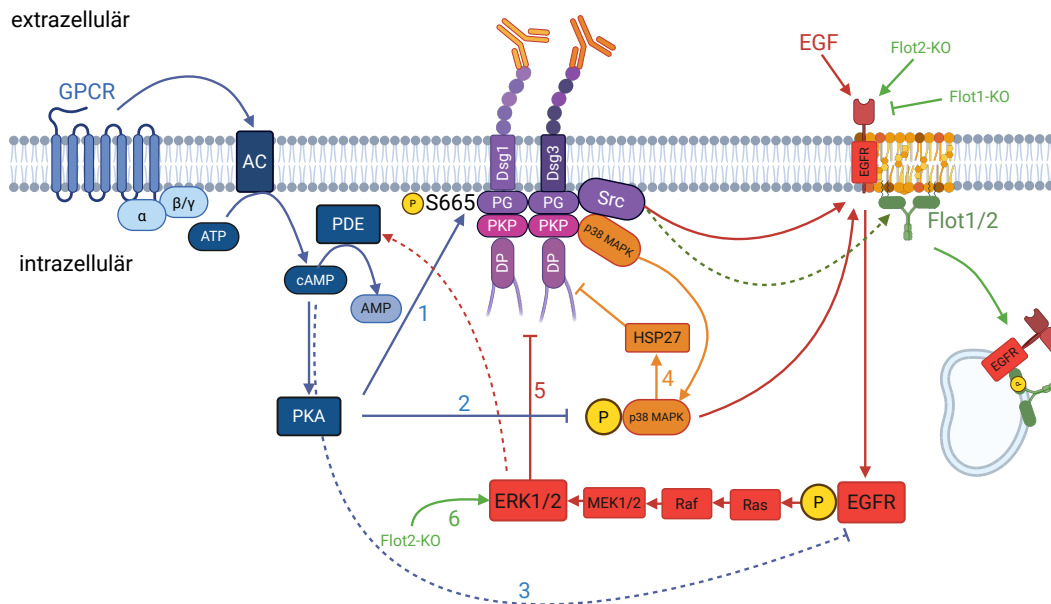


Abbildung 31: Hypothetisches Modell für die modulatorische Rolle der Flotilline im cAMP-vermittelten Schutzmechanismus (modifiziert nach Schmitt et al. 2021 und erstellt mit BioRender (<https://BioRender.com>))

Die AC produziert cAMP aus dem intrazellulären ATP. Der Botenstoff cAMP aktiviert die PKA, die über zwei Wege die Zelladhäsion verstärken kann und vor der Wirkung der PV-IgG schützt. **(1)** Plakoglobin kann durch S665-Phosphorylierung modulierend verstärkt werden. **(2)** Zusätzlich kann die PKA die Aktivierung vom p38MAPK inhibieren, sodass die Intermediärfilamente nicht umgebaut werden können. Die PV-IgG binden an die EC1-Domäne von Dsg1 und Dsg3, sodass intrazellulär der p38MAPK- (orange) und EGFR-Signalwege (rot) aktiviert werden. **(3)** Ebenfalls kann das erhöhte cAMP die Phosphorylierung von EGFR inhibieren, wodurch die Aktivierung der MAPK-Kaskade über ERK1/2 verhindert wird. **(4)** Die p38MAPK wird durch Phosphorylierung aktiviert und wirkt über HSP27 inhibitorisch auf die Intermediärfilamente, sodass es zum Adhäsionsverlust kommt. **(5)** Der EGFR wird ebenfalls durch Phosphorylierung aktiviert und bewirkt über die Ras/Raf/MEK1/2/ERK1/2-Signalkaskade schwächend auf die Zelladhäsion. **(6)** Die Flotilline (grün) sind über die zytosolische Seite der Lipid Rafts assoziiert und interagieren mit dem EGFR. Der Prozess beginnt mit der Bindung von epidermalemem Wachstumfaktor (EGF) an den EGFR, was zur Dimerisierung und Autophosphorylierung des Rezeptors führt. Diese Autophosphorylierung aktiviert nachfolgend Src-Kinase, die dann Flotillin an spezifischen Tyrosinresten phosphoryliert. Diese Phosphorylierung ermöglicht die Assoziation von Flotillin mit Clathrin-

beschichteten Gruben und die nachfolgende Endozytose von Flotillin mit dem assoziierten EGFR. Bei Flot1-KO kommt es zur Hemmung des EGFR-Signalweges, während Flot2-KO eine gegensätzliche Überaktivierung von ERK1/2 induziert.

5.7 Ausblick

Durch die Etablierung eines vollständigen hTert Flot2-Knockouts kann die Rolle von Flot2 im protektiven cAMP-abhängigen Signalmechanismus weiter untersucht werden. Zur gezielten Analyse der Phosphorylierung von Flot2 an Tyr163 könnten, wie für die HaCaT-Zelllinie, hTert Flot2-KO-Zelllinien mit überexprimierten Flot2-WT-EGFP und Flot2-Y163F-EGFP generiert werden. Diese Untersuchungen würden es ermöglichen, die funktionellen Erkenntnisse aus HaCaT-Zellen auch in hTert-Zellen zu bestätigen und vergleichend zu validieren.

Da frühere Studien mit Hemmung der PKA mit H89 gezeigt haben, dass der cAMP-Mechanismus abhängig von der PKA ist (Sigmund et al. 2023), könnte untersucht werden, ob eine indirekte oder direkte Interaktion zwischen Flot2 und PKA besteht. Die PKA wird durch einen erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegel aktiviert und phosphoryliert unter anderem das Serin an Position 665 von Plakoglobin, der ein zentraler Bestandteil der äußeren Plaqueregion der Desmosomen darstellt. Die Phosphorylierung von S665 fördert nachweislich die Insertion der Keratinfilamente in die Plaque und verstärkt somit die mechanische Stabilität des Zell-Zell-Kontakts. Zudem wurde gezeigt, dass cAMP die Assemblierung von Desmoplakin in die desmosomale Plaque stimuliert (Sigmund et al. 2023). Daher sollte der Einfluss von PKA und EPAC für den cAMP-vermittelten Schutzmechanismus weiter untersucht werden. H89 ist ein bekannter Inhibitor der PKA, der jedoch Off-Target-Effekte zeigt, weshalb es entscheidend ist, die Spezifität der Inhibition weiter zu untersuchen (Inoue et al. 2013; Limbutara et al. 2019). Eine Möglichkeit wäre der Einsatz spezifischerer Inhibitoren oder genetischer Methoden wie siRNA oder CRISPR, um PKA gezielt auszuschalten und somit die Rolle von EPAC klarer zu differenzieren. Falls der cAMP-Mechanismus trotz PKA-Hemmung weiterhin funktioniert, könnte EPAC ein alternativer cAMP-Effektor sein. Um seine Beteiligung zu klären, könnten spezifische EPAC-Aktivatoren, wie 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP oder gezielte Inhibitoren eingesetzt werden (Brown et al. 2014). Dies würde helfen, die Funktion von EPAC unabhängig von PKA zu validieren. Ein weiterer Downstream-Signalweg ist der Transkriptionsfaktor CREB, der durch PKA an Ser133 phosphoryliert

wird (Grewal et al. 2000). Die Analyse der CREB-Phosphorylierung wäre sinnvoll, um festzustellen, ob dieser als Downstream-Ziel eine zentrale Funktion hat. Darüber hinaus könnten weitere Zielproteine von PKA oder EPAC identifiziert werden, um potenzielle neue Signalwege zu entdecken (Sigmund et al. 2025).

Außerdem sollten neben Tyr163 auch weitere Tyrosinreste in Flot2 untersucht werden, ob diese für die Signalweiterleitung und die Regulation der Zelladhäsion relevant sind. Flot2 besitzt insgesamt acht Tyrosinreste (Y24, Y27, Y124, Y158, Y163, Y241, Y348, Y358), die nach Stimulation mit epidermalemem Wachstumfaktor (EGF) durch Src-abhängige Signalwege phosphoryliert werden können (Neumann-Giesen et al. 2007). Der genaue Mechanismus, ob Src direkt an Flot2 bindet oder ob Adapterproteine wie CAP (*c-Cbl-associated protein*) oder Vinexin beteiligt sind, ist bislang nicht vollständig aufgeklärt.

Die Proteine CAP und Vinexin könnten durch die Vermittlung von Rekrutierung von Src oder anderen Kinasen Signalwege regulieren, die für die Dynamik der Desmosomen essenziell sind, wie z.B. die Endozytose von desmosomalen Cadherinen wie Dsg1 und Dsg3 (Ribon et al. 1998). Interessanterweise könnte Vinexin indirekt die Produktion von cAMP und die Signaltransduktion beeinflussen, indem es Src und andere Signalmoleküle in Lipid Rafts rekrutiert. Dies könnte die Funktion von Adenylylcyclasen, G-Proteingekoppelten Rezeptoren (GPCRs) und anderen cAMP-regulierten Prozessen wie der Aktivität von PKA und der Regulation von Zelladhäsion stärken.

Zur weiteren Charakterisierung sollten ELISA-Messungen in Flot-defizienten hTert und HaCaT-Zellen durchgeführt werden, um zu analysieren, ob die Flot-Expression gegebenenfalls das cAMP-Level beeinflusst. Parallel könnte überprüft werden, ob unterschiedliche Konzentrationen von Forskolin und Rolipram einen variablen Einfluss auf cAMP-abhängige Prozesse haben. Sigmund et al. konnten zeigen, dass Konzentrationen von 1 bis 100 μM Apremilast in HaCaT-Zellen signifikante Wirkungen auslösen können, ohne toxisch auf die Zellen zu wirken (Sigmund et al. 2023).

Falls in Flot-defizienten Zellen eine reduzierte cAMP-Konzentration nachgewiesen wird, könnte dies darauf hindeuten, dass Flotilline Einfluss auf die Regulation der cAMP-Produktion haben könnte. Um den Zusammenhang zwischen Flot2 und cAMP weiter zu bestätigen, könnte Apremilast als spezifischer PDE4-Inhibitor herangezogen werden. Apremilast ist bereits für die klinischen Indikationen von Psoriasis, Psoriasis Arthritis und Morbus Behçet zugelassen (Pincelli et al. 2018; Sigmund et al. 2023; Torres und Puig 2018).

Als weiterer Aspekt sollten der desmosomale und extradesmosomale Pool der Desmosome getrennt untersucht werden, um die Theorie zu bestätigen, dass die anti-Dsg3 Antikörper und cAMP-modulierenden Substanzen allein auf die bereits assemblierenden Desmosomen wirken (Völlner et al. 2016).

Zusammenfassend könnte Flot2 eine bisher unterschätzte Rolle in der cAMP-Signaltransduktion und der Desmosomen-Dynamik spielen, die sowohl für die normale Zelladhäsion als auch für die Pathogenese von Erkrankungen wie PV von Bedeutung ist. Die genaue Funktion von Y163 in Flot2 und die damit verbundenen Signalwege könnten neue therapeutische Ansätze eröffnen.

6 Zusammenfassung

Pemphigus vulgaris ist eine seltene Autoimmunerkrankung, die durch IgG-Autoantikörper gegen desmosomale Proteine, hauptsächlich Desmoglein (Dsg) 3 und Dsg1, verursacht wird. Dies führt zu Blasenbildung in der Epidermis und/oder der Schleimhaut. Die Lipid-Raft-assoziierten Flotilline, zentrale Regulatoren der Signaltransduktion, interagieren direkt mit Dsg1 und Dsg3. Die Depletion von Flotillinen beeinträchtigt die desmosomale Adhäsion und führt zu einer PV-ähnlichen Dsg3-Lokalisation in Keratinozyten. Kürzlich wurde gezeigt, dass ein erhöhter cAMP-Spiegel vor der induzierten desmosomalen Dissoziation durch pathogene Antikörper schützen kann. In der vorliegenden Arbeit war es ein Ziel zu analysieren, ob Flotilline an dem cAMP vermittelten Schutzmechanismus beteiligt sind.

Zunächst zeigte ich, dass die Behandlung von hTert- und HaCaT-Keratinozyten mit Forskolin/Rolipram den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen und die Zellmonolayer vor der induzierten Dissoziation durch mAK23, ein pathogener anti-Dsg3-Antikörper, schützt. Interessanterweise verhinderte die Behandlung mit Forskolin/Rolipram nicht den durch mAK23 induzierten Verlust der Dsg3-Expression in hTert-Zellen. Zur Aufklärung der Rolle der Flotilline im cAMP-vermittelten Schutzmechanismus wurden hTert-Zelllinien mit fehlender Flotillin(Flot)1- oder Flot2-Expression generiert. In den Flot1- und Flot2-Knockout-Zelllinien war die Monolayer-Dissoziation verstärkt. Auch ohne pathogene Antikörper reduzierte das erhöhte cAMP die Fragmentierung unabhängig von der Flotillin-Expression. Nach mAK23-Stimulation war der schützende Effekt nur in WT- und Flot1-, nicht jedoch in Flot2-defizienten Zellen nachweisbar.

Auch Flot2-defiziente HaCaT-Zellen zeigten eine beeinträchtigte Zelladhäsion, die nur ohne mAK23 durch Forskolin/Rolipram teilweise wiederhergestellt werden konnte. Die Überexpression des Flot2-Tyr163Phe-Mutanten in HaCaT-Zellen zeigte einen dominant-negativen Effekt. Dies spricht für die Bedeutung der Flot2-Phosphorylierung bei der cAMP-abhängigen Stabilisierung der Zelladhäsion.

Diese Ergebnisse unterstreichen die zentrale Rolle von Flot2 im cAMP-abhängigen Schutz der Keratinozytenadhäsion. Mutationen in Flot2 können diesen Mechanismus stören. Zukünftige Studien sollten die molekularen Interaktionen zwischen Flot2, dem cAMP-Signalweg und desmosomalen Komponenten weiter aufklären, um therapeutische Ansätze für PV und andere Erkrankungen mit gestörter Zelladhäsion zu entwickeln.

7 Summary

Pemphigus vulgaris is a rare autoimmune disease caused by IgG autoantibodies targeting desmosomal proteins, mainly desmoglein (Dsg) 3 and Dsg1, leading to blister formation in the epidermis and/or mucosal membrane. The raft-associated flotillins are regulators of signal transduction, and can directly interact with Dsg1 and 3. Their depletion impairs desmosomal adhesion, resulting in PV-like localization of Dsg3 in human keratinocytes. Recently, it has been shown that elevated cAMP can protect keratinocytes from dissociation induced by pathogenic antibodies. In this study, I aimed to analyze whether flotillins are involved in the protective mechanism mediated by cAMP.

Initially, I could show that increasing cellular cAMP levels through forskolin/rolipram protects hTert and HaCaT keratinocyte monolayers from dissociation induced by the pathogenic anti-Dsg3 antibody mAK23. Interestingly, the treatment with forskolin/rolipram failed to prevent the mAK23-induced loss of Dsg3 expression in hTert cells. To elucidate the role of flotillins in the cAMP-mediated protective mechanism, hTert cells with knockout of flotillin (Flot)1 or Flot2 were generated. The absence of Flot1 or Flot2 lead to a pronounced monolayer dissociation, even without a pathogenic antibody treatment, and the elevated cAMP reduced the fragmentation independent on Flot expression. The treatment with mAK23 antibodies induced a stronger fragmentation in WT, Flot1 or Flot2 knockout hTert keratinocytes. Elevated cAMP level partially rescued the pathogenic effect in WT and Flot1, but not in Flot2 knockout cells.

Consistently, Flot2-deficient HaCaT cells also exhibited a severely impaired cell adhesion, which could be partially restored by forskolin/rolipram only in the absence of pathogenic anti-Dsg3 antibodies. Furthermore, in HaCaT cells overexpressing Flot2 Tyr163Phe mutant showed a dominant-negative effect, suggesting that phosphorylation of Flot2 is critical for cAMP-dependent stabilization of cell adhesion and that dysregulation of this process may impair this protective mechanism.

These findings emphasize the pivotal role of Flot2 in the cAMP-mediated stabilization of keratinocyte adhesion and show that Flot2 mutations can significantly alter this mechanism. Future studies should aim to further elucidate the molecular interactions between Flot2, cAMP signaling, and desmosomal components to identify potential therapeutic approaches for Pemphigus vulgaris and other disorders associated with defective cell adhesion.

8 Verzeichnis

8.1 Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
AC	Adenylatcyclase
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
AF	Alexa Fluor
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
Ca ²⁺	Calciumion
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaMK	Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase
cAMP	Cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
Cas	CRISPR-assoziierte Gene
CD	cluster of differentiation
CNG	<i>Cyclic Nucleotide gated</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CREB	cAMP response element-binding protein
CRISPR	clustered regularly interapaced short palindromic repeats
Cys	Cystein
DAPI	Roti®-Mount FluorCARE 4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP	Desmoplakin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
Dsc	Desmocollin
Dsg	Desmoglein
DTD	<i>desmoglein terminal domain</i> , Desmoglein-spezifische terminale Domäne
DTT	Dithiothreitol
EA	<i>extracelullar anchor domain</i>
EC	extrazelluläre Cadherindomäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPAC	<i>exchange protein activated by cAMP</i>
ERK	extrazellulär regulierten Kinase
et al.	et alteri
F	Forskolin
FBS	Fötale Kälberserum
Flot	Flotilline
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Gunanosindiphosphat
GEF	Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor
Gly	Glycin
GPCR	G-Protein-gekoppelten Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O	Wasser
HaCaT	Spontan immortalisierte humane Keratinozyten
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HCN-Kanäle	Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
hTert	Immortalisierte humane Keratinozyten
IA	<i>intracellular anchor</i>
ICS	<i>intracellular cadherin-like sequence</i>
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IPL	<i>intracellular proline-rich linker domain</i>
JNK	c-Jun-N-Terminale Kinase
kDa	Kilodalton
KGM 2	Keratinocyte Growth Medium 2
Ktrl	Kontroll
KO	Knockout
M	Mol
MAPK	Mitogen-activated protein kinase

Mg ²⁺	Magnesiumion
mM	Millimol
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren
NP-40	Nonoxinol-P40
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
PDE	Phosphodiesterase
PF	Pemphigus foliaceus
PG	Plakoglobin
pH	Potential Hydrogenii
PI	Proteinase Inhibitor Cocktail
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PKP	Plakophilin
PLC	Phospholipase C
PV	Pemphigus vulgaris
R	Rolipram
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RUD	<i>reapeated-unit domains</i> , Wiederholungseinheiten-Domänen
S	Serin
Scr	Tyrosinkinase Scr
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPFH	Stomatin-Prohibitin-Flotillin-Protein-Superfamilie
TBST	Tris-buffered saline Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TM	<i>transmembrane domain</i>

Tris HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
Tyr	Tyrosin
U	Einheiten
VE	vaskulär endothelial
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
ZO	Zonula occludens

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der Geräte und Materialien	25
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	26
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Puffer	27
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten selbstgemischten Puffer mit Zusammensetzung	29
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Enzyme.....	30
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Antibiotika.....	30
Tabelle 7: Auflistung der verwendeten primären Antikörper	31
Tabelle 8: Auflistung der verwendeten sekundären Antikörper	31
Tabelle 9: Zelllinien.....	32
Tabelle 10: Nährmedien	32
Tabelle 11: Computerprogramme	33

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Strukturkomponenten des Desmosoms (modifiziert nach Delva et al. 2009 und erstellt mit BioRender (https://BioRender.com))	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung der desmosomalen Cadherine (modifiziert nach Getsios et al. 2004 und erstellt mit BioRender (https://BioRender.com))	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Aufbaus der Epidermis und der durch Autoantikörper induzierten Akantholyse (modifiziert nach Wascke et al 2008 und erstellt mit BioRender (https://BioRender.com))	8
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Dsg-Kompensationstheorie (modifiziert nach Amagai & Stanley, 1999).	11
Abbildung 5: Strukturaufbau der Flotilline (modifiziert nach Browman et al 2007 und erstellt mit BioRender (https://BioRender.com))	16
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Signaltransduktionsweges von cAMP (modifiziert nach Sassone-Corsi et al. 2012 und erstellt mit BioRender (https://BioRender.com))	21
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Gewinnung von Einzelzellklonen (erstellt mit BioRender (https://BioRender.com))	38
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Monolayer-Dissoziationsassay (erstellt mit BioRender (https://BioRender.com))	40
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Affinitätschromatographie	45
Abbildung 10: Nachweis von Flot-Expression in hTert-Keratinocyten mittels WB.	49
Abbildung 11: Nachweis von Flot-Expression in hTert-Keratinocyten mittels IF.	51
Abbildung 12: Expression von Flot in hTert Flot2-KO- und Flot1/2-KO-Pools.	52
Abbildung 13: Validierung der Flot-Expression in hTert Flot2-Knockout-Einzelzellklonen.	53
Abbildung 14: Validierung der Flot-Expression in hTert Flot1/2-Knockout-Einzelzellklonen.	53
Abbildung 15: Charakterisierung der endgültigen hTert WT-, Flot1-KO- und Flot2-KO-Keratinocytenklonen.	55
Abbildung 16: Charakterisierung der Flotillin-Expression in HaCaT-Zelllinien.	56
Abbildung 17: ELISA-Nachweis der Erhöhung des cAMP-Levels nach Behandlung mit Forskolin/Rolipram in hTert-Keratinocyten.	57

Abbildung 18: Protektiver Effekt von Forskolin/Rolipram auf die Monolayerstabilität von hTert-WT-Keratinocyten.	59
Abbildung 19: Effekt von Forskolin/Rolipram auf die Expression von Dsg und Flot in hTert-WT-Keratinocyten behandelt mit mAK23.....	61
Abbildung 20: Protektiver Effekt von Forskolin/Rolipram auf die Monolayerstabilität von HaCaT-WT-Keratinocyten.....	62
Abbildung 21: Effekt von mAK23 oder mAK23 mit Forskolin/Rolipram auf die Expression von Dsg und Flot in HaCaT-WT-Keratinocyten.....	63
Abbildung 22: Protektiver Effekt von Forskolin/Rolipram auf die Monolayerintegrität von Flot-KO hTert-Keratinocyten.	65
Abbildung 23: Effekt von Forskolin/Rolipram auf den mAK23 induzierten Verlust der Zell-Zell-Adhäsion in Flot-KO hTert-Keratinocyten.	67
Abbildung 24: Effekt von Forskolin/Rolipram auf die Expression von Dsg und Flot in Flot1-KO-Keratinocyten behandelt mit mAK23.....	68
Abbildung 25: Effekt von Forskolin/Rolipram auf die Expression von Dsg und Flot in Flot2-KO-Keratinocyten behandelt mit mAK23.....	70
Abbildung 26: Effekt von Forskolin/Rolipram auf den mAK23-induzierten Verlust der Zell-Zell-Adhäsion in Flot-KO HaCaT-Keratinocyten.	72
Abbildung 27: Validierung der Überexpression von Flot2-WT oder -Y163F-Mutante in HaCa Flot2-KO-Zellen.....	74
Abbildung 28: Effekt von Forskolin/Rolipram auf den mAK23-induzierten Verlust der Zell-Zell-Adhäsion in Flot2-Y163F-EGFP-überexprimierenden HaCaT-Zellen im Vergleich zu Flot2-WT-EGFP-überexprimierenden HaCaT.	75
Abbildung 29: Effekt von Forskolin/Rolipram auf den mAK23-induzierten Verlust der Zell-Zell-Adhäsion in Flot2-Y163F-EGFP-überexprimierenden HaCaT-Zellen im Vergleich zu HaCaT Flot2-KO.....	76
Abbildung 30: Effekt von Forskolin/Rolipram auf den mAK23-induzierten Verlust der Zell-Zell-Adhäsion in Flot2-Y163F-EGFP-überexprimierenden HaCaT-Zellen im Vergleich zu HaCaT-WT-Zellen.	77
Abbildung 31: Hypothetisches Modell für die modulatorische Rolle der Flotilline im cAMP-vermittelten Schutzmechanismus (modifiziert nach Schmitt et al. 2021 und erstellt mit BioRender (https://BioRender.com))	91

8.4 Literaturverzeichnis

- Ahmed, A. R., Carrozzo, M., Caux, F., Cirillo, N., Dmochowski, M., Alonso, A. E., et al. (2016). Monopathogenic vs multipathogenic explanations of pemphigus pathophysiology. *Experimental Dermatology*, 25(11), 839–846.
<https://doi.org/10.1111/exd.13106>
- Ahmed, A. R., Spigelman, M. D., Cavacini, L. A., & Posner, M. R. (2006). Treatment of pemphigus vulgaris with rituximab and intravenous immune globulin. *The New England journal of medicine*, 355(17), 1772–9.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa062930>
- Amaddii, M., Meister, M., Banning, A., Tomasovic, A., Mooz, J., Rajalingam, K., & Tikkanen, R. (2012). Flotillin-1/Reggie-2 protein plays dual role in activation of receptor-tyrosine kinase/mitogen-activated protein kinase signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 287(10), 7265–7278.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.287599>
- Amagai, Komai, Hashimoto, Shirakata, Hashimoto, Yamada, et al. (1999). Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3 for serodiagnosis of pemphigus. *British Journal of Dermatology*, 140(2), 351–357.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.1999.02752.x>
- Amagai, M. (1999). Autoimmunity against desmosomal cadherins in pemphigus. *Journal of Dermatological Science*, 20(2), 92–102. [https://doi.org/10.1016/S0923-1811\(99\)00016-X](https://doi.org/10.1016/S0923-1811(99)00016-X)
- Amagai, M., Klaus-Kovtun, V., & Stanley, J. R. (1991). Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell*, 67(5), 869–877. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90360-B](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90360-B)
- Amagai, M., & Stanley, J. R. (2012). Desmoglein as a target in skin disease and beyond. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(3), 776–784.
<https://doi.org/10.1038/jid.2011.390>
- Amatya, B., Polzin, J. Q. M., Villar, V. A. M., Yang, J., Konkalmatt, P., Wang, X., et al. (2025). SNX19 interacts with caveolin-1 and flotillin-1 to regulate D1R endocytosis and signaling. *Biomedicines*, 13(2), 481.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines13020481>
- Angst, B. D., Marcozzi, C., & Magee, A. I. (2001). The cadherin superfamily: Diversity in form and function. *Journal of Cell Science*, 114(4), 629–641.

- <https://doi.org/10.1242/jcs.114.4.629>
- Babuke, T., & Tikkanen, R. (2007). Dissecting the molecular function of reggie/flotillin proteins. *European Journal of Cell Biology*, *86*(9), 525–532.
<https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2007.03.003>
- Banning, A., Babuke, T., Kurrle, N., Meister, M., Ruonala, M. O., & Tikkanen, R. (2018). Flotillins regulate focal adhesions by interacting with α -actinin and by influencing the activation of focal adhesion kinase. *Cells*, *7*(4), 28.
<https://doi.org/10.3390/cells7040028>
- Banning, A., Kurrle, N., Meister, M., & Tikkanen, R. (2014a). Flotillins in receptor tyrosine kinase signaling and cancer. *Cells*, *3*(1), 129–149.
<https://doi.org/10.3390/cells3010129>
- Banning, A., Regenbrecht, C. R. A., & Tikkanen, R. (2014b). Increased activity of mitogen activated protein kinase pathway in flotillin-2 knockout mouse model. *Cellular Signalling*, *26*(2), 198–207.
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.11.001>
- Banning, A., Tomasovic, A., & Tikkanen, R. (2011). Functional aspects of membrane association of reggie/flotillin proteins. *Current Protein & Peptide Science*, *12*(8), 725–735. <https://doi.org/10.2174/138920311798841708>
- Barbier, A. J., Poppleton, H. M., Yigzaw, Y., Mullenix, J. B., Wiepz, G. J., Bertics, P. J., & Patel, T. B. (1999). Transmodulation of epidermal growth factor receptor function by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(20), 14067–14073. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.20.14067>
- Barnetson, R. S., & White, A. D. (1992). The use of corticosteroids in dermatological practice. *Medical Journal of Australia*, *156*(6), 428–431.
<https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1992.tb139850.x>
- Baroni, A., Buommino, E., De Gregorio, V., Ruocco, E., Ruocco, V., & Wolf, R. (2012). Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clinics in Dermatology*, *30*(3), 257–262.
<https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2011.08.007>
- Bazzi, H., & Christiano, A. M. (2007). Broken hearts, woolly hair, and tattered skin: when desmosomal adhesion goes awry. *Current Opinion in Cell Biology*, *19*(5), 515–520. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.08.001>
- Beckert, B., Panico, F., Pollmann, R., Eming, R., Banning, A., & Tikkanen, R. (2019). Immortalized human hTert/KER-CT keratinocytes a model system for research

- on desmosomal adhesion and pathogenesis of pemphigus vulgaris. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 3113.
<https://doi.org/10.3390/ijms20133113>
- Bektas, M., Jolly, P. S., Berkowitz, P., Amagai, M., & Rubenstein, D. S. (2013). A pathophysiologic role for epidermal growth factor receptor in pemphigus acantholysis. *Journal of Biological Chemistry*, 288(13), 9447–9456.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.438010>
- Berkowitz, P., Hu, P., Liu, Z., Diaz, L. A., Enghild, J. J., Chua, M. P., & Rubenstein, D. S. (2005). Desmosome signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 280(25), 23778–23784. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501365200>
- Berkowitz, P., Hu, P., Warren, S., Liu, Z., Diaz, L. A., & Rubenstein, D. S. (2006). p38MAPK inhibition prevents disease in pemphigus vulgaris mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(34), 12855–60. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602973103>
- Beutner, E. H., & Jordon, R. E. (1964). Demonstration of skin antibodies in sera of pemphigus vulgaris patients by indirect immunofluorescent staining. *Experimental Biology and Medicine*, 117(2), 505–510.
<https://doi.org/10.3181/00379727-117-29622>
- Bickel, P. E., Philipp E. Scherer, Jan E. Schnitzer, Phil Oh, Michael P. Lisanti, & Harvey F. Lodish. (1997). Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 272(21), 13793–802. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.21.13793>
- Biscardi, J. S., Maa, M.-C., Tice, D. A., Cox, M. E., Leu, T.-H., & Parsons, S. J. (1999). c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *Journal of Biological Chemistry*, 274(12), 8335–8343.
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.12.8335>
- Blanpain, C., & Fuchs, E. (2009). Epidermal homeostasis: A balancing act of stem cells in the skin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(3), 207–217.
<https://doi.org/10.1038/nrm2636>
- Bodin, S., Elhabashy, H., Macdonald, E., Winter, D., & Gauthier-Rouvière, C. (2025). Flotillins in membrane trafficking and physiopathology. *Biology of the Cell*, 117(1), e2400134. <https://doi.org/10.1111/boc.202400134>
- Borland, G., Smith, B. O., & Yarwood, S. J. (2009). EPAC proteins transduce diverse

- cellular actions of cAMP. *British Journal of Pharmacology*, 158(1), 70–86.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2008.00087.x>
- Bos, J. L. (2003). Epac: A new cAMP target and new avenues in cAMP research. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(9), 733–738. <https://doi.org/10.1038/nrm1197>
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., & Fusenig, N. E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of cell biology*, 106(3), 761–771.
<https://doi.org/10.1083/jcb.106.3.761>
- Boukamp, P., Popp, S., Altmeyer, S., Hülsen, A., Fasching, C., Cremer, T., & Fusenig, N. E. (1997). Sustained nontumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosome content during long-term culture of the human keratinocyte line HaCaT. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 19(4), 201–214.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2264\(199708\)19:4<201::AID-GCC1>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2264(199708)19:4<201::AID-GCC1>3.0.CO;2-0)
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytic Biochemistry*, 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Browman, D. T., Hoegg, M. B., & Robbins, S. M. (2007). The SPFH domain-containing proteins: More than lipid raft markers. *Trends in cell biology*, 17(8), 394–402.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.06.005>
- Brown, L. M., Rogers, K. E., McCammon, J. A., & Insel, P. A. (2014). Identification and validation of modulators of exchange protein activated by cAMP (Epac) activity. *Journal of Biological Chemistry*, 289(12), 8217–8230.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.548636>
- Bruce, J. I. E., Straub, S. V., & Yule, D. I. (2003). Crosstalk between cAMP and Ca²⁺ signaling in non-excitabile cells. *Cell Calcium*, 34(6), 431–444.
[https://doi.org/10.1016/S0143-4160\(03\)00150-7](https://doi.org/10.1016/S0143-4160(03)00150-7)
- Bystryń, J.-C., & Grando, S. A. (2006). A novel explanation for acantholysis in pemphigus vulgaris: The basal cell shrinkage hypothesis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 54(3), 513–516.
<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2005.12.003>
- Bystryń, J.-C., & Rudolph, J. L. (2005). Pemphigus. *The Lancet*, 366(9479), 61–73.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66829-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66829-8)
- Chartier, N. T., Lainé, M. G., Ducarouge, B., Oddou, C., Bonaz, B., Albiges-Rizo, C., &

- Jacquier-Sarlin, M. R. (2011). Enterocytic differentiation is modulated by lipid rafts-dependent assembly of adherens junctions. *Experimental Cell Research*, *317*(10), 1422–1436. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.03.009>
- Chavez-Alvarez, S., Herz-Ruelas, M., Villarreal-Martinez, A., Ocampo-Candiani, J., Garza-Garza, R., & Gomez-Flores, M. (2020). Azathioprine: its uses in dermatology. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, *95*(6), 731–736. <https://doi.org/10.1016/j.abd.2020.05.003>
- Chernyavsky, A. I., Arredondo, J., Kitajima, Y., Sato-Nagai, M., & Grando, S. A. (2007). Desmoglein versus non-desmoglein signaling in pemphigus acantholysis. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(18), 13804–13812. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611365200>
- Chitaev, N. A., & Troyanovsky, S. M. (1997). Direct Ca²⁺ -dependent heterophilic Interaction between desmosomal cadherins, desmoglein and desmocollin, contributes to cell–cell adhesion. *The Journal of Cell Biology*, *138*(1), 193–201. <https://doi.org/10.1083/jcb.138.1.193>
- De Rooij, J., Zwartkruis, F. J. T., Verheijen, M. H. G., Cool, R. H., Nijman, S. M. B., Wittinghofer, A., & Bos, J. L. (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*, *396*(6710), 474–477. <https://doi.org/10.1038/24884>
- Dejana, E., Tournier-Lasserre, E., & Weinstein, B. M. (2009). The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: Molecular basis and pathological implications. *Developmental Cell*, *16*(2), 209–221. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.01.004>
- Delva, E., Tucker, D. K., & Kowalczyk, A. P. (2009). The Desmosome. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *1*(2), a002543–a002543. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002543>
- Den Dunnen, J. T., & Van Ommen, G.-J. B. (1999). The protein truncation test: A review. *Human Mutation*, *14*(2), 95–102. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1999\)14:2<95::AID-HUMU1>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1999)14:2<95::AID-HUMU1>3.0.CO;2-G)
- Dermine, J.-F., Duclos, S., Garin, J., St-Louis, F., Rea, S., Parton, R. G., & Desjardins, M. (2001). Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(21), 18507–18512. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101113200>
- Deyrieux, A. F., & Wilson, V. G. (2007). In vitro culture conditions to study keratinocyte

- differentiation using the HaCaT cell line. *Cytotechnology*, 54(2), 77–83.
<https://doi.org/10.1007/s10616-007-9076-1>
- Doseyici, S., Mehmetoglu, I., Toker, A., Yerlikaya, F., & Erbay, E. (2014). The effects of forskolin and rolipram on cAMP, cGMP and free fatty acid levels in diet induced obesity. *Biotechnic & Histochemistry*, 89(5), 388–392.
<https://doi.org/10.3109/10520295.2014.883463>
- Egu, D. T., Schmitt, T., Ernst, N., Ludwig, R. J., Fuchs, M., Hiermaier, M., et al. (2024). EGFR inhibition by erlotinib rescues desmosome ultrastructure and keratin anchorage and protects against pemphigus vulgaris IgG–induced acantholysis in human epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*, 144(11), 2440–2452.
<https://doi.org/10.1016/j.jid.2024.03.040>
- Egu, D.T., Sigmund, A. M., Schmidt, E., Spindler, V., Walter, E., & Waschke, J. (2020). A new *ex vivo* human oral mucosa model reveals that p38 MAPK inhibition is not effective in preventing autoantibody-induced mucosal blistering in pemphigus. *British Journal of Dermatology*, 182(4), 987–994.
<https://doi.org/10.1111/bjd.18237>
- Egu, D.T., Walter, E., Spindler, V., & Waschke, J. (2017). Inhibition of p38MAPK signalling prevents epidermal blistering and alterations of desmosome structure induced by pemphigus autoantibodies in human epidermis. *British Journal of Dermatology*, 177(6), 1612–1618. <https://doi.org/10.1111/bjd.15721>
- Eming, R., & Hertl, M. (2006). Autoimmune bullous disorders. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 44(2). <https://doi.org/10.1515/CCLM.2006.027>
- Eming, R., Riaz, S., Müller, E. J., Zakrzewicz, A., Linne, U., Tikkanen, R., et al. (2024). Quality-controlled characterization of a monoclonal antibody specific to an EC5-domain of human desmoglein 3 for pemphigus research. *Frontiers in Immunology*, 15, 1464881. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1464881>
- Farwell, D. G., Shera, K. A., Koop, J. I., Bonnet, G. A., Matthews, C. P., Reuther, G. W., et al. (2000). Genetic and epigenetic changes in human epithelial cells immortalized by telomerase. *The American Journal of Pathology*, 156(5), 1537–1547. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65025-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65025-0)
- Fortelny, N., Pavlidis, P., & Overall, C. M. (2015). The path of no return—Truncated protein N-termini and current ignorance of their genesis. *PROTEOMICS*, 15(14), 2547–2552. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500043>
- Garrod, D., & Chidgey, M. (2008). Desmosome structure, composition and function.

- Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(3), 572–587.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.014>
- Getsios, S., Huen, A. C., & Green, K. J. (2004). Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(4), 271–281.
<https://doi.org/10.1038/nrm1356>
- Gkantiragas, I., Brügger, B., Stüven, E., Kaloyanova, D., Li, X.-Y., Löhr, K., et al. (2001). Sphingomyelin-enriched microdomains at the golgi complex. *Molecular Biology of the Cell*, 12(6), 1819–1833. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.6.1819>
- Glebov, O. O., Bright, N. A., & Nichols, B. J. (2006). Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nature Cell Biology*, 8(1), 46–54. <https://doi.org/10.1038/ncb1342>
- Goebeler, M., & Hamm, H. (Hrsg.). (2017). *Basiswissen Dermatologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-52811-2>
- Grando, S. A., Bystryj, J., Chernyavsky, A. I., Frušić-Zlotkin, M., Gniadecki, R., Lotti, R., et al. (2009). Apoptolysis: A novel mechanism of skin blistering in pemphigus vulgaris linking the apoptotic pathways to basal cell shrinkage and suprabasal acantholysis. *Experimental Dermatology*, 18(9), 764–770.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2009.00934.x>
- Green, K. J., Getsios, S., Troyanovsky, S., & Godsel, L. M. (2010). Intercellular junction assembly, dynamics, and homeostasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(2), a000125. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000125>
- Grewal, S. S., Fass, D. M., Yao, H., Ellig, C. L., Goodman, R. H., & Stork, P. J. S. (2000). Calcium and cAMP signals differentially regulate cAMP-responsive element-binding protein function via a Rap1-extracellular signal-regulated kinase pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 275(44), 34433–34441.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M004728200>
- Guillaume, E., Comunale, F., Do Khoa, N., Planchon, D., Bodin, S., & Gauthier-Rouvière, C. (2013). Flotillin micro-domains stabilize cadherins at cell-cell junctions. *Journal of Cell Science*, 126(Pt 22), 5293–304.
<https://doi.org/10.1242/jcs.133975>
- Hahn-Ristic, K., Rzany, B., Amagai, M., Bröcker, E., & Zillikens, D. (2002). Increased incidence of pemphigus vulgaris in southern europeans living in germany compared with native germans. *Journal of the European Academy of*

- Dermatology and Venereology*, 16(1), 68–71. <https://doi.org/10.1046/j.1468-3083.2002.00384.x>
- Hanoune, J., & Defer, N. (2001). Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 41(1), 145–174. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.41.1.145>
- Hartsock, A., & Nelson, W. J. (2008). Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(3), 660–669. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.012>
- Hertl, M., Zillikens, D., Borradori, L., Bruckner-Tuderman, L., Burckhard, H., Eming, R., et al. (2008). Recommendations for the use of rituximab (anti-CD20 antibody) in the treatment of autoimmune bullous skin diseases. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 6(5), 366–373. <https://doi.org/10.1111/j.1610-0387.2007.06602.x>
- Hoffmann, R., Baillie, G. S., MacKenzie, S. J., Yarwood, S. J., & Houslay, M. D. (1999). The MAP kinase ERK2 inhibits the cyclic AMP-specific phosphodiesterase HSPDE4D3 by phosphorylating it at Ser579. *The EMBO Journal*, 18(4), 893–903. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.4.893>
- Holthöfer, B., Windoffer, R., Troyanovsky, S., & Leube, R. E. (2007). Structure and function of desmosomes. In *International Review of Cytology* (Bd. 264, S. 65–163). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(07\)64003-0](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(07)64003-0)
- Hu, C.-H., Michel, B., & Schiltz, J. R. (1978). Epidermal acantholysis induced In Vitro by pemphigus autoantibody. *The American Journal of Pathology*, 90(2).
- Inoue, H., Hase, K., Segawa, A., & Takita, T. (2013). H89 (N-[2-p-bromocinnamylamino-ethyl]-5-isoquinolinesulphonamide) induces autophagy independently of protein kinase A inhibition. *European Journal of Pharmacology*, 714(1–3), 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.06.018>
- Ishii, K., Harada, R., Matsuo, I., Shirakata, Y., Hashimoto, K., & Amagai, M. (2005). In Vitro keratinocyte dissociation assay for evaluation of the pathogenicity of anti-desmoglein 3 IgG autoantibodies in pemphigus vulgaris. *Journal of Investigative Dermatology*, 124(5), 939–946. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23714.x>
- Jahn, M., Lang, V., Diehl, S., Back, R., Kaufmann, R., Fauth, T., & Buerger, C. (2024). Different immortalized keratinocyte cell lines display distinct capabilities to

- differentiate and reconstitute an epidermis in vitro. *Experimental Dermatology*, 33(1), e14985. <https://doi.org/10.1111/exd.14985>
- Kalantari-Dehaghi, M., Anhalt, G. J., Camilleri, M. J., Chernyavsky, A. I., Chun, S., Felgner, P. L., et al. (2013). Pemphigus vulgaris autoantibody profiling by proteomic technique. *PLOS ONE*, 8(3), e57587. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057587>
- Kapahnke, M., Banning, A., & Tikkanen, R. (2016). Random splicing of several exons caused by a single base change in the target exon of CRISPR/Cas9 mediated gene knockout. *Cells*, 5(4), 45. <https://doi.org/10.3390/cells5040045>
- Kasperkiewicz, M., Ellebrecht, C. T., Takahashi, H., Yamagami, J., Zillikens, D., Payne, A. S., & Amagai, M. (2017). Pemphigus. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 17026. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.26>
- Kimura, T. E., Merritt, A. J., & Garrod, D. R. (2007). Calcium-independent desmosomes of keratinocytes are hyper-adhesive. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(4), 775–781. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700643>
- Kneisel, A., & Hertl, M. (2011a). Autoimmune bullous skin diseases. Part 1: Clinical manifestations. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 9(10), 844–857. <https://doi.org/10.1111/j.1610-0387.2011.07793.x>
- Kneisel, A., & Hertl, M. (2011b). Autoimmune bullous skin diseases. Part 2: Diagnosis and therapy. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 9(11), 927–947. <https://doi.org/10.1111/j.1610-0387.2011.07809.x>
- Knudson, R. M., Kalaaji, A. N., & Bruce, A. J. (2010). The management of mucous membrane pemphigoid and pemphigus: Mucous membrane pemphigoid and pemphigus. *Dermatologic Therapy*, 23(3), 268–280. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2010.01323.x>
- Kopperud, R., Krakstad, C., Selheim, F., & Døskeland, S. O. (2003). cAMP effector mechanisms. Novel twists for an ‘old’ signaling system. *FEBS Letters*, 546(1), 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00563-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00563-5)
- Kowalczyk, A. P., & Green, K. J. (2013). Structure, function, and regulation of desmosomes. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Bd. 116, S. 95–118). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394311-8.00005-4>
- Kurrle, N., John, B., Meister, M., & Tikkanen, R. (2012). Function of flotillins in receptor tyrosine kinase signaling and endocytosis: Role of tyrosine phosphorylation and oligomerization. In C. Huang (Hrsg.), *Protein Phosphorylation in Human Health*.

- InTech. <https://doi.org/10.5772/48598>
- Kurrle, N., Völlner, F., Eming, R., Hertl, M., Banning, A., & Tikkanen, R. (2013). Flotillins directly interact with γ -Catenin and regulate epithelial cell-cell adhesion. *PLOS ONE*, 8(12), e84393. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084393>
- Kwiatkowska, K., Matveichuk, O. V., Fronk, J., & Ciesielska, A. (2020). Flotillins: At the intersection of protein S-Palmitoylation and lipid-mediated signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2283. <https://doi.org/10.3390/ijms21072283>
- Langhorst, M. F., Reuter, A., & Stuermer, C. A. O. (2005). Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(19–20), 2228–2240. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5166-4>
- Li, H., Zuo, J., & Tang, W. (2018). Phosphodiesterase-4 inhibitors for the treatment of inflammatory diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1048. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01048>
- Limbutara, K., Kelleher, A., Yang, C.-R., Raghuram, V., & Knepper, M. A. (2019). Phosphorylation changes in response to kinase inhibitor H89 in PKA-Null cells. *Scientific Reports*, 9(1), 2814. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39116-2>
- Linding, R., Jensen, L. J., Ostheimer, G. J., Van Vugt, M. A. T. M., Jørgensen, C., Miron, I. M., et al. (2007). Systematic discovery of In Vivo phosphorylation networks. *Cell*, 129(7), 1415–1426. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.052>
- Lingwood, D., & Simons, K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 327(5961), 46–50. <https://doi.org/10.1126/science.1174621>
- Liu, J., DeYoung, S. M., Zhang, M., Dold, L. H., & Saltiel, A. R. (2005). The stomatin/prohibitin/flotillin/HflK/C domain of flotillin-1 contains distinct sequences that direct plasma membrane localization and protein interactions in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 280(16), 16125–16134. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500940200>
- Lüllmann-Rauch, R., & Asan, E. (2015). *Taschenbuch Histologie* (5., vollständig überarbeitete Auflage.). Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag.
- Martin, L. K., Agero, A. L., Werth, V., Villanueva, E., Segall, J., & Murrell, D. F. (2009). Interventions for pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006263.pub2>
- Mathur, M., Goodwin, L., & Cowin, P. (1994). Interactions of the cytoplasmic domain of

- the desmosomal cadherin Dsg1 with plakoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, 269(19), 14075–14080.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)36756-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)36756-X)
- Meier, K., Holstein, J., Solimani, F., Waschke, J., & Ghoreschi, K. (2020). Case report: Apremilast for therapy-resistant pemphigus vulgaris. *Frontiers in Immunology*, 11, 588315. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.588315>
- Meister, M., & Tikkanen, R. (2014). Endocytic trafficking of membrane-bound cargo: A flotillin point of view. *Membranes*, 4(3), 356–371.
<https://doi.org/10.3390/membranes4030356>
- Morrow, I. C., Rea, S., Martin, S., Prior, I. A., Prohaska, R., Hancock, J. F., et al. (2002). Flotillin-1/Reggie-2 traffics to surface raft domains via a novel golgi-independent pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 277(50), 48834–48841.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M209082200>
- Neumann-Giesen, C., Falkenbach, B., Beicht, P., Claasen, S., Lüers, G., Stuermer, C. A. O., et al. (2004). Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: Role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression. *Biochemical Journal*, 378(2), 509–518.
<https://doi.org/10.1042/bj20031100>
- Neumann-Giesen, C., Fernow, I., Amaddii, M., & Tikkanen, R. (2007). Role of EGF-induced tyrosine phosphorylation of reggie-1/flotillin-2 in cell spreading and signaling to the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science*, 120(3), 395–406.
<https://doi.org/10.1242/jcs.03336>
- Nguyen, V. T., Ndoye, A., & Grando, S. A. (2000). Pemphigus vulgaris antibody identifies pemphaxin. *Journal of Biological Chemistry*, 275(38), 29466–29476.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M003174200>
- Niessen, C. M. (2007). Tight junctions/adherens junctions: Basic structure and function. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(11), 2525–2532.
<https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700865>
- Nilsson, R., Ahmad, F., Swärd, K., Andersson, U., Weston, M., Manganiello, V., & Degerman, E. (2006). Plasma membrane cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B (PDE3B) is associated with caveolae in primary adipocytes. *Cellular Signalling*, 18(10), 1713–1721. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.01.010>
- Nollet, F., Kools, P., & Van Roy, F. (2000). Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary

- members. *Journal of Molecular Biology*, 299(3), 551–572.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3777>
- Novodvorsky, P., Watson, O., Gray, C., Wilkinson, R. N., Reeve, S., Smythe, C., et al. (2015). klf2ash317 mutant zebrafish do not recapitulate morpholino-induced vascular and haematopoietic phenotypes. *PLOS ONE*, 10(10), e0141611.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141611>
- Oda, K., Matsuoka, Y., Funahashi, A., & Kitano, H. (2005). A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Molecular Systems Biology*, 1(1), 2005.0010. <https://doi.org/10.1038/msb4100014>
- Pan, M., Liu, X., & Zheng, J. (2011). The pathogenic role of autoantibodies in pemphigus vulgaris: Pathogenesis of pemphigus vulgaris. *Clinical and Experimental Dermatology*, 36(7), 703–707. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2011.04092.x>
- Pierce, K. L., Premont, R. T., & Lefkowitz, R. J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(9), 639–650.
<https://doi.org/10.1038/nrm908>
- Pincelli, C., Schafer, P. H., French, L. E., Augustin, M., & Krueger, J. G. (2018). Mechanisms underlying the clinical effects of apremilast for psoriasis. *Journal of drugs in dermatology*, 17(8), 835–840.
- Pollmann, R., Schmidt, T., Eming, R., & Hertl, M. (2018). Pemphigus: A comprehensive review on pathogenesis, clinical presentation and novel therapeutic approaches. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 54(1), 1–25.
<https://doi.org/10.1007/s12016-017-8662-z>
- Porro, A. M., Seque, C. A., Ferreira, M. C. C., & Enokihara, M. M. S. E. S. (2019). Pemphigus vulgaris. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 94(3), 264–278.
<https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20199011>
- Potter, R. L., & Taylor, S. S. (1979). Relationships between structural domains and function in the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinases I and II from porcine skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 254(7), 2413–2418. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)30238-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)30238-7)
- Prokisch, H. (2019). Molecular diagnostics of Mendelian disorders via combined DNA and RNA sequencing. *Medizinische Genetik*, 31(2), 191–197.
<https://doi.org/10.1007/s11825-019-0241-7>
- Ramirez, R. D., Herbert, B.-S., Vaughan, M. B., Zou, Y., Gandia, K., Morales, C. P., et al. (2003). Bypass of telomere-dependent replicative senescence (M1) upon

- overexpression of Cdk4 in normal human epithelial cells. *Oncogene*, 22(3), 433–444. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206046>
- Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., & Deutzmann, R. (Hrsg.). (2016). *Duale Reihe Biochemie* (4. Auflage.). Stuttgart: Thieme.
- Resnik, N., Sepčić, K., Plemenitaš, A., Windoffer, R., Leube, R., & Veranič, P. (2011). Desmosome assembly and cell-cell adhesion are membrane raft-dependent processes. *Journal of Biological Chemistry*, 286(2), 1499–1507. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.189464>
- Ribon, V., Herrera, R., Kay, B. K., & Saltiel, A. R. (1998). A role for CAP, a novel, multifunctional Src homology 3 domain-containing protein in formation of actin stress fibers and focal adhesions. *Journal of Biological Chemistry*, 273(7), 4073–4080. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.7.4073>
- Riento, K., Frick, M., Schafer, I., & Nichols, B. J. (2009). Endocytosis of flotillin-1 and flotillin-2 is regulated by Fyn kinase. *Journal of Cell Science*, 122(7), 912–918. <https://doi.org/10.1242/jcs.039024>
- Rivera-Milla, E., Stuermer, C. A. O., & Málaga-Trillo, E. (2006). Ancient origin of reggie (flotillin), reggie-like, and other lipid-raft proteins: Convergent evolution of the SPFH domain. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(3), 343–357. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5434-3>
- Rosen, S. M., Joshi, M., Hitt, T., Beggs, A. H., & Agrawal, P. B. (2020). Knockin mouse model of the human CFL2 p.A35T mutation results in a unique splicing defect and severe myopathy phenotype. *Human Molecular Genetics*, 29(12), 1996–2003. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddaa035>
- Ruocco, E., Wolf, R., Brunetti, G., Romano, F., Lo Schiavo, A., & Ruocco, V. (2013). Pemphigus: Associations and management guidelines: Facts and controversies. *Clinics in Dermatology*, 31(4), 382–390. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2013.01.005>
- Ruocco, V., Lo Schiavo, A., Brunetti, G., Guerrera, L. P., Wolf, R., & Ruocco, E. (2013). Pemphigus: Etiology, pathogenesis, and inducing or triggering factors: Facts and controversies. *Clinics in Dermatology*, 31(4), 374–381. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2013.01.004>
- Saito, M., Stahley, S. N., Caughman, C. Y., Mao, X., Tucker, D. K., Payne, A. S., et al. (2012). Signaling dependent and independent mechanisms in pemphigus vulgaris blister formation. *PLOS ONE*, 7(12), e50696.

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050696>
- Sajda, T., & Sinha, A. A. (2018). Autoantibody signaling in pemphigus vulgaris: Development of an integrated model. *Frontiers in Immunology*, *9*, 692. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00692>
- Sassone-Corsi, P. (2012). The cyclic AMP pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(12), a011148–a011148. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011148>
- Schlögl, E., Radeva, M. Y., Vielmuth, F., Schinner, C., Waschke, J., & Spindler, V. (2018). Keratin retraction and desmoglein3 internalization independently contribute to autoantibody-induced cell dissociation in pemphigus vulgaris. *Frontiers in Immunology*, *9*, 858. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00858>
- Schmidt, M. F., Feoktistova, M., Panayotova-Dimitrova, D., Eichkorn, R. A., & Yazdi, A. S. (2022). Pitfalls in the application of dispase-based keratinocyte dissociation assay for In Vitro analysis of pemphigus vulgaris. *Vaccines*, *10*(2), 208. <https://doi.org/10.3390/vaccines10020208>
- Schmitt, T., Hudemann, C., Moztarzadeh, S., Hertl, M., Tikkanen, R., & Waschke, J. (2023). Dsg3 epitope-specific signalling in pemphigus. *Frontiers in Immunology*, *14*, 1163066. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1163066>
- Schmitt, T., & Waschke, J. (2021). Autoantibody-specific signalling in pemphigus. *Frontiers in Medicine*, *8*, 701809. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.701809>
- Schneider, A., Rajendran, L., Honsho, M., Gralle, M., Donnert, G., Wouters, F., et al. (2008). Flotillin-dependent clustering of the amyloid precursor protein regulates its endocytosis and amyloidogenic processing in neurons. *The Journal of Neuroscience*, *28*(11), 2874–2882. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5345-07.2008>
- Schulte, T., Paschke, K. A., Laessing, U., Lottspeich, F., & Stuermer, C. A. O. (1997). Reggie-1 and reggie-2, two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration. *Development*, *124*(2), 577–587. <https://doi.org/10.1242/dev.124.2.577>
- Schulze, K., Galichet, A., Sayar, B. S., Scothern, A., Howald, D., Zymann, H., et al. (2012). An adult passive transfer mouse model to study desmoglein 3 signaling in pemphigus vulgaris. *Journal of Investigative Dermatology*, *132*(2), 346–355. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.299>
- Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., Voll, M., & Wesker, K. (Hrsg.). (2022). *Prometheus LernAtlas der Anatomie - Allgemeine Anatomie und*

- Bewegungssystem* (6., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage). Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b000000613>
- Sielski, L., Baker, J., DePasquale, M. C., Attwood, K., Seiffert-Sinha, K., & Sinha, A. A. (2022). Desmoglein compensation hypothesis fidelity assessment in pemphigus. *Frontiers in Immunology*, *13*, 969278. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.969278>
- Sigmund, A. M., Bayerbach, F. C., Kugelmann, D., Butz, E., Moztarzadeh, S., Schikora, M. E. C., et al. (2025). Epacl contributes to apremilast-mediated rescue of pemphigus autoantibody-induced loss of keratinocyte adhesion. *JCI insight*, *10*(10), e187481. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.187481>
- Sigmund, A. M., Winkler, M., Engelmayer, S., Kugelmann, D., Egu, D. T., Steinert, L. S., et al. (2023). Apremilast prevents blistering in human epidermis and stabilizes keratinocyte adhesion in pemphigus. *Nature Communications*, *14*(1), 116. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35741-0>
- Singer, K. H., Hashimoto, K., Jensen, P. J., Morioka, S., & Lazarus, G. S. (1985). Pathogenesis of autoimmunity in pemphigus. *Annual Review of Immunology*, *3*, 87–108. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.03.040185.000511>
- Smits, A. H., Ziebell, F., Joberty, G., Zinn, N., Mueller, W. F., Clauder-Münster, S., et al. (2019). Biological plasticity rescues target activity in CRISPR knock outs. *Nature Methods*, *16*(11), 1087–1093. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0614-5>
- Smits, J. P. H., Niehues, H., Rikken, G., Van Vlijmen-Willems, I. M. J. J., Van De Zande, G. W. H. J. F., Zeeuwen, P. L. J. M., et al. (2017). Immortalized N/TERT keratinocytes as an alternative cell source in 3D human epidermal models. *Scientific Reports*, *7*(1), 11838. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12041-y>
- Solis, G. P., Hoegg, M., Munderloh, C., Schrock, Y., Malaga-Trillo, E., Rivera-Milla, E., & Stuermer, C. A. O. (2007). Reggie/flotillin proteins are organized into stable tetramers in membrane microdomains. *Biochemical Journal*, *403*(2), 313–322. <https://doi.org/10.1042/BJ20061686>
- Solis, G. P., Hülsbusch, N., Radon, Y., Katanaev, V. L., Plattner, H., & Stuermer, C. A. O. (2013). Reggies/flotillins interact with Rab11a and SNX4 at the tubulovesicular recycling compartment and function in transferrin receptor and E-cadherin trafficking. *Molecular Biology of the Cell*, *24*(17), 2689–2702. <https://doi.org/10.1091/mbc.e12-12-0854>
- Solis, G. P., Schrock, Y., Hülsbusch, N., Wiechers, M., Plattner, H., & Stuermer, C. A.

- O. (2012). Reggies/flotillins regulate E-cadherin-mediated cell contact formation by affecting EGFR trafficking. *Molecular Biology of the Cell*, 23(10), 1812–1825. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-12-1006>
- Spindler, V., Endlich, A., Hartlieb, E., Vielmuth, F., Schmidt, E., & Waschke, J. (2011). The extent of desmoglein 3 depletion in pemphigus vulgaris is dependent on Ca²⁺-induced differentiation. *The American Journal of Pathology*, 179(4), 1905–1916. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.06.043>
- Spindler, V., Vielmuth, F., Schmidt, E., Rubenstein, D. S., & Waschke, J. (2010). Protective endogenous cyclic adenosine 5'-monophosphate signaling triggered by pemphigus autoantibodies. *The Journal of Immunology*, 185(11), 6831–6838. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002675>
- Sprenger, A., Weber, S., Zarai, M., Engelke, R., Nascimento, J. M., Gretzmeier, C., et al. (2013). Consistency of the proteome in primary human keratinocytes with respect to gender, age, and skin localization. *Molecular & Cellular Proteomics*, 12(9), 2509–2521. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.025478>
- Stahley, S. N., Saito, M., Faundez, V., Koval, M., Mattheyses, A. L., & Kowalczyk, A. P. (2014). Desmosome assembly and disassembly are membrane raft-dependent. *PLOS ONE*, 9(1), e87809. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087809>
- Stanley McKnight, G. (1991). Cyclic AMP second messenger systems. *Current Opinion in Cell Biology*, 3(2), 213–217. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(91\)90141-K](https://doi.org/10.1016/0955-0674(91)90141-K)
- Stuermer, C. A. O., Langhorst, M. F., Wiechers, M. F., Legler, D. F., Hanwehr, S. H. V., Guse, A. H., & Plattner, H. (2004). PrP^c capping in T cells promotes its association with the lipid raft proteins reggie-1 and reggie-2 and leads to signal transduction. *The FASEB Journal*, 18(14), 1731–1733. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2150fje>
- Sutherland, E. W., & Rall, T. W. (1957). The properties of an adenine ribonucleotide produced with cellular particles, ATP, Mg⁺⁺, and epinephrine or glucagon, (Journal of the American Chemical Society).
- Takai, Y., Sasaki, T., & Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiological Reviews*, 81(1), 153–208. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.1.153>
- Taylor, S. S., Knighton, D. R., & Zheng, J. (1992). Structural framework for the protein kinase family. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 8, 429–62. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.08.110192.002241>
- Torres, T., & Puig, L. (2018). Apremilast: A novel oral treatment for psoriasis and

- psoriatic arthritis. *American Journal of Clinical Dermatology*, 19(1), 23–32.
<https://doi.org/10.1007/s40257-017-0302-0>
- Tsunoda, K., Ota, T., Aoki, M., Yamada, T., Nagai, T., Nakagawa, T., et al. (2003). Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. *The Journal of Immunology*, 170(4), 2170–2178. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.4.2170>
- Tsunoda, K., Ota, T., Saito, M., Hata, T., Shimizu, A., Ishiko, A., et al. (2011). Pathogenic relevance of IgG and IgM antibodies against desmoglein 3 in blister formation in pemphigus vulgaris. *The American Journal of Pathology*, 179(2), 795–806. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.04.015>
- Vielmuth, F., Radeva, M. Y., Yeruva, S., Sigmund, A. M., & Waschke, J. (2023). cAMP : A master regulator of cadherin-mediated binding in endothelium, epithelium and myocardium. *Acta Physiologica*, 238(4), e14006.
<https://doi.org/10.1111/apha.14006>
- Völlner, F., Ali, J., Kurrle, N., Exner, Y., Eming, R., Hertl, M., et al. (2016). Loss of flotillin expression results in weakened desmosomal adhesion and pemphigus vulgaris-like localisation of desmoglein-3 in human keratinocytes. *Scientific Reports*, 6(1), 28820. <https://doi.org/10.1038/srep28820>
- Wahl, J. K., Sacco, P. A., Sadler, T. M. M., Sauppé, L. M., Wheelock, M. J., & Johnson, K. R. (1996). Plakoglobin domains that define its association with the desmosomal cadherins and the classical cadherins: Identification of unique and shared domains. *Journal of Cell Science*, 109(5), 1143–1154. <https://doi.org/10.1242/jcs.109.5.1143>
- Walko, G., Castañón, M. J., & Wiche, G. (2015). Molecular architecture and function of the hemidesmosome. *Cell and Tissue Research*, 360(3), 529–544. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2216-6>
- Walter, E., Vielmuth, F., Rotkopf, L., Sárdy, M., Horváth, O. N., Goebeler, M., et al. (2017). Different signaling patterns contribute to loss of keratinocyte cohesion dependent on autoantibody profile in pemphigus. *Scientific Reports*, 7(1), 3579. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03697-7>
- Walter, E., Vielmuth, F., Wanuske, M.-T., Seifert, M., Pollmann, R., Eming, R., & Waschke, J. (2019). Role of dsg1- and dsg3-mediated signaling in pemphigus autoantibody-induced loss of keratinocyte cohesion. *Frontiers in Immunology*, 10, 1128. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01128>

- Wang, F., Guo, T., Jiang, H., Li, R., Wang, T., Zeng, N., et al. (2018). A comparison of CRISPR/Cas9 and siRNA-mediated ALDH2 gene silencing in human cell lines. *Molecular Genetics and Genomics*, 293(3), 769–783.
<https://doi.org/10.1007/s00438-018-1420-y>
- Waschke, J. (2008). The desmosome and pemphigus. *Histochemistry and Cell Biology*, 130(1), 21–54. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0420-0>
- Waschke, J., Amagai, M., Becker, C., Delmar, M., Duru, F., Garrod, D. R., et al. (2025). Meeting report – Alpine desmosome disease meeting 2024: Advances and emerging topics in desmosomes and related diseases. *Journal of Cell Science*, 138(2), JCS263796. <https://doi.org/10.1242/jcs.263796>
- Watanabe, S., Takahashi, N., Uchida, H., & Wakasugi, K. (2012). Human neuroglobin functions as an oxidative stress-responsive sensor for neuroprotection. *Journal of Biological Chemistry*, 287(36), 30128–30138.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.373381>
- Webster, C. R. L., & Anwer, M. S. (1999). Role of the PI3K/PKB signaling pathway in cAMP-mediated translocation of rat liver Ntcp. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 277(6), G1165–G1172.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.1999.277.6.G1165>
- Wehrle-Haller, B. (2012). Structure and function of focal adhesions. *Current Opinion in Cell Biology*, 24(1), 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.11.001>
- Welsch, U., Kummer, W., & Deller, T. (2022). Haut. In Ulrich Welsch & D. Lehrbuch (Hrsg.), *Histologie - Lehrbuch und Atlas* (6. Auflage., S. 571–589).
<http://dx.doi.org/10.1016/B978-3-437-44427-2.00016-X>
- Wisniewski, D. J., Liyasova, M. S., Korrapati, S., Zhang, X., Ratnayake, S., Chen, Q., et al. (2023). Flotillin-2 regulates epidermal growth factor receptor activation, degradation by Cbl-mediated ubiquitination, and cancer growth. *Journal of Biological Chemistry*, 299(1), 102766. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102766>
- Yamamoto, Y., Aoyama, Y., Shu, E., Tsunoda, K., Amagai, M., & Kitajima, Y. (2007). Anti-desmoglein 3 (Dsg3) monoclonal antibodies deplete desmosomes of dsg3 and differ in their dsg3-depleting activities related to pathogenicity. *Journal of Biological Chemistry*, 282(24), 17866–17876.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M607963200>
- Yang, W., Sherman, V. R., Gludovatz, B., Schaible, E., Stewart, P., Ritchie, R. O., & Meyers, M. A. (2015). On the tear resistance of skin. *Nature Communications*,

6(1), 6649. <https://doi.org/10.1038/ncomms7649>

- Yoshimasa, T., Sibley, D. R., Bouvier, M., Lefkowitz, R. J., & Caron, M. G. (1987). Cross-talk between cellular signalling pathways suggested by phorbol-ester-induced adenylate cyclase phosphorylation. *Nature*, *327*(6117), 67–70. <https://doi.org/10.1038/327067a0>
- Zaccolo, M., Zerio, A., Lobo, M. J., & Garland, C. (2021). Subcellular organization of the cAMP signaling pathway. *Pharmacological Reviews*, *73*(1), 278–309. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000086>
- Zakrzewicz, A., Würth, C., Beckert, B., Feldhoff, S., Vanderheyden, K., Foss, S., et al. (2022). Stabilization of keratinocyte monolayer integrity in the presence of anti-desmoglein-3 antibodies through FcRn blockade with efgartigimod: Novel treatment paradigm for pemphigus? *Cells*, *11*(6), 942. <https://doi.org/10.3390/cells11060942>
- Zhao, L., Chen, Y., & Wang, M. (2023). The global incidence rate of pemphigus vulgaris: A systematic review and meta-analysis. *Dermatology*, *239*(4), 514–522. <https://doi.org/10.1159/000530121>

9 Anhang

9.1 Nutzungsgenehmigung von Abbildungen

Die Nutzungsgenehmigung von Abbildungen aus fremden Quellen wurde von den Autoren eingeholt.

10 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort/Datum

Unterschrift

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen herzlichen Dank an all jene aussprechen, die mich während meiner Promotionszeit begleitet und unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Ritva Tikkanen. Sie hat mir nicht nur die Möglichkeit gegeben, diese Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe zu verwirklichen, sondern mich über die ganze Zeit mit großartiger Unterstützung und wertvollen wissenschaftlichen Impulsen begleitet. Ebenso danke ich meiner Betreuerin, Frau Dr. Anna Zakrzewicz, die jederzeit für mich da war und mich mit ihrer hervorragenden Betreuung bestens begleitet hat. Ich habe mich stets in besten Händen gefühlt.

Ein herzliches Dankeschön geht an die gesamte AG Tikkanen, insbesondere an Ralf Füllkrug, Simone Kegel, Simon Feldhoff, Dr. Antje Banning und Dr. Miroslava Didiasova. Ich danke euch für die unterhaltsame und bereichernde Zeit im Labor, für euren Rat, eure Unterstützung und die vielen gemeinsamen Momente. Die langen Mittagspausen und tiefgründigen Gespräche mit euch werde ich definitiv vermissen!

Ein großes Dankeschön auch an meine Doktoranden-Kollegen Charlotte Mehl, Lidia Reznikova, Simon Feldhoff, Lukas Hoeren, Adla Murad und Minh Thuy Nguyen. Die Zeit mit euch im Labor war großartig und ich hoffe auf viele weitere lustige Treffen in der Zukunft!

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinem Freund Philipp meinen tiefsten Dank aussprechen. Mama, Papa und Anna, ihr habt mich während meines Studiums, auf meinem beruflichen Weg und während der gesamten Promotion unermüdlich unterstützt. Ohne euch wäre all das nicht möglich gewesen.

Ich danke Philipp für seine Liebe, Geduld und Unterstützung an meiner Seite, besonders in den Momenten, in denen ich selbst daran gezweifelt habe.

Danke!