



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK



Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie

Direktor: Prof. Dr. med. Ralf Ludwig

**Pemphigus vulgaris: Einfluss von Glucocorticoiden und Ermittlung der
intrazellulären Kinase-Aktivität im Hautorgan-Kulturmodell**

Inauguraldissertation

zum Erwerb der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin –

Felix Frischmann

aus Wiesbaden

Lübeck 2023

1. Berichterstatter*in:	Prof. Dr. med. vet. habil. Jennifer E. Hundt
Ko-Betreuer*in:	Prof. Dr. med. Karl-Friedrich Klotz
2. Berichterstatter*in:	Prof. Dr. rer. nat. Lars Redecke
Tag der mündlichen Prüfung:	26.03.2026

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 01.04.2026

Promotionskommission der Sektion Medizin

Erklärung

Ich versichere an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Benutzung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Felix Frischmann

1 Inhaltsverzeichnis

2	Verzeichnisse	7
2.1	Abkürzungsverzeichnis.....	7
2.2	Abbildungsverzeichnis.....	12
2.3	Tabellenverzeichnis.....	14
3	Einleitung.....	15
3.1	Humane Haut	15
3.1.1	Subcutis, Dermis, Epidermis.....	16
3.1.2	Desmosomen.....	17
3.2	Antikörper und das variable Einzelkettenfragment.....	18
3.3	Pemphigus vulgaris.....	20
3.3.1	Pathogenese.....	20
3.3.2	Symptome	24
3.3.3	Diagnostik.....	25
3.3.4	Therapie.....	25
3.4	Proteinkinasen	26
3.4.1	Protein-Tyrosin-Kinasen	27
3.4.2	Serin-Threonin-Kinasen.....	28
3.5	PamGene	29
3.5.1	PamGene-Technologieübersicht	29
3.5.2	Arbeitsablauf der Messungen	30
3.6	Glucocorticoide	31
3.6.1	Wirkmechanismus.....	32
3.6.2	Wirkung	34
3.6.3	Prednisolon.....	35
3.6.4	Clobetasol.....	35
3.7	Forschungsziele	35
4	Material.....	36
4.1	Geräte.....	36
4.2	Verbrauchsmaterialien.....	38
4.3	Reagenzien	40
4.4	Medikamente und Inhibitoren.....	42
4.5	Antikörper	42
4.6	Software	43
5	Methoden.....	44

5.1	Hautorgan-Kulturmodell für Pemphigus vulgaris.....	44
5.1.1	Aufbau und Anwendung.....	44
5.1.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	49
5.1.3	Quantitative histometrische Auswertung	49
5.1.4	Direkte Immunfluoreszenz-Färbung.....	51
5.1.5	Immunfluoreszenz-Färbung	52
5.2	Messung der Kinase-Aktivität mit der PamGene-Technologie	55
5.2.1	Anfertigung von Haut-Schnitten für die PamGene-Messung.....	55
5.2.2	Anfertigung des Gewebe-Lysats.....	56
5.2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration im Lysat	57
5.2.4	Messung und Interpretation der Kinase-Aktivität mittels PamGene-Technologie	58
5.3	Zellkultur	58
5.3.1	Humane adulte niedriges Calcium hohe Temperatur Zellen	58
5.3.2	Kultivierung von Humanen adulten niedriges Calcium hohe Temperatur Zellen	59
5.3.3	Keratinocyten-Dissoziations-Assay.....	60
5.3.4	Ablauf des Keratinocyten-Dissoziations-Assays	61
5.4	Statistische Auswertung.....	63
6	Ergebnisse.....	64
6.1	Exprimierung von Desmoglein-1 und Desmoglein-3.....	64
6.2	Das variable Einzelkettenfragment löst epidermale Spaltbildung in menschlicher Haut aus.....	65
6.3	Bindeverhalten des variablen Einzelkettenfragments	66
6.4	Eine intradermale Injektion von Prednisolon zeigt keine signifikante Reduktion der Spaltbildung im Hautorgan-Kulturmodell.....	68
6.5	Eine epidermale Auftragung von Clobetasol-haltiger Creme zeigt keine signifikante Reduktion der Spaltbildung im Hautorgan-Kulturmodell.....	70
6.6	PamGene-Analyse: Acht Kinasen in Positivkontrollen signifikant aktiver als in Negativkontrolle	72
6.7	Auswahl der Kinase-Inhibitoren für den Keratinocyten-Dissoziations-Assay	74
6.8	Das variable Einzelkettenfragment löst eine Fragmentierung bei HaCaT-Zellen aus.....	74
6.9	PP2, Saracatinib und SU 6656 hemmen signifikant die Fragmentierung in allen drei Konzentration mit steigender Effektstärke	76
6.10	RK 24466, KX2-391 und PF-573228 hemmen signifikant die Fragmentierung in allen drei Konzentrationen.....	78
6.11	PRT062607 zeigt eine signifikante Reduktion der Keratinocyten-Dissoziation in der höchsten, nicht aber in den beiden niedrigeren Konzentrationen.	80
7	Diskussion.....	81
7.1	Kritische Bewertung des Hautorgan-Kulturmodells.....	81

7.2	Der Effekt von Glucocorticoiden auf die Akantholyse im Hautorgan-Kulturmodell	83
7.3	Mögliche Fehlerquellen bei der Durchführung des Hautorgan-Kulturmodells	85
7.4	Das <i>in vivo</i> Mausmodell für die Untersuchung von Pemphigus vulgaris im Vergleich	86
7.5	Kritische Bewertung des Messvorgangs der Kinase-Aktivität im Hautorgan-Kulturmodell mittels der PamGene-Technologie	88
7.6	Messergebnisse der Kinase-Aktivität mittels PamGene-Technologie	89
7.7	Der Effekt der Kinase-Inhibition im Keratinozyten-Dissoziations-Assay auf die Keratinozyten Fragmentierung.....	91
7.8	Andere beteiligte Kinasen bei der Pathogenese von Pemphigus vulgaris.....	94
7.9	Ausblick	95
8	Zusammenfassung	96
9	Quellenverzeichnis	97
10	Anhang	115
10.1	Ethikantrag	115
10.2	Poster	116
10.3	Rohdaten der Ergebnisse der PamGene-Messung.....	117
10.3.1	Protein-Tyrosin-Kinasen	117
10.3.2	Serin-Threonin-Kinasen	125
11	Danksagung	135

2 Verzeichnisse

2.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
-/-	<i>Knockout</i>
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
3D	Dreidimensional
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatcyclase
ADP	Adenosindiphosphat
AnxA1	Annexin A1
AP-1	<i>Activator Protein-1</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	Circa
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calcium-Chlorid
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CCD	<i>Charged-Coupled Devide</i>
CD	<i>Anti-Clusters of Differentiation</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C-Domäne	Konstante Domäne
cGCR	Cytosolischer Glucocorticoid Rezeptor
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CH	Konstante Domäne der schweren Kette

CL	Konstante Domäne der leichten Kette
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
D	Dermis
DAG	Diacylglycerat
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DIF	Direkte Immunfluoreszenz
dim	Dimerisierungsdefekt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
Dsc	Desmocollin
Dsg	Desmoglein
DUSP1	<i>Dual-Specificity-Phosphatase 1</i>
E	Epidermis
EC	Extrazelluläre Cadherin-Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ENV	Envoplakin
ERK	<i>Extracellular-Signal Regulated Kinase</i>
ETA	<i>Exfoliative Toxin A</i>
Fab	<i>Fragment Antigen-Binding</i>
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FBS	Fetales Bovines Serum
Fc	<i>Crystallizable Fragment</i>
Fv	<i>Variable Fragment</i>
g	Gramm
GC	Glucocorticoid
GILZ	Glucocorticoid-Induzierte Leucin-Zipper
GPCR	<i>G-Protein-Coupled Receptor</i>
GRE	<i>Glucocorticoid Response Element</i>
GTP	Guanosintriphosphat

G α	G-Alpha Untereinheit
G $\beta\gamma$	G-Beta-Gamma Komplex
h	Stunden
HA	Hämagglutinin
HaCaT	Humane Adulte Niedriges Calcium Hohe Temperatur
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
H-Kette	Schwere Kette
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HS	<i>Human Skin</i>
i.v.	Intravenös
Ig(G)	Immunglobulin (Klasse G)
IF	Immunfluoreszenz
IL	Interleukin
IP3	Inositoltrisphosphat
IVIG	Intravenöses Immunglobulin
JAK	Januskinase
JNK	C-Jun-N-Terminale Kinase
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KGM2	<i>Keratinocyte Growth Medium 2</i>
KHK	Koronare Herzkrankheit
L	Liter
L-Kette	Leichte Kette
M	Molar
m ²	Quadratmeter
mAb	Monoklonaler Antikörper
MAP2K	Mitogen-Aktivierte Protein-Kinase-Kinase
MAPKAP	Mitogen-Aktivierte Protein-Kinase-Kinase-Aktivierte Protein Kinase
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten

Verzeichnisse

MK2	MAPKAP Kinase 2
mL	Milliliter
mM	Millimolar
M-PER	<i>Mammalian Protein Extraction Reagent</i>
mRNA	<i>Messenger Ribonucleinacid</i>
n	Anzahl
NC	Negativkontrolle
NF- κ B	<i>Nuclear Factor κB</i>
NHEK	Normale Humane Epitheliale Keratinozyten
nm	Nanometer
Nr	Nummer
NRTK	Nichtrezeptorgebundene Protein-Tyrosin-Kinase
ns	Nicht Signifikant
NTP	Nucleosidtriphosphat
P	Prednisolon
p38MAPK	<i>p38 Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
PC	Positivkontrolle
PDE	Phosphodiesterase
PER	Periplakin
PF	Pemphigus Foliaceus
pH	Potential des Wasserstoffs
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositolbisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PTK	Protein-Tyrosin-Kinase
PV	Pemphigus Vulgaris
Rag2	<i>Recombination Activating Gene 2</i>
Rho	<i>Ras Homologous</i>
RTK	Rezeptorgebundene Protein-Tyrosin-Kinase

S2k-Leitlinie	Leitlinie auf Basis formaler Konsensfindung
scFv	Variables Einzelkettenfragment
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SH	Src-Homologie-Domäne
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
STK	Serin-Threonin-Kinase
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TC	Oberflächenbehandelt
TF	Transkriptionsfaktor
Th1	T-Helfer-Zelle
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
T _{reg}	Regulatorische T-Zelle
U	<i>Units</i>
V-Domäne	Variable Domäne
VF	<i>Visual Field</i>
vgl.	Vergleiche
VH	Variable Domäne einer Schwere Kette
VL	Variable Domäne einer Leichten Kette
vs.	Versus
WR	Arbeitsreagenz
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Ziegen-Normalserum

2.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Haut.....	15
Abbildung 2: Aufbau der Epidermis.....	16
Abbildung 3: Komplexer Aufbau eines Desmosoms.....	17
Abbildung 4: Aufbau eines Immunglobulins und eines variablen Einzelkettenfragments.....	19
Abbildung 5: Desmoglein-Kompensations-Theorie.....	21
Abbildung 6: Theorie über die Rolle des p38 mitogen-activated protein kinase Signalweges bei der Pathogenese von Pemphigus vulgaris.....	23
Abbildung 7: Klinisches Krankheitsbild von Pemphigus vulgaris.....	24
Abbildung 8: Diagnostik bei Pemphigus vulgaris.....	25
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Aktivierung von Serin-Threonin-Kinasen über <i>second messenger</i>.....	28
Abbildung 10: Übersicht über die PamGene-Technologie.....	30
Abbildung 11: Arbeitsablauf des PamChip-Kinase-Assays.....	31
Abbildung 12: Zellulärer Wirkmechanismus von Glucocorticoiden.....	32
Abbildung 13: Mit Hautproben bestückte Transwell-Platte.....	46
Abbildung 14: Durchführung des humanen Hautorgan-Kulturmodells.....	48
Abbildung 15: Nicht-überlappende Fotos der Epidermis.....	50
Abbildung 16: Ausmessung der epidermalen Spaltbildung.....	50
Abbildung 17: Bindeverhalten des variablen Einzelkettenfragments in menschlicher Haut.....	52
Abbildung 18: Immunfluoreszenz-Färbung von Desmoglein-1 und Desmoglein-3.....	55
Abbildung 19: Kalziumabhängige Differenzierung von Keratinozyten.....	59
Abbildung 20: Beispiel einer Inhibitor-Evaluierung im Keratinozyten-Dissoziations-Assay.....	61
Abbildung 21: Ablauf des Keratinozyten-Dissoziations-Assays.....	62
Abbildung 22: Ausprägungsmuster von Desmoglein-1 und -3 in der Epidermis.....	64
Abbildung 23: Die Injektion des variablen Einzelkettenfragments in die Dermis löst Spaltbildung aus.....	65
Abbildung 24: Hochsignifikanter Unterschied in der prozentualen intraepidermalen Spaltbildung im Hautorgan-Kulturmodell.....	66
Abbildung 25: Beispielhafte Fotos der Färbung des variablen Einzelkettenfragments.....	67
Abbildung 26: Beispielhafte Hämatoxylin-Eosin-Fotos der intraepidermalen Spaltbildung in mit Prednisolon und variablem Einzelkettenfragment behandelten Hautproben.....	68
Abbildung 27: Keine signifikante Reduktion der Spaltbildung durch Injektion von Prednisolon.....	69
Abbildung 28: Beispielhafte Hämatoxylin-Eosin-Fotos der intraepidermalen Spaltbildung in mit Cremes und variablem Einzelkettenfragment behandelten Hautproben.....	70

Abbildung 29: Keine signifikante Reduktion der Spaltbildung durch epidermale Auftragung von Clobetasol-haltiger Creme.....	71
Abbildung 30: Acht Kinasen waren in der Positivkontrolle signifikant aktiver als in der Negativkontrolle.	72
Abbildung 31: Antikörper-Konzentrationsreihe im Keratinozyten-Dissoziations-Assay.	75
Abbildung 32: Die Kinase-Inhibitoren PP2, Saracatinib und SU 6656 hemmen die Fragmentierung des Zell-Monolayers im Keratinozyten-Dissoziations-Assay in allen Konzentrationen.	77
Abbildung 33: Die Kinase-Inhibitoren RK 24466, KX2-391 und PF-573228 hemmen die Fragmentierung des Zell-Monolayers im Keratinozyten-Dissoziations-Assay in allen Konzentrationen.	79
Abbildung 34: PRT062607 zeigt in der höchsten Konzentration eine signifikante Reduktion der Fragmentierung des Zell-Monolayers im Keratinozyten-Dissoziations-Assay, nicht jedoch in den beiden niedrigeren.....	80

2.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Geräte	36
Tabelle 2:	Verwendete Verbrauchsmaterialien	38
Tabelle 3:	Verwendete Reagenzien.....	40
Tabelle 4:	Verwendete Medikamente/Inhibitoren	42
Tabelle 5:	Verwendete Antikörper.....	42
Tabelle 6:	Verwendete Software.....	43
Tabelle 7:	Informationen über die Herkunft der Haut	45
Tabelle 8:	Zeitlicher Ablauf der Antikörper/Prednisolon-Injektion in die Hautproben auf der Transwell-Platte.	47
Tabelle 9:	Behandlungsschema der Haut-Proben im Platten-Layout der topischen Applikation von Clobetasol.	47
Tabelle 10:	Verwendete Lösungen und Antikörper-Verdünnungen für die direkte Immunfluoreszenz-Färbung des variablen Einzelkettenfragments.	51
Tabelle 11:	Verwendete Lösungen und Antikörper-Verdünnungen zur Färbung von Desmoglein-1	53
Tabelle 12:	Verwendete Lösungen und Antikörper-Verdünnungen zur Färbung von Desmoglein-3	54
Tabelle 13:	Verdünnungsschema für das Mikroplatten-Verfahren	57
Tabelle 14:	Auswahl der Kinase-Inhibitoren.....	74

3 Einleitung

3.1 Humane Haut

Die Haut ist das größte Organ des Körpers und stellt mit einer Gesamtfläche von 1,5-2 m² und einem Gewicht von 3,5-10 kg die äußere Begrenzung zur Umwelt dar (**Abb. 1**). Sie bietet Schutz vor Umwelteinflüssen wie mechanischen Reizen, Strahleneinwirkung, chemischen Substanzen, Keimen, Allergenen und Austrocknung. Sie ist außerdem essenziell bei der Thermoregulation und Sinneswahrnehmung des Körpers. Mikroskopisch unterteilt sich die Haut nach außen hin in drei Schichten: Subcutis, Dermis und Epidermis. Diese werden im Folgenden näher beschrieben (Moll et al., 2016).

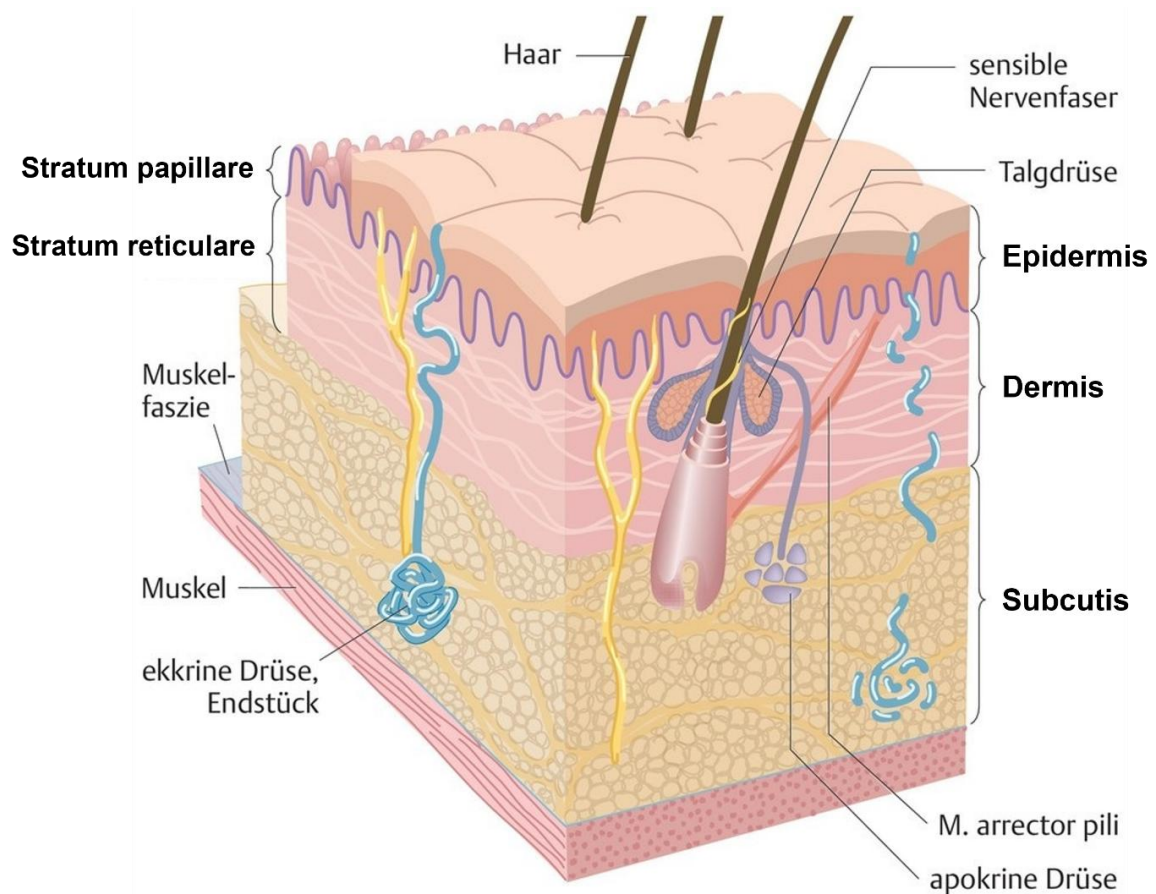


Abbildung 1: Aufbau der Haut. Die Haut unterteilt sich von innen nach außen in drei Schichten: Subcutis, Dermis und Epidermis. Die Subcutis besteht hauptsächlich aus Fett und lockerem Bindegewebe und dient primär der Isolation und dem mechanischen Schutz. Die Dermis ist in Stratum papillare und Stratum reticulare unterteilt und beinhaltet neben Hautanhangsgebilden (Drüsen und Haare) Sinnesrezeptoren und Gefäßgeflechte. Letztere regulieren Temperatur und Blutdruck. Die Epidermis wird ebenfalls in mehrere Schichten unterteilt und stellt den Kontakt zur Außenwelt dar. Modifiziert nach Sterry et al., 2010.

3.1.1 Subcutis, Dermis, Epidermis

Die Subcutis besteht hauptsächlich aus Fettgewebe und lockerem Bindegewebe. Sie fungiert als Schutz vor äußeren mechanischen Einwirkungen, ist von großer Bedeutung für die Temperaturisolation, dient als Energiespeicher und produziert eine Vielzahl von Hormonen. Sie beinhaltet Nerven und Gefäße, welche die oberen Schichten der Haut und andere Strukturen versorgen (Sterry et al., 2014).

Über der Subcutis liegt die Dermis, welche hauptsächlich aus Bindegewebe und Zellen besteht. Die dominierenden Zellen sind die Fibroblasten, welche stark vernetzt sind und die extrazelluläre Matrix synthetisieren. Neben den Fibroblasten findet man verschiedene Immunzellen, welche eine wichtige Rolle bei allergischen, entzündlichen und weiteren immunologischen Prozessen spielen. Histologisch ist die Dermis in zwei Schichten unterteilt, das Stratum papillare und das Stratum reticulare. Das oberflächliche Stratum papillare ist unmittelbar mit der Epidermis verzahnt und beinhaltet den subpapillären Gefäßplexus. Die darin liegenden Arteriolen werden durch den tiefen dermalen Gefäßplexus im Stratum reticulare versorgt, welcher aus kleinen bis mittelgroßen Gefäßen besteht. Diese Gefäßplexus versorgen die oberen Schichten der Haut und dienen der Temperatur- und Blutdruckregulation. Des Weiteren beinhaltet die Dermis Nervenfasern und Sinnesrezeptoren, Haarfollikel mit Talgdrüsen, sowie Schweißdrüsen (Sterry et al., 2018).

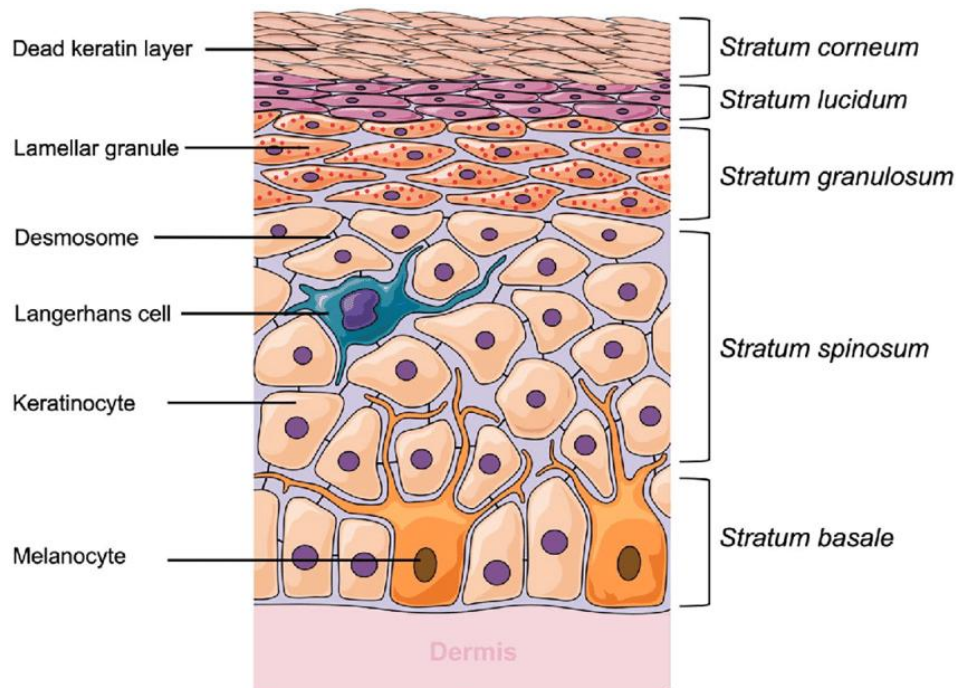


Abbildung 2: Aufbau der Epidermis. Die Epidermis ist in mehrere Schichten unterteilt. Das Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum, Stratum lucidum (in Leistenhaut) und das Stratum corneum. Die vorherrschenden Zellen sind die Keratinozyten, welche untereinander durch Desmosomen verbunden sind. Researchgate, 2021.

Die Epidermis (**Abb. 2**) ist ein mehrschichtig verhorntes Plattenepithel und besteht hauptsächlich aus Keratinozyten. Sie enthält einige Nervenfasern, jedoch keine Gefäße, weshalb ihre Versorgung über Diffusion gewährleistet wird. Die Epidermis ist in mehrere Schichten unterteilt. Der Dermis grenzt das Stratum basale an, in welchem epidermale Stammzellen liegen und eine stetige Regeneration des Epithels gewährleisten. Dort befinden sich auch Melanozyten, welche Melanin an die umliegenden Keratinozyten abgeben und so die Haut ihre Farbe erhält. Dem stachelig aussehende Stratum spinosum und Stratum granulosum folgt die oberste Schicht, das Stratum corneum. Hier befinden sich lediglich kernlose, abgestorbene Keratinozyten, welche über die Zeit abgeschilfert werden. Die Keratinozyten werden untereinander durch multiple Interzellularbrücken zusammengehalten, die Desmosomen (Moll et al., 2016).

3.1.2 Desmosomen

Desmosomen sind interzelluläre Verbindungen, welche in Epithelien und im Herzmuskel vorkommen. Sie sorgen für eine starke Adhäsion zwischen Zellen, wodurch der Zellverband eine hohe Resistenz gegen mechanische Kräfte aufweist. Ein Desmosom besteht aus zwei intrazellulären und einer extrazellulären Komponente (**Abb. 3**).

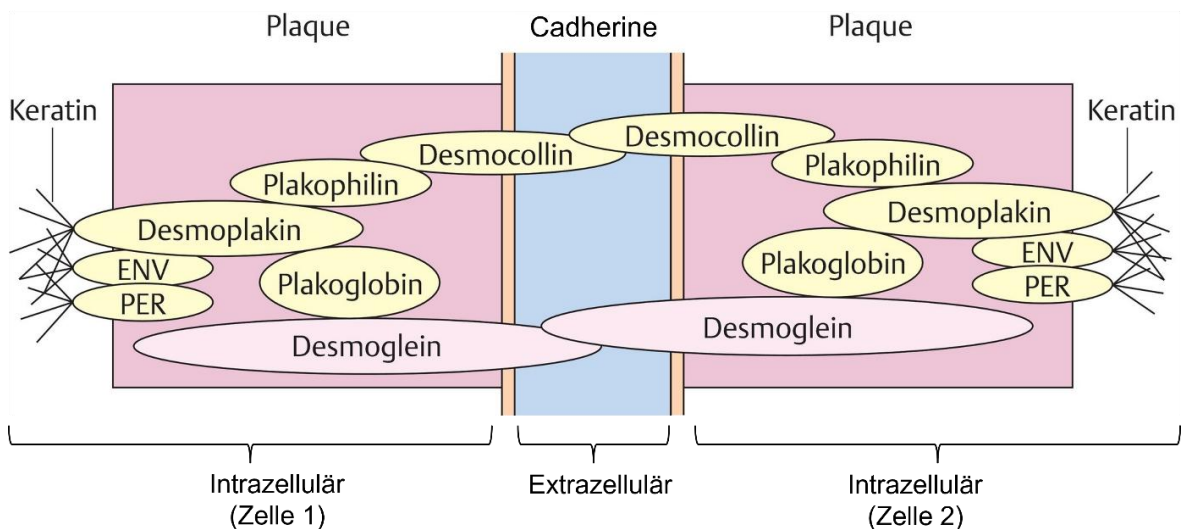


Abbildung 3: Komplexer Aufbau eines Desmosoms. Der Innenseite der Zellmembran liegt ein als Plaque bezeichneter Komplex aus Adapterproteinen (Desmoplakin, Plakoglobin, Plakophilin) an, welche als Vermittler zwischen den Keratinfilamenten des Zytoskeletts und den Cadherinen Desmoglein und Desmocollin fungieren. Die Cadherine sind Transmembranproteine, deren extrazelluläre Domänen miteinander interagieren und so die Zellen untereinander verbinden. ENV = Envoplakin. PER = Periplakin. Modifiziert nach Sterry et al., 2014.

Auf intrazellulärer Seite sind das ein der Zellmembran anliegender Proteinkomplex, auch Plaque genannt, und Intermediärfilamente des Zytoskeletts, welche in der Haut aus Keratin bestehen und in diesen Proteinkomplex inserieren. Zu diesem Komplex gehören die Proteine Plakophilin, Plakoglobin und Desmoplakin (auch Adapterproteine genannt), wobei letzteres eine

entscheidende Rolle einnimmt, da es als Bindeglied zwischen Intermediärfilamenten und Plaque fungiert (Moll et al., 2016). Die extrazelluläre Komponente des Desmosoms wird von Transmembranproteinen gebildet, welche zur Familie der Cadherine gehören und die eigentliche Verbindung zwischen den Zellen herstellen. Die beiden Vertreter dieser Familie sind Desmoglein (Dsg) und Desmocollin (Dsc). Während ihre C-terminale Domäne im Plaque lokalisiert ist, verbinden die N-terminalen Domänen die beiden Hälften des Desmosoms im Interzellularraum miteinander (Garrod and Chidgey, 2008). Diese Cadherin-Cadherin-Wechselwirkung wird durch extrazelluläres Calcium gesteuert, durch welches die extrazellulären Cadherin-Domänen versteift und die Zell-Zell-Adhäsion gefördert werden. Bei schneller Entfernung des extrazellulären Calciums kommt es zum plötzlichen, teilweisen Verlust dieser Wechselwirkung (Kim et al., 2011). Der extrazelluläre Anteil der Cadherine setzt sich aus 5 Domänen (ECs) zusammen (EC1 - EC5), welche jeweils aus ca. 110 Aminosäureresten besteht. Während die N-terminalen Domänen EC1 und EC2 eine zentrale Rolle in der adhäsiven Wechselwirkung spielen, dienen EC3 – EC5 der Aufrechterhaltung der Struktur der Moleküle (Oda and Takeichi, 2011). Beim Menschen gibt es drei Dsc- (Dsc1-3) und vier Dsg-Isoformen (Dsg1-4). Diese werden alle in der Epidermis exprimiert, jedoch in verschiedenen Expressionsmustern. Während Dsg1 und Dsc1 eher in den oberen Schichten der Epidermis exprimiert sind, kommen Dsg3 und Dsc3 eher in den tiefen Schichten vor (Amagai et al., 1996). Dsg2 und Dsc2 wird in allen desmosomhaltigen Geweben exprimiert. Dsg4 findet man ebenfalls in den oberen Schichten der Epidermis, sowie in Haarfollikeln (Bazzi et al., 2006). Bei der Autoimmunerkrankung Pemphigus vulgaris (PV) werden Antikörper gegen Dsg1 und Dsg3 gebildet, was zum Verlust der Zell-Adhäsion und damit zur Blasenbildung führt (Porro et al., 2019).

3.2 Antikörper und das variable Einzelkettenfragment

Antikörper werden auch als Immunglobuline (Ig) bezeichnet und gehören zu den humoralen Anteilen des adaptiven Immunsystems. Sie werden in fünf Klassen eingeteilt: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Ihre Aufgabe besteht in der Markierung (Opsonierung) von Pathogenen und Neutralisation von Antigenen. Sie werden von Plasmazellen produziert, welche aus aktivierten B-Lymphozyten entstehen. Die Bindung von Antikörper und Antigen ist hochspezifisch (via medici, Thieme, 2021).

Strukturell bestehen Antikörper aus zwei schweren (H) und zwei leichten (L) Ketten, welche sich über Disulfidbrücken Y-förmig zusammenfügen (**Abb. 4**). H-Ketten weisen eine N-terminale variable (V) Domäne und drei bis vier C-terminale konstante (C) Domänen auf, während L-Ketten nur aus einer V- und einer C-Domäne bestehen. Jede Domäne besteht aus 2 antiparallel verlaufenden β -Faltblättern mit ca. 110-130 Aminosäuren, welche durch eine Disulfidbrücke

zusammengehalten werden. Die V-Domäne einer H- und L-Kette bilden zusammen eines von zwei Antigen-bindenden Fragmenten (Fab), welche hochspezifisch Antigene binden. Die C-Domänen der H-Kette bilden das *crystalline* Fragment (Fc), welches die Effektorfunktion vermittelt, indem es an den F_c-Rezeptor von Phagozyten bindet und das Komplementsystem aktiviert (Schroeder and Cavacini, 2010). Insgesamt hat ein IgG eine Masse von 150 kDa.

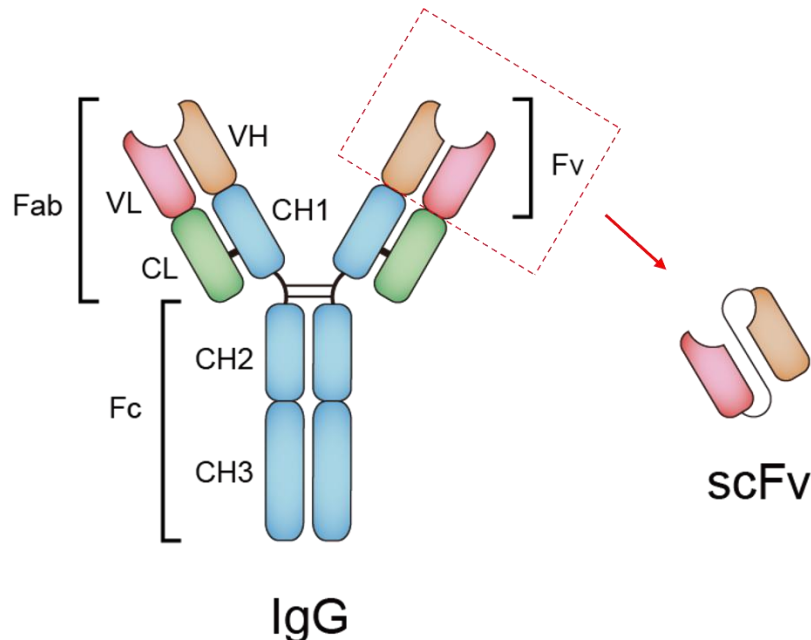


Abbildung 4: Aufbau eines Immunglobulins und eines variablen Einzelkettenfragments. Gezeigt ist ein Immunglobulin G (IgG) und ein variables Einzelkettenfragment (scFv). Das scFv besteht lediglich aus den variablen Domänen einer leichten und einer schweren Kette (VL und VH) eines Ig und ist monovalent. Fab = *Antigen binding fragment*. Fc = *Crystallizable fragment*. Fv = *Variable fragment*. CL = *Constant domain light chain*. CH1-3 = *Constant domain heavy chain*. Modifiziert nach Creative Biolabs, 2021.

Ein variables Einzelkettenfragment (scFv) ist die kleinste Einheit eines konventionellen Ig mit vollständig funktionstüchtiger Antigenbindungsaktivität. Es ist ein Fusionsprotein, das aus der V-Domäne einer H- und einer L-Kette besteht, welche über einen flexiblen Peptidlinker miteinander verbunden sind (Ahmad et al., 2012). In dieser Arbeit wurde ein bi-spezifischer Anti-Dsg1/3 scFv verwendet, welcher mittels eines Antikörper-Phagen-Displays aus Lymphozyten hergestellt wurde, welche zuvor aus dem Blut eines Patienten mit akutem aktiven mukokutanem PV mit Anti-Dsg1 & 3 Antikörpern isoliert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Injektion dieses scFv sowohl in muriner als auch humaner Haut zur Akantholyse führt (Payne et al., 2005; Burmester et al., 2020). Beim Antikörper-Phagen-Display wird die den Lymphozyten entnommene mRNA in cDNA umgeschrieben, aus welcher die Gene der V-Domäne der H- und L-Kette vervielfältigt werden. Diese Gene werden mit einem Phagen-Vektor ligiert und in *Escherichia coli* Bakterien eingeführt, welche lösliche scFv-Moleküle exprimieren (Lennard, 2001; Hammers and Stanley, 2014; Ledsgaard et al., 2018). Die scFv wurden durch auf *enzyme-linked immunosorbent assay*

(ELISA) -Platten immobilisiertes Dsg1 und Dsg3 selektiert. Es gibt mehrere Vorteile von durch Phagen hergestellten scFv gegenüber monoklonalen Antikörpern. Die Phagen sind sehr stabil und können bei 4 °C über mehrere Jahre gelagert werden, sind durch Infektion von *Escherichia coli* sehr kostengünstig herzustellen und ihre Gene lassen sich schnell und einfach modifizieren. Mit einer Masse von ca. 30 kDa weist das scFv im Gegensatz zu IgG eine deutlich schnellere Diffusion in den extravaskulären Raum auf und hat ein erhöhtes Verteilungsvolumen, was es besonders interessant für *in vivo* Diagnostik und Therapie macht (Huston et al., 1991; Ahmad et al., 2012).

3.3 Pemphigus vulgaris

Pemphigus ist eine Gruppe von Autoimmunerkrankungen, bei denen hauptsächlich IgG-Autoantikörper gegen Haut und Schleimhäute gebildet werden, was zum Verlust der Zelladhäsion und damit zu Blasenbildung führt (Kasperkiewicz et al., 2017). Es werden zwei Hauptformen unterschieden: PV und Pemphigus foliaceus (PF). PV stellt mit etwa 70 % der Fälle die häufigste Form dar. Frauen sind häufiger betroffen und das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 40 – 60 Jahren, wobei auch Kinder betroffen sein können (Joly and Litrowski, 2011; Alpsoy et al., 2015). Die Inzidenz variiert stark in verschiedenen geografischen Regionen und ethnischen Gruppen. Sie reicht von ca. 0,5 Neuerkrankungen/Millionen Einwohner/Jahr in Deutschland, über 16,1/Millionen Einwohner/Jahr in Israel (Pisanti et al., 1974; Bertram et al., 2009).

3.3.1 Pathogenese

Bei PV liegen Autoantikörper gegen die Desmoglein-Isoformen Dsg1 und Dsg3 vor, was zur Destabilisierung der Desmosomen und damit zum Verlust der Zell-Zell-Adhäsion führt. Bei mukosalem (Schleimhaut) Erkrankungsmuster liegen Antikörper gegen Dsg3 vor, wohingegen ein mukokutanes (Haut und Schleimhäute) Erkrankungsmuster mit Autoantikörpern gegen Dsg1 und Dsg3 einhergeht (Amagai, 1999; Hammers and Stanley, 2016). Bei PF liegen Autoantikörpern gegen Dsg1 vor (Amagai et al., 1999). Die Antikörper greifen am häufigsten die N-terminalen Domänen EC1 und EC2 der Dsg an, welche die Zell-Zell-Adhäsion vermitteln (vgl. Kap. 2.1.2).

Wie die Bindung der Antikörper an Dsg zum Verlust der Zell-Zell-Adhäsion führt, ist noch nicht vollständig verstanden, jedoch existieren verschiedene Erklärungsmodelle. Diese können alle zur Pathophysiologie von PV beitragen, ohne sich gegenseitig auszuschließen (Pan et al., 2011).

3.3.1.1 Desmoglein-Kompensationstheorie

Das klinische Bild von PV lässt sich auf ein unterschiedliches Expressionsmuster der Dsg-Isoformen zurückführen. In der Haut wird Dsg1 verstärkt in den oberen Schichten der Epidermis exprimiert, während Dsg3 in den unteren Schichten vorherrschend ist. In Schleimhäuten werden ebenfalls

beide Isoformen exprimiert, Dsg1 jedoch in einer viel geringeren Konzentration als Dsg3. Auf diesem Verteilungsmuster basiert die Theorie der Desmoglein-Kompensation (**Abb. 5**) (Amagai, 1999).

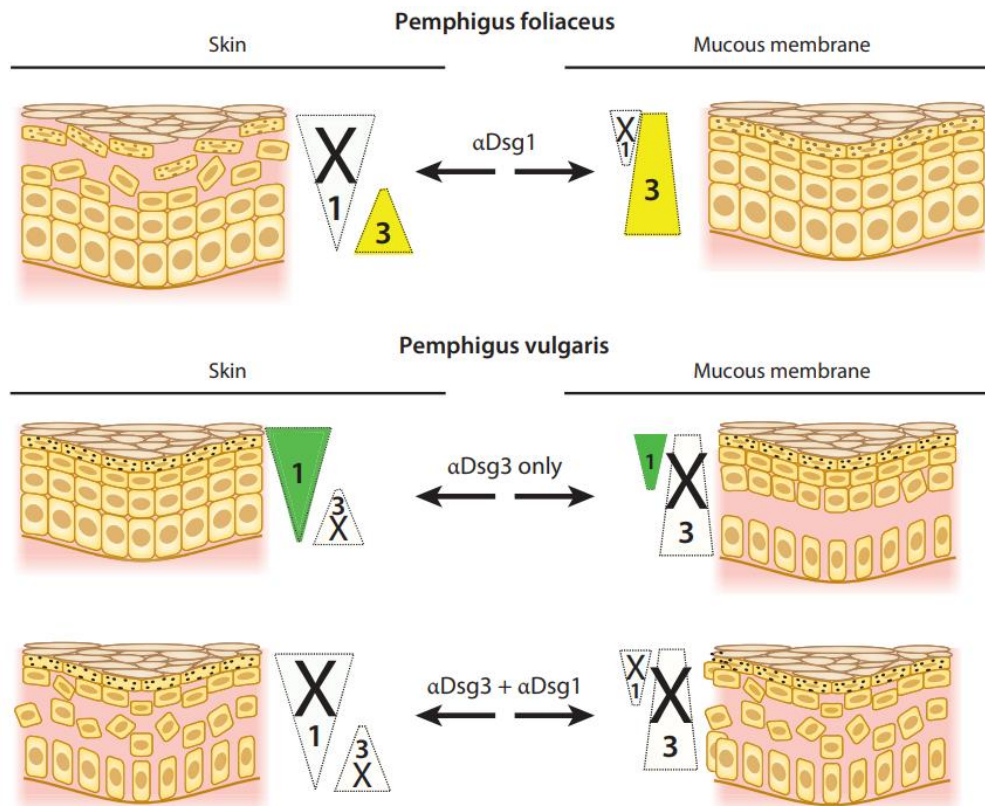


Abbildung 5: Desmoglein-Kompensations-Theorie. Gezeigt ist das unterschiedliche Expressionsmuster von Desmoglein (Dsg)1 und Dsg3 in Haut und Schleimhaut. Während Dsg3 hauptsächlich in den basalen Schichten der Epidermis exprimiert ist (gelbe Dreiecke), ist Dsg1 hauptsächlich in den oberen Schichten zu finden (grüne Dreiecke). Kommt es durch Anti-Dsg-Antikörper (α Dsg) zur Dysfunktion einer der Dsg-Isoformen (graue Dreiecke mit X), kann der Verlust durch das Vorhandensein der jeweils anderen Isoform kompensiert werden und es entsteht keine Blase. Bei fehlendem Vorliegen der anderen Isoform, kann eine Dysfunktion nicht kompensiert werden und es kommt zur Blasenbildung. Hammers and Stanley, 2016.

Sie besagt, dass das Vorhandensein einer der Isoformen ausreicht, um die Integrität der Haut und Schleimhaut zu erhalten, und dass sich Dsg1 und Dsg3 durch Koexprimierung in derselben Zelle kompensieren können (Mahoney et al., 1999). So ist beim Vorliegen von Anti-Dsg3-Antikörpern lediglich die Schleimhaut von Blasenbildung betroffen, da dort die Dsg1-Konzentration für eine Kompensation zu gering ist. In der Haut hingegen kann eine isolierte Dsg3-Dysfunktion von Dsg1 kompensiert werden und es entstehen keine Blasen. Liegen allerdings Antikörper gegen Dsg1 und Dsg3 vor, kommt es in Haut und Schleimhaut zur Blasenbildung.

Histologisch ist die Blasenbildung bei PV in den basalen Schichten der Epidermis zu beobachten, was möglicherweise auf schwächere Zell-Zell-Verbindungen mit weniger Desmosomen als in den oberen Schichten zurückzuführen ist. Auch könnte ein besserer Zugang der aus der Dermis

kommenden Antikörper ursächlich sein (Amagai, 1999). Bei PF, wo nur Anti-Dsg1-Antikörper vorliegen, ist ausschließlich die Haut betroffen und der Adhäsionsverlust zwischen den Keratinozyten präsentiert sich histologisch in den Dsg1-reichen oberen Schichten der Epidermis (Stanley and Amagai, 2006).

3.3.1.2 Antikörper als sterisches Hindernis

Die Autoantikörper gehören überwiegend der IgG4-Unterklasse an, welche das Antigen nicht vernetzen und somit funktionell monovalent sind. Außerdem aktivieren sie nicht das Komplementsystem und ihr Fc-Fragment aktiviert nur schlecht Immuneffektorzellen (Aalberse and Schuurman, 2002). Mausexperimente haben gezeigt, dass sowohl bivalente Antikörper, als auch monovalente Fab-Fragmente, Blasenbildung auslösen können (Rock et al., 1990). Auch kann ein monovalentes scFv sowohl bei Mäusen, als auch im humanen Hautorgan-Kulturmodell, die Erkrankung auslösen (Payne et al., 2005; Ishii et al., 2008; Burmester et al., 2020). Das zeigt, dass bei der Pathophysiologie von PV, der Fc-Fragment-vermittelte Effekt irrelevant zu sein scheint und dass die Antikörper direkt die Akantholyse auslösen, was als „Modell der sterischen Hinderung“ bezeichnet wird (Sharma et al., 2007).

Die Theorie der Krankheitsauslösung durch direkte Störung der Dsg-Wechselwirkung wird dadurch bekräftigt, dass die dominant bindenden Epitope von PV-Antikörpern die extrazellulären N-terminalen Domänen von Dsg1 und Dsg3 darstellen (Sekiguchi et al., 2001) und dass diese direkt die *trans*-Interaktion von Dsg3-Molekülen zu stören scheinen, welche die Zell-Zell-Adhäsion von Nachbarzellen vermittelt (Heupel et al., 2008; Saito et al., 2012). Antikörper, welche Epitope in den mittleren und C-terminalen Abschnitten der extrazellulären Dsg3-Domänen binden, fehlt hingegen die pathogene Aktivität (Tsunoda et al., 2003).

3.3.1.3 Hypothese der *Desmoglein-Depletion*

Neben dem „Modell der sterischen Hinderung“ wird die Dsg-Depletion-Hypothese als Teil der Pathogenese von PV diskutiert. Nach diesem Modell kommt es durch bivalente PV-Antikörper zur Vernetzung und Verklumpung von Dsg, was zur Internalisierung von desmosomalem und nicht-desmosomalem Dsg führt und den Einbau von neu synthetisiertem Dsg in Desmosomen verhindert, woraus Dsg-verarmte Desmosomen und damit ein Verlust der Zell-Adhäsion resultiert (Oktarina et al., 2011; Hammers and Stanley, 2016). Für Dsg3 konnte gezeigt werden, dass es gemeinsam mit den PV-IgG von den Keratinozyten mittels Endozytose aufgenommen, gespalten und abgebaut wird, was in einer deutlichen Verringerung der Dsg3-Konzentration auf der Zelloberfläche resultiert (Calkins et al., 2006; Cirillo et al., 2008). Sogar monovalente monoklonale Antikörper sind in der Lage, die Internalisierung und den Abbau von neu synthetisiertem Dsg3 zu induzieren und somit die desmosomalen Strukturen zu destabilisieren (Mao et al., 2009).

3.3.1.4 Signalmoleküle und Stoffwechselwege

Es sind außerdem zahlreiche Signalmoleküle und Stoffwechselwege mit der Pathogenese der Akantholyse bei PV in Verbindung gebracht worden. Einer davon ist der p38 *mitogen-activated protein kinases* (p38MAPK) Signalweg. Es konnte dessen direkte Aktivierung durch PV-IgG gezeigt, sowie ein Zusammenhang des Signalweges mit der Internalisierung von Dsg3 feststellen werden (**Abb. 6**). Auch kann durch eine Inhibition des p38MAPK Signalweges diese Internalisierung verhindert werden (Jolly et al., 2010). Ebenso führt eine exogene p38MAPK Aktivierung zur Internalisierung von Dsg3. Ein der p38MAPK nachgeschalteter Effektor ist die MAPKAP Kinase 2 (MK2), welche auch durch PV-IgG aktiviert wird und durch deren Hemmung ebenso eine Dsg3-Endozytose unterdrückt werden kann (Mao et al., 2014).

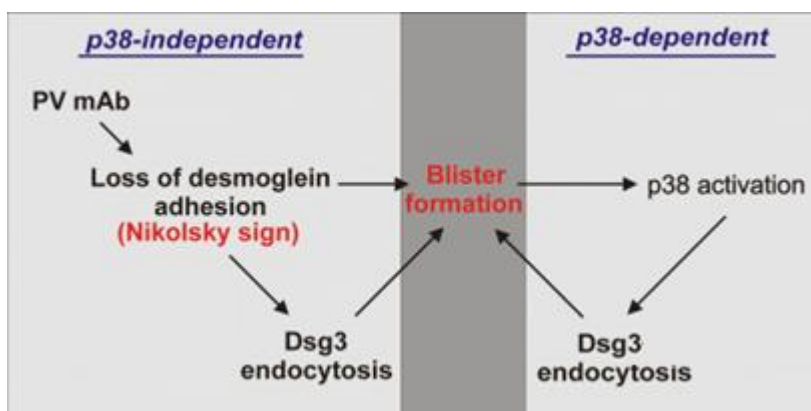


Abbildung 6: Theorie über die Rolle des p38 mitogen-activated protein kinase Signalweges bei der Pathogenese von Pemphigus vulgaris. Bei scheint bei der Bindung von Pemphigus vulgaris (PV) monoklonalen Antikörpern (mAb) an Desmoglein (Dsg) zum direkten Verlust der Zell-Zell-Adhäsion zu kommen. Zusätzlich wird eine p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) - unabhängige Dsg3-Endozytose ausgelöst. Die daraus resultierende Blasenbildung scheint den p38MAPK-Signalweg zu aktivieren, was wiederum eine p38MAPK-abhängige Internalisierung von Dsg3 von der Zelloberfläche auslöst und so die Blasenbildung fördert. Modifiziert nach Mao et al., 2011.

Wird allerdings die Dsg3-Endozytose von Dsg1 kompensiert und so eine Blasenbildung verhindert, wird p38MAPK nicht aktiviert. Eine zusätzliche Inaktivierung von Dsg1 durch exfoliatives Toxin, nicht aber das Toxin allein, aktiviert hingegen den p38MAPK Signalweg. Auch haben Mausversuche gezeigt, dass p38MAPK Knockout Mäuse, welche mit pathogenen monoklonalen Dsg3-Antikörpern behandelt wurden, Blasen bilden. Das legt nahe, dass der Signalweg für den Verlust der Zell-Adhäsion nicht unbedingt notwendig ist, allerdings die Blasenbildung über Dsg3-Endozytose verstärken kann (Mao et al., 2011). Diese Theorie wird von Experimenten in Zellkultur und menschlicher Haut gestützt, die gezeigt haben, dass die Hemmung von p38MAPK den Verlust der Zell-Adhäsion durch polyklonale PV-IgG verhindern kann, nicht jedoch den durch pathogene monoklonale Antikörper (Saito et al., 2012).

Ein der p38MAPK nachgeschaltete Molekül ist der *epidermal growth factor receptor* (EGFR). es gehört zu den transmembranöse Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und spielt eine tragende Rolle in der Keratinozytenproliferation und -differenzierung (Schneider et al., 2008). Durch die Bindung von PV-IgG kann dieser p38MAPK-abhängig aktiviert werden, was wiederum in eine Dsg3-Endozytose mündet. In Mausexperimenten konnte gezeigt werden, dass eine EGFR-Inhibition die Blasenbildung unterdrückt (Bektas et al., 2013).

Ebenso zu Pathogenese von PV trägt das Protoonkogen c-Myc bei. Bei Aktivierung führt es in epidermalen Stammzellen zur Rekrutierung und Differenzierung. Es wird normalerweise von Plakoglobin unterdrückt. Durch PV-IgG kommt es zum Untergang von Dsg3 und auch von Plakoglobin. Dadurch wird c-Myc enthemmt, was eine Schwächung der Zell-Adhäsion verursacht (Williamson et al., 2006).

Weitere Signalkaskaden, welche mit der Pathogenese von PV in Verbindung gebracht werden, sind die Rho-A-GTPase (Waschke et al., 2006), Caspasen (Li et al., 2009) und Mitochondrien (Chen et al., 2015).

3.3.2 Symptome

Klinisch kann sich PV sowohl an den Schleimhäuten als auch an der Haut manifestieren (**Abb. 7**). Die Läsionen beginnen klassischerweise an den Schleimhäuten, hauptsächlich im Mund- und Gaumenbereich, an den Lippen und am Zahnfleisch und können sich auf die Haut ausdehnen.

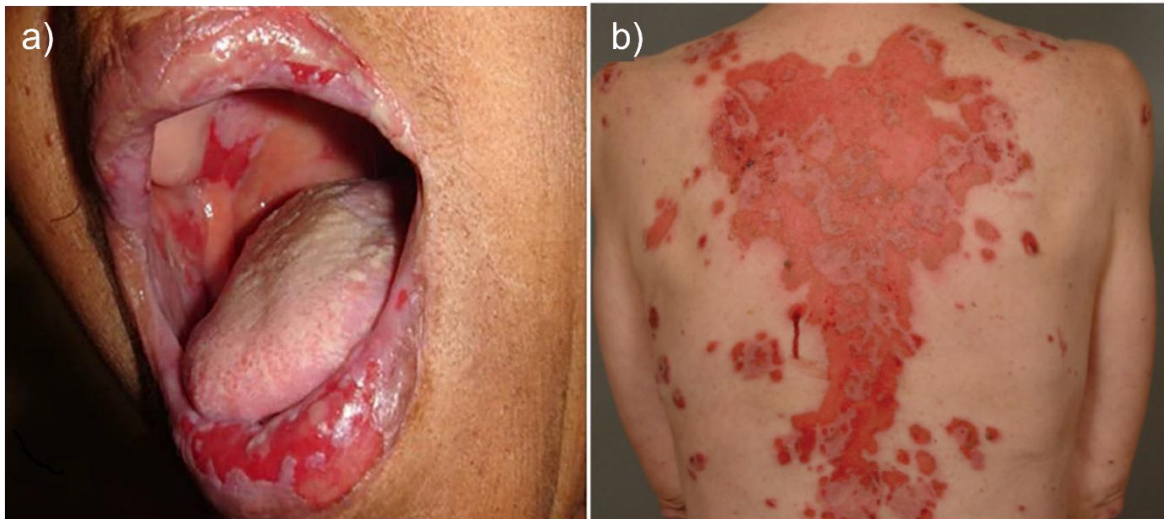


Abbildung 7: Klinisches Krankheitsbild von Pemphigus vulgaris. a) Schmerzhafte Läsionen der Mundschleimhaut sind ein häufiges Erscheinungsbild. **b)** Großflächige Erosionen der Haut. Bilder modifiziert nach (Porro et al., 2019) (a); (Hammers and Stanley, 2016) (b).

Sie sind durch sehr schmerzhafte, teils großflächige Erosionen gekennzeichnet, welche nur langsam reepithelisieren. Orale Läsionen erschweren die Nahrungsaufnahme und können zu Gewichtsverlust und Unterernährung führen. Andere Schleimhäute (Bindehaut, Nase,

Speiseröhre, Vagina, Penis, Anus) können ebenfalls betroffen sein. Zusätzlich kann Blasenbildung an der Haut auftreten, was sich häufig an Rumpf, Leiste, Achseln, Kopfhaut und Gesicht manifestiert. Dabei werden häufig schlaffe Blasen auf geröteter Haut beobachtet, welche leicht einreißen und schmerzhafte Erosionen verursachen. Bei Ausheilung können Pigmentveränderungen beobachtet werden, eine Narbenbildung bleibt meistens aus (Porro et al., 2019; Kasperkiewicz et al., 2017).

3.3.3 Diagnostik

Als diagnostische Mittel dienen neben klinischen Tests (Nikolski-Phänomen) die Histologie (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) und die Immunhistologie (direkte und indirekte Immunfluoreszenzfärbung) von periläsionalen Hautbiopsien (**Abb. 8**).

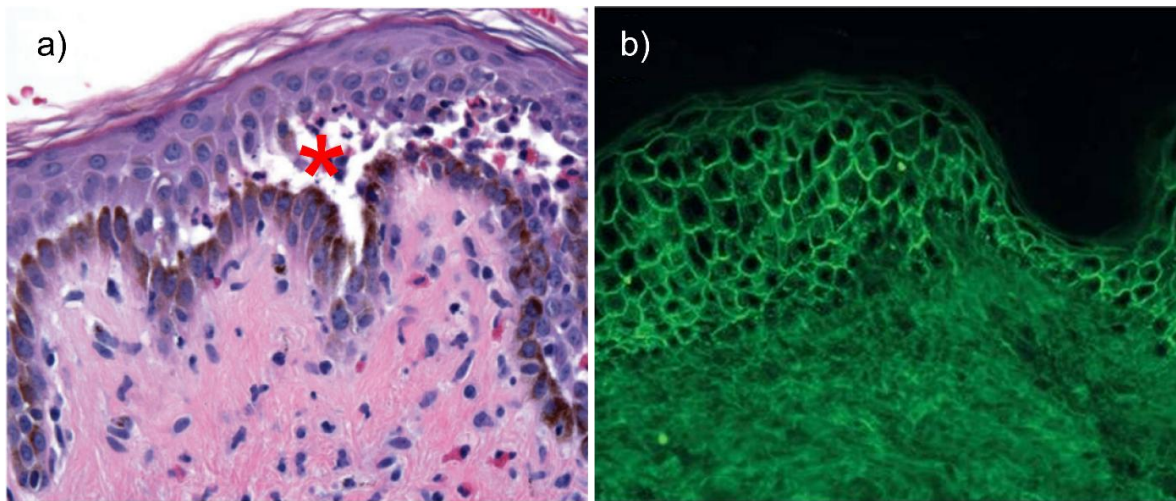


Abbildung 8: Diagnostik bei Pemphigus vulgaris. a) Die Histologie zeigt suprabasale Blasenbildung (roter Stern). b) Mittels direkter Immunfluoreszenz können in der Epidermis gebundene Pemphigus vulgaris Immunglobulin G nachgewiesen werden. Bilder modifiziert nach (Hammers and Stanley, 2016) (a); (Kasperkiewicz et al., 2017) (b).

Histologisch präsentiert sich ein Verlust der Zell-Adhäsion bei PV in den unten Schichten der Epidermis, wo es über der Basalzellschicht zur Spaltbildung kommt. Bei allen Patienten können mittels direkter Immunfluoreszenz in der Epidermis gebundene PV-IgG nachgewiesen werden. Bei mehr als 80 % der PV-Patienten können mittels indirekter Immunfluoreszenz zirkulierende PV IgG nachgewiesen werden. Diese können mittels ELISA spezifisch analysiert und nachgewiesen werden, was für die Diagnosestellung obligat ist (van Beek et al., 2017).

3.3.4 Therapie

Die aktuelle Therapie für PV kann der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften S2k-Leitlinie aus dem Jahr 2019 mit dem Titel „Diagnostik und Therapie des Pemphigus vulgaris / foliaceus und des bullösen Pemphigoids - AWMF-Register-Nr.: 013-071“ entnommen werden. Zur initialen Behandlung von PV wird eine systemische Therapie mit oralen

Corticosteroiden empfohlen, welche mit einem anderen immunsuppressiven Präparat kombiniert werden sollte. Einige klinische Studien konnten durch die kombinierte Gabe Hinweise auf einen steroideinsparenden Effekt bei PV geben. Dafür in Frage kommen Azathioprin, Mycophenolat mofetil und Mycophenolsäure. Bei schweren Verläufen kann das Corticosteroid mit einem monoklonalen *Anti-Clusters of Differentiation* (CD) 20-Antikörper (z.B. Rituximab) kombiniert werden. Dieser führt zur Depletion von CD20-positiven B-Zellen aus dem peripheren Blut. Eine Meta-Analyse hat gezeigt, dass bei 80-90 % der PV-Patienten durch Rituximab-Behandlung eine komplette Remission erreicht werden konnte (Ahmed and Shetty, 2015). Auch hat Joly *et al.* 2017 eine klare Überlegenheit von Rituximab in Kombination mit kurzfristiger Gabe von Prednisolon im Vergleich zur alleinigen Therapie mit Prednisolon aufgezeigt. Alternativ zur täglichen oralen Corticosteroidgabe kann eine hochdosierte intravenöse (i.v.) Pulstherapie an drei aufeinanderfolgenden Tagen (z.B. Dexamethason) durchgeführt werden. Bei besonders schweren Verläufen und Therapierefrakterität wird eine Therapie mit intravenösen Immunglobulinen (IVIG) in 4-6-wöchigen Abständen empfohlen, sowie Immunapherese in 4-wöchigen Abständen. Calcineurininhibitoren können zur topischen Behandlung lokaler Erosionen erwogen werden. Für die Anwendung von topischen Corticosteroiden gibt es bisher keine Studiendaten. Generell zielt die Therapie von PV auf eine allgemeine Suppression des Immunsystems ab, was viele Nebenwirkungen mit sich bringt und die Notwendigkeit nach spezifischen Behandlungsmethoden deutlich macht.

3.4 Proteinkinasen

Proteinkinasen sind eine der größten Enzym-Superfamilien. Etwa 2 % der eukaryotischen Gene kodieren für 518 bekannte Proteinkinasen, wobei die Summe aller Kinasen in einer Zelle Kinom genannt wird (Manning *et al.*, 2002; Manning, 2005). Sie katalysieren die Phosphorylierung von Proteinen, wodurch deren Funktion auf fast jede denkbare Weise verändert werden kann und nehmen so eine herausragende regulatorische Rolle bei fast allen Aspekten der Zellbiologie ein (Roskoski, 2015). Bis zu 30 % aller zellulären Proteine werden dadurch in ihrer Aktivität, Lokalisation und Affinität modifiziert, wodurch die meisten zellulären Prozesse, wie die Koordination komplexer Signalwege und Signaltransduktion, koordiniert werden. Kinasen übertragen dabei die gamma-Phosphat-Gruppe von einem Nucleosidtriphosphat (NTP), meistens Adenosintriphosphat (ATP), auf die Hydroxygruppe (OH-Gruppe) der Aminosäurereste Tyrosin, Serin oder Threonin des Proteinsubstrates. Damit gehören sie zur Enzymklasse der Transferasen (Shen *et al.*, 2005). Zwei Hauptklassen werden unterschieden: solche, die Tyrosin phosphorylieren, und solche, die Serin und Threonin phosphorylieren, abgesehen von wenigen

bispezifischen Proteinkinasen, welche beide Gruppen phosphorylieren (z.B. MAP2K) (Taylor et al., 1995). Gegenspieler der Proteinkinasen sind die Proteinphosphatasen, welche das Gleichgewicht zwischen phosphorylierten und dephosphorylierten Proteinen aufrechterhalten. Sie katalysieren die hydrolytische Abspaltung des Phosphatrestes von Proteinen. Ein Vertreter ist die Proteinphosphatase 1 (PP1), welche in Zellen reichlich vorhanden ist und zahlreiche Dephosphorylierungen katalysiert (Bertolotti, 2018).

3.4.1 Protein-Tyrosin-Kinasen

Es gibt zwei Klassen von Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK): rezeptorgebundene, transmembranöse PTK (RTK) und freie, nichtrezeptorgebundene PTK (NRTK). Bindet ein spezifischer Ligand an die extrazelluläre Rezeptor-Domäne einer RTK, ändert der Rezeptor seine Konformation und dimerisiert.

Dadurch werden Tyrosin-Reste des Rezeptors selbst (Autophosphorylierung) oder von stormabwärts gelegenen Signalproteinen phosphoryliert, wodurch das Signal nach intrazellulär transduziert wird (Hubbard and Till, 2000). Sie sind Schlüsselregulatoren kritischer zellulärer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Zellüberleben, Zellmigration und Zellzykluskontrolle (Lemmon and Schlessinger, 2010). Über RTK werden Signale von Wachstumsfaktoren vermittelt, weshalb diese streng reguliert werden müssen, da es im Falle einer Mutation mit desregulierter Kinaseaktivität zur malignen Transformation kommen kann (Blume-Jensen and Hunter, 2001).

NRTK sind integrierte Komponenten der durch RTK oder anderen Rezeptoren, wie z.B. G-Proteingekoppelte Rezeptoren oder Rezeptoren des Immunsystems, ausgelösten Signalkaskaden. Die größte Subfamilie der NRTK ist die Src-Familie und umfasst elf Mitglieder. Diese spielt eine wichtige Rolle in Zelldifferenzierung, -proliferation und -überleben. So kommt es z.B. bei Proliferation, stimuliert durch den EGFR, zur Aktivierung von Src. Auch spielt er eine Rolle bei Zelladhäsion, -morphologie, -beweglichkeit und Knochenresorption. So ist z.B. die *focal adhesion kinase* (FAK) ein fokales Adhäsionsprotein und ein Substrat von Src. Auch leiden Src-defiziente Mäuse an Osteopetrose (erhöhte Knochendichte) (Roskoski, 2004). NRTK sind auch wichtige regulatorische Komponenten des Immunsystems. Die JAK-Subfamilie ist mit der zytoplasmatischen Domäne von Zytokin-Rezeptoren, wie den Interferon- γ Rezeptor, assoziiert und ist an der Pathogenese von entzündlichen und Autoimmunerkrankungen beteiligt. Bei Bindung eines Zytokins an seinen Rezeptor, werden Rezeptor-assoziierte JAK aktiviert, wodurch STATs (Transkriptionsfaktoren) phosphoryliert werden, welche für Zytokin-spezifische genetische Programme entscheidend sind (Banerjee et al., 2017). Auch die Signalgebung von aktivierten B- und T-Lymphozyten ist von multiplen NRTK abhängig. So ist Lck (Mitglied der Src-Familie) mit CD4 und CD8 Rezeptoren von T-Lymphozyten assoziiert. Bei Ligandenbindung wird Lck phosphoryliert,

was wiederum die NRTK Zap70 rekrutiert, welche stromabwärts die Aktivierung der Transkription von Zytokin-Genen vermittelt (Gaud et al., 2018). Ebenso wird bei Stimulation des B-Zell-Rezeptors Lyn (Mitglied der Src-Familie) aktiviert, was zur Rekrutierung und Phosphorylierung von Syk, einer mit Zap70 verbundenen NRTK, führt.

3.4.2 Serin-Threonin-Kinasen

Die Serin-Threonin-Kinasen (STK) unterliegen ebenfalls komplexen Regulationsmechanismen. In **Abb. 9** sind mit der Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase B (PKB) und der Proteinkinase C (PKC) kannte Vertreter gezeigt.

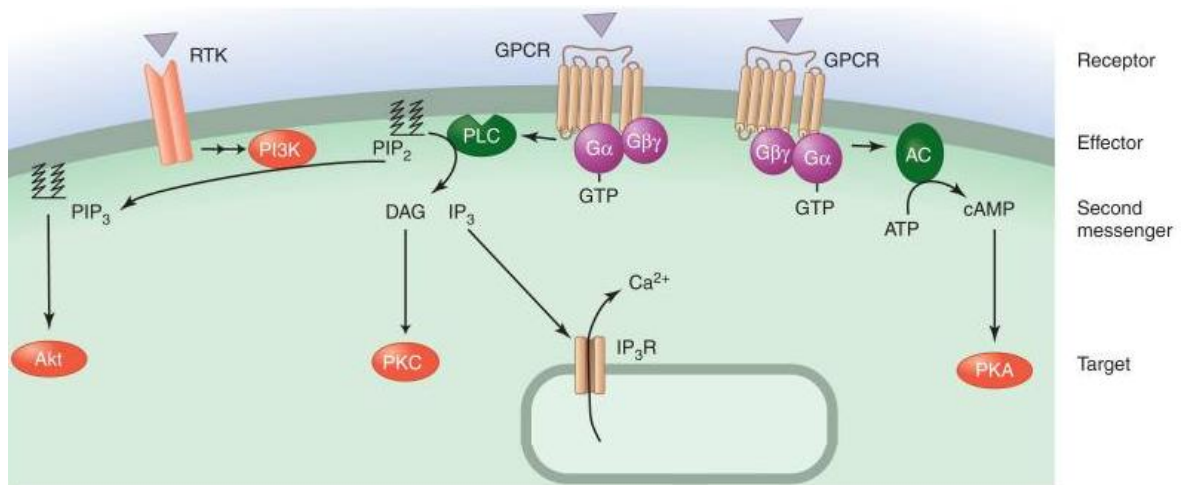


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Aktivierung von Serin-Threonin-Kinasen über *second messenger*. Zahlreiche Serin-Threonin-Kinasen (STK) werden über *second messenger* aktiviert. Hier eine beispielhafte Darstellung der aktivierenden Signalkaskade dreier sehr bekannter STK: Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC) und Akt (Proteinkinase B). Bindet ein extrazellulärer Ligand an einen Rezeptor, wird ein Effektor aktiviert, welcher *second messenger* herstellt. Diese aktivieren die STK. AC = Adenylatcyclase. ATP = Adenosintriphosphat. Ca^{2+} = Calcium. cAMP = cyclisches Adenosinmonophosphat. DAG = Diacylglycerat. $G\alpha$ = G alpha subunit. $G\beta\gamma$ = G beta-gamma complex. GPCR = G-Protein-gekoppelter Rezeptor. GTP = Guanosintriphosphat. IP_3 = Inositoltriphosphat. PI3K = Phosphoinositid-3-Kinase. $PIP_{2/3}$ = Phosphatidylinositol-bisphosphat/triphosphat. PLC = Phospholipase C. RTK = Rezeptor-Tyrosin-Kinase. Modifiziert nach (Newton et al., 2016).

Diese, und viele weitere Vertreter dieser Gruppe, werden aktiviert über sogenannte *second messenger*, welche intrazellulär als Reaktion auf einen extrazellulär bindenden Liganden gebildet werden (Edelman et al., 1987; Hunter, 1991). Dazu gehören cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) und cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), welche von einer G-Protein-gekoppelten Guanylatcyclase bzw. Adenylatcyclase gebildet werden. cAMP bindet an die cAMP-abhängige PKA, welche zahlreiche Zellfunktionen wie bspw. den Glykogenstoffwechsel reguliert. Abgebaut wird das cAMP (bzw. cGMP) von einer Phosphodiesterase (PDE), welche dessen cyclischen Ring spaltet und dieses so inaktiviert (Newton et al., 2016). Weitere *second messenger* leiten sich von einem Phospholipid der Zellmembran ab, Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP_2).

Bindet ein Wachstumsfaktor an eine RTK, wird die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) aktiviert, welche PIP_2 in Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP_3) umwandelt, welches wiederum die PKB (auch „Akt“ genannt) aktiviert. Die Substrate der PKB übernehmen vielfältige zelluläre Funktionen wie Wachstum, Proliferation und Überleben (Manning and Cantley, 2007). PIP_2 kann auch durch ein G-Protein-gekoppelten Rezeptor, welcher an das membrangebundene Enzym Phospholipase C (PLC) gekoppelt ist, in Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerat (DAG) gespalten werden. IP_3 bindet an seinen Rezeptor auf der Membran des endoplasmatischen Retikulums, wodurch Calcium ins Cytosol strömt. Das Calcium bindet entweder direkt an ein Zielprotein oder aktiviert einen Kalziumsensor, Calmodulin genannt, welche nachgeschaltete Reaktionen aktiviert (Berridge, 2004). DAG aktiviert die Calcium-abhängige PKC, deren Substrate in zahlreichen Stoffwechselwegen involviert sind.

3.5 PamGene

PamGene ist ein niederländisches Biotechnologieunternehmen, welches eine Technologie zur Messung der spezifischen Aktivität von intrazellulären Proteinkinasen entwickelt hat. Diese kann die Kinasen-Aktivität in Echtzeit messen und bietet so die Möglichkeit, Einblicke in molekulare Mechanismen von Krankheiten zu bekommen und kann zur Aufklärung von Zellsignalprozessen beitragen.

3.5.1 PamGene-Technologieübersicht

Die PamGene 3D-Peptide-Microarray-Technologie umfasst die PamStation und das Einwegprodukt PamChip (**Abb. 10**). Der PamChip besteht aus vier „Probenträgern“ (arrays), wobei jeder dieser Träger aus einer porösen Keramikmembran besteht, auf deren 3D-Oberfläche Peptide immobilisiert sind. Es gibt PamChips für (STK) mit 144 immobilisierten Peptide, und PamChips für PTK, welche 196 Peptide aufweisen. Diese aus 13 Aminosäuren bestehenden Peptidsequenzen enthalten Phosphorylierungsstellen, welche aus der Literatur oder rechnerischen Vorhersagen bekannt sind und von einer oder mehreren zu untersuchenden Kinasen phosphoryliert werden. Die PamStation kann drei PamChips gleichzeitig aufnehmen und übernimmt den eigentlichen Messvorgang.

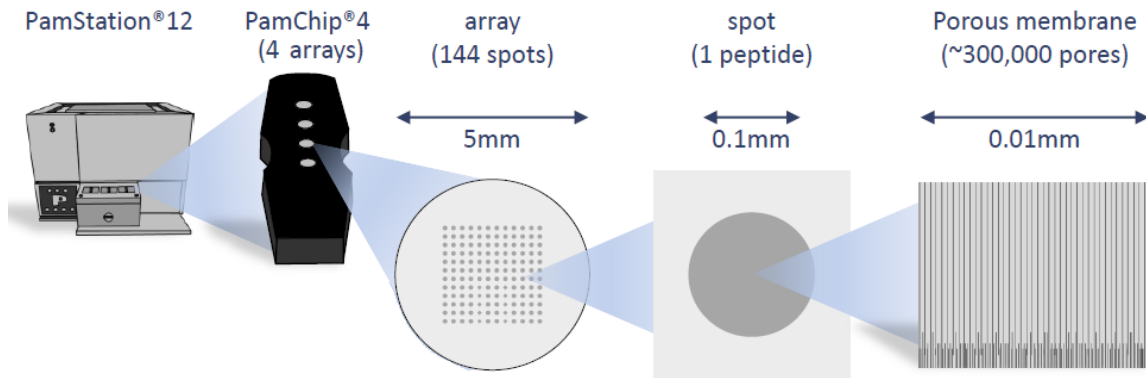


Abbildung 10: Übersicht über die PamGene-Technologie. Die PamStation kann bis zu drei PamChips gleichzeitig laden. Sie übernimmt die Messung der Kinasen-Aktivität. Jeder PamChip enthält vier Probenträger (*arrays*), welche aus einer porösen Membran bestehen, auf welcher Peptide immobilisiert sind. Modifiziert nach PamGene International, 2018.

3.5.2 Arbeitsablauf der Messungen

Der Arbeitsablauf des PamChip-Kinase-Assays besteht aus drei Arbeitsschritten (**Abb. 11**): Probenvorbereitung (1), PamChip-Assay (2) und Datenanalyse (3). In **Schritt 1** werden aus dem zerkleinerten Gewebe die Proteine extrahiert. In **Schritt 2** wird das Lysat einer Gewebeprobe auf einen der vier Probenträger des PamChips gegeben. Dementsprechend können vier Proben pro PamChip gleichzeitig gemessen werden. Zusätzlich wird eine Lösung, bestehend aus ATP und einem fluoreszenzmarkierten Anti-Phosphat-Antikörper, auf die Probenträger gegeben. Die in dem Protein-Lysat vorhandenen Proteinkinasen phosphorylieren die auf der Membran des PamChips immobilisierten Peptide, indem sie das ATP verstoffwechseln. Die Anti-Phosphat-Antikörper binden an diese Phosphat-Reste. Während des Assays wird die Probenlösung aktiv durch die poröse Membran gepumpt, was den gesamten Prozess beschleunigt. Befindet sich die Lösung unter der Membran, werden Bilder von ihr von einer *charged-coupled device* (CCD)-Kamera der PamStation aufgenommen. Innerhalb des einstündigen Messvorgangs werden insgesamt 15 Bilder aufgenommen. **Schritt 3**: Die Intensität der Fluoreszenz jedes immobilisierten Peptides korreliert dabei direkt mit dem Ausmaß seiner Phosphorylierung und nimmt im Messverlauf stetig zu. Die Fotos werden im Folgenden von der BioNavigator-Software verwendet, um kinetische Datenkurven von allen Peptiden zu erstellen. Aus den Informationen, welche Peptide wie stark phosphoryliert wurden, können Rückschlüsse auf Basis bekannter Daten gezogen werden, welche Kinasen an der jeweiligen Phosphorylierung eines Peptides beteiligt waren.

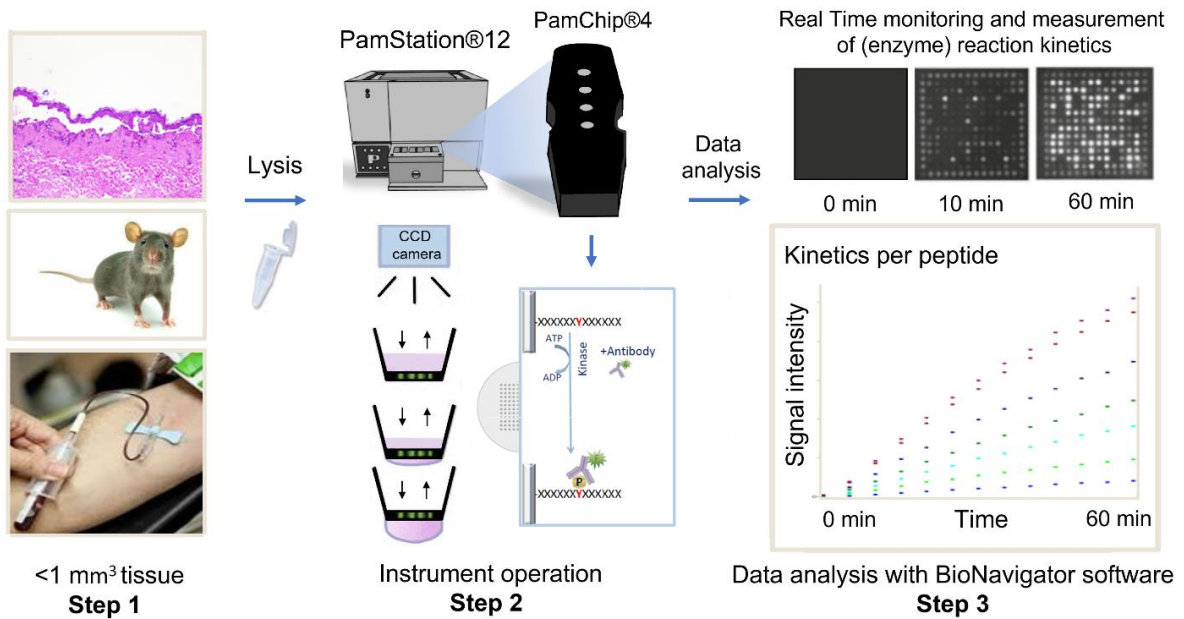


Abbildung 11: Arbeitsablauf des PamChip-Kinase-Assays. (Step 1): Zunächst werden die Proben durch Gewebelyse auf die Messung vorbereitet. **(Step 2):** Das Protein-enthaltende Lysat wird mit Adenosintriphosphat (ATP) und einem fluoreszierenden Anti-Phosphat-Antikörper in den Probenträger des PamChips gegeben. Die in dem Lysat vorhandenen Kinasen phosphorylieren die auf der porösen Membran immobilisieren Peptide, indem sie das ATP verstoffwechseln. Der Antikörper bindet an diese Phosphat-Reste. Die Probenlösung wird währenddessen aktiv durch die Membran gepumpt, was den Prozess beschleunigt. **(Step 3):** Über den einstündigen Messvorgang hinweg nimmt die PamStation 15 Bilder von der mit Peptiden besetzten Membran auf. Die Fluoreszenz-Stärke jedes Peptides korreliert dabei direkt mit dem Ausmaß seiner Phosphorylierung. Die BioNavigator-Software analysiert die Bilder und erstellt kinetische Datenkurven für jedes Peptid. CCD = *charged-coupled devide*. ADP = Adenosindiphosphat. Bilder modifiziert nach (PamGene International, 2018; ResearchGate, 2021).

3.6 Glucocorticoide

Glucocorticoide (GC) zählen zur Gruppe der Corticosteroide, welche zur Klasse der Steroidhormone gehören. Zu dieser Gruppe gehören neben den GC die Mineralocorticoide (Aldosteron) und Sexualhormone (Androgene und Östrogene) (Strehl et al., 2019). Sie werden in den Mitochondrien der Nebennierenrinde in einem komplexen Prozess synthetisiert und leiten sich wie alle Steroidhormone vom Cholesterin ab, weshalb ihre Grundstruktur das charakteristische Steran-Gerüst des Cholesterin beinhaltet (Miller, 2013). Der natürlich vorkommende, aktive Hauptvertreter der GC ist das Cortisol. Beim Gesunden wird etwa 10 mg am Tag produziert, kann allerdings unter Stress auf bis zu 400 mg am Tag ansteigen. Die Cortisol-Produktion unterliegt dem zirkadianen Rhythmus. So liegen am Morgen sehr hohe und am Abend sehr niedrige Cortisol-Konzentrationen im Blut vor. Cortisol wird zum inaktiven Cortison metabolisiert (Czock et al., 2005).

3.6.1 Wirkmechanismus

Der umfangreiche Wirkmechanismus von GC ist noch nicht abschließend geklärt, jedoch existieren verschiedene Theorien, welche unabhängig voneinander bestehen bzw. sich gegenseitig bestärken können (**Abb. 12**). Der wichtigste Wirkmechanismus von GC scheint die genomische Modulation zu sein, welche zur Veränderung der Gen-Expression führt und als Transaktivierung bezeichnet wird. Dabei diffundiert das lipophile GC durch die Plasmamembran und bindet hochaffin an einen cytosolischen GC Rezeptor (cGCR), woraufhin sich dieser Komplex als Homodimer in den Nucleus transloziert. Dort bindet er an GC *response elements* (GRE) der Promoter-Region von GC-regulierten Genen, woraufhin diese verstärkt transkribiert und die Synthese von bestimmten regulatorischen, entzündungshemmenden Proteinen aktiviert werden (Spies et al., 2011; Vandewalle et al., 2018).

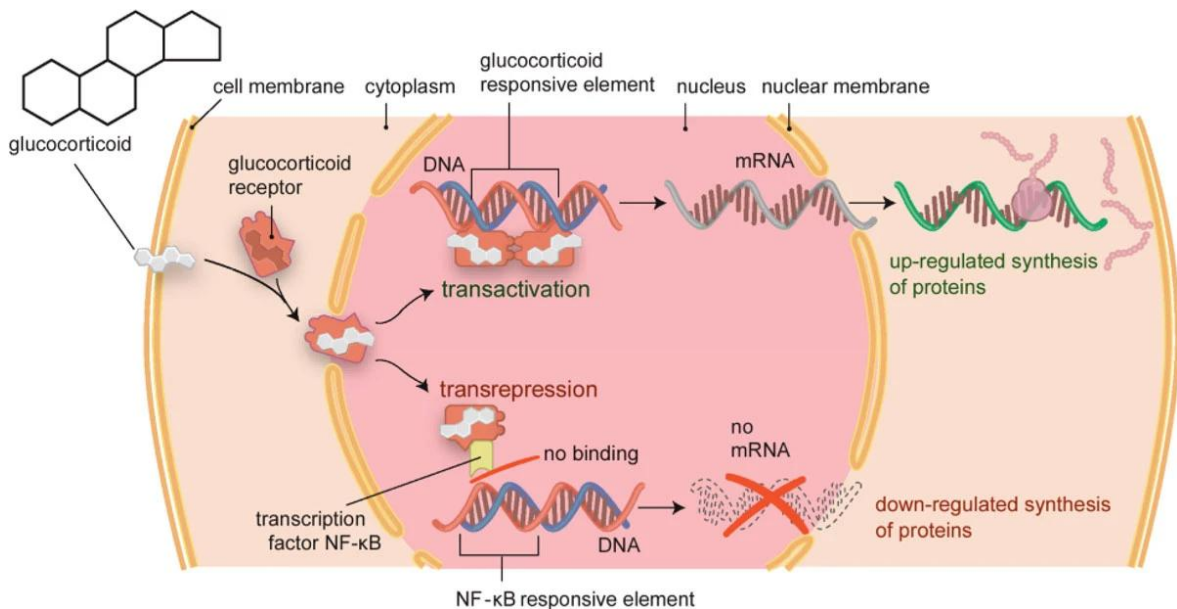


Abbildung 12: Zellulärer Wirkmechanismus von Glucocorticoiden. Glucocorticoide (GC) diffundieren durch die Plasmamembran ins Zytosol der Zelle und binden dort an einen GC-Rezeptor (GCR), woraufhin dieser Komplex in den Nucleus transloziert. Entweder der GCR bindet dort als Dimer an ein GC *responsive element* der DNA und aktiviert so die Synthese antiinflammatorischer Proteine, was als Transaktivierung bezeichnet wird, oder der GCR bindet als Monomer an proinflammatorische Transkriptionsfaktoren (TF), sodass deren DNA-Bindung und so die Synthese proinflammatorischer Proteine unterbunden wird, was wiederum als Transrepression bezeichnet wird. Zu diesen TF gehört neben dem *nuclear factor* κB (NF-κB) das *activator protein* 1 (AP-1) (nicht gezeigt). Abbildung nach (van der Goes et al., 2014).

Ein weiterer Wirkmechanismus umfasst die physische Interaktion von monomeren GCR mit proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren (TF), wodurch die Aktivität des TF ohne DNA-Bindung beeinflusst und unterdrückt wird, was als Transrepression bezeichnet wird. Diese TF sind u.a. das *activator protein* 1 (AP-1) und der *nuclear factor* κB (NF-κB), welche zu den wichtigsten entzündlichen Transkriptionsregulatoren gehören. Durch deren Bindung wird die Synthese pro-

inflammatorischer Proteine runterreguliert (Coutinho and Chapman, 2011). Diese Transrepressions-Hypothese wird unterstützt von *in vivo* Experimenten an Mäusen, bei denen der Wildtyp ($^{wt/wt}$)-GCR durch einen Dimerisierungsdefekten ($^{dim/dim}$) ersetzt wurde (Frijters et al., 2010). Als Folge blieb die Repression der AP-1-abhängigen Transkription proinflammatorischer Gene intakt, die GRE-abhängige Transaktivierung wurde jedoch unterbunden (Reichardt et al., 1998). Ebenfalls konnte bei den $GCR^{dim/dim}$ Mäusen durch GC ein ausschließlich vom NF- κ B aktiviertes, proinflammatorisches Gen unterdrückt werden (Reichardt et al., 2001). Auch bleibt die *dual-specificity*-Phosphatase 1 (DUSP1), welche ein entscheidendes entzündungshemmendes Gen darstellt, bei $GCR^{dim/dim}$ Mäusen durch GC vollständig induzierbar. Die dimerisierungsunabhängige, transrepressive Wirkung von GC scheint eng an DUSP1 gekoppelt zu sein, da eine induzierte Entzündung bei DUSP1 *knockout* Mäusen durch GC nicht unterbunden werden konnte (Abraham et al., 2006).

Interessanterweise dephosphoryliert und inaktiviert DUSP1, Mitglieder der MAPK-Familie, wie die c-Jun-N-terminalen Kinasen (JNK) und die p38MAPK (Franklin and Kraft, 1997), wobei letztere nachgewiesenermaßen eine Rolle in der Pathogenese von PV spielt (vgl. Kap. 2.3.1). So vermindert eine Expression von DUSP1 das Signal der JNK- und p38MAPK-Signalwege, inhibiert die Expression zahlreicher proinflammatorischer Gene und hemmt damit u.a. die Produktion der Zytokine Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-6 (IL-6) (Chen et al., 2002). So zeigen DUSP1 $^{-/-}$ Makrophagen eine deutlich verlängerte Aktivität von JNK und p38MAPK, was in einer Überproduktion dieser proinflammatorischen Zytokine und einem antiinflammatorischen Zytokin, IL-10, mündet (Chi et al., 2006).

Allerdings sind Wirkung von GC durch Transaktivierung und Transrepression nicht einfach zu trennen (Vandewalle et al., 2018). So treten einige Nebenwirkungen von GC, wie Hyperglykämie, nur bei $GCR^{wt/wt}$ Mäusen auf, während andere Nebenwirkungen wie Osteoporose, sowohl bei $GCR^{dim/dim}$ Mäusen als auch bei $GCR^{wt/wt}$ Mäusen auftreten (Rauch et al., 2010). Auch sind $GCR^{dim/dim}$ Mäuse signifikant anfälliger für eine durch Lipopolysaccharide ausgelöste, akute Lungenentzündung unter GC-Therapie (Kleiman et al., 2012; Vettorazzi et al., 2015), während $GCR^{dim/dim}$ Mäuse als auch $GCR^{wt/wt}$ Mäuse mit irritativen Hautentzündungen durch GC gleichermaßen geschützt sind (Reichardt et al., 2001).

Neben dem bereits erwähnten DUSP1 und IL-10 gibt es weitere GC-induzierte Gene (Clark, 2007). Eines davon ist der GC-induzierte Leucin-Zipper (GILZ), welcher mit AP-1 und NF- κ B interagiert und deren Funktion unterdrückt (Ayroldi and Riccardi, 2009). Auch wird Annexin A1 (AnxA1), ein Calcium-abhängiges Phospholipid-bindendes Protein, durch GC induziert. So zeigen AnxA1-defiziente Mäuse eine insuffiziente Unterdrückung der Entzündung durch GC (Hannon et al., 2003)

und eine Verabreichung von AnxA1, sowie auch IL-10, kann eine Teilwirkung von GC nachahmen (Perretti and D'Acquisto, 2009). Auch leiden IL-10-defiziente Mäuse an chronischen Entzündungen und Autoimmunerkrankungen (Kühn et al., 1993; Rennick et al., 1995). Während die Aktivierung des GILZ-Gens von einer Dimerisierung des GCR abhängig zu sein scheint (Rogatsky et al., 2003), ist der Regulationsmechanismus von IL-10 und AnxA1 unklar.

3.6.2 Wirkung

Die Initiierung der Immunantwort beginnt mit der Aktivierung des Komplementsystems, woraufhin Immunzellen rekrutiert werden, welche Zytokine produzieren, wodurch das adaptive Immunsystem aktiviert wird (Akira et al., 2006). Zum adaptiven Immunsystem gehören T- und B-Lymphozyten. T-Helfer-Zellen sezernieren Zytokine, welche als Botenstoffe entweder an der zellvermittelten Immunantwort beteiligt sind oder B-Lymphozyten stimulieren, welche zur Antikörperproduktion angeregt werden (Janeway et al., 2001). GC regulieren die Produktion proinflammatorischer TF und Zytokine runter (vgl. Kap. 2.6.1), woraus eine fehlende T-Zell-Aktivierung und somit eine Unterdrückung der Entzündungsreaktion und eine immunsuppressive Wirkung resultiert. Außerdem kann die Rekrutierung von Immunzellen durch Unterdrückung von Adhäsionsmolekülen am Ort der Entzündung gehemmt werden (Czock et al., 2005). GC sind auch mit der Unterdrückung der Reifung und Funktion von dendritischen Zellen in Verbindung gebracht worden, welche nach Kontakt mit einem Antigen naive T-Zellen aktivieren und somit eine Immunantwort einleiten (Rutella and Lemoli, 2004). Auch werden sie in tolerante dendritische Zellen umgewandelt, welche bei T-Zellen einen hyporeaktiven Zustand auslösen und die Bildung von regulatorischen T (T_{reg}) Zellen induzieren können (Rea et al., 2000; Coutinho and Chapman, 2011). GC können auch direkt auf CD4+ T-Zellen wirken und so IL-10 sezernierende T_{reg} Zellen induzieren, welche T-Helfer-Zell 1 (Th1) -Antworten und Autoimmunität regulieren (Hawrylowicz, 2005). Auf zellulärer Ebene können GC die Apoptose von T-Zellen induzieren, was ebenfalls die Entzündung reduziert (Sorrells and Sapolsky, 2007). So kann durch eine GC Puls-Therapie die Apoptose von T-Helfer-Zellen bei Patienten mit Autoimmunerkrankung eingeleitet werden (Leussink et al., 2001). Auch B-Lymphozyten sind von einer GC-Therapie betroffen. So kommt es durch GC zur Verringerung der Zahl naiver B-Zellen sowie einer Erschöpfung der zirkulierenden, antikörperproduzierenden Plasmazellen (Lanzillotta et al., 2019).

Neben der gewünschten entzündungshemmenden und immunsuppressiven Wirkung von GC gibt es zahlreiche unerwünschte Nebenwirkungen, welche quasi alle Organsysteme betreffen können. Dabei treten verschiedene Nebenwirkungen bei bis zu 90 % der Patienten auf, die GC für mehr 60 Tage einnehmen (Curtis et al., 2006). Mögliche Nebenwirkungen umfassen das muskuloskeletale (Osteoporose, Myopathien), endokrinologische (Diabetes mellitus, Dyslipidämie,

Gewichtszunahme, Wachstumsstörungen, Nebennierenrinden-Suppression), kardiovaskuläre (Hypertension, KHK), neuropsychiatrische (Depressionen, Stimmungsschwankungen) und das ophthalmologische (Katarakt, Glaukom) System (Oray et al., 2016).

3.6.3 Prednisolon

Prednisolon ist ein synthetisches GC, welches etwa die vierfache Wirkstärke des körpereigenen Hydrocortisons besitzt (Thiessen et al., 1976). Der Wirkungseintritt variiert je nach Darreichungsform. So startet er nach Injektion bereits nach Minuten, während die Wirkung bei Tabletteneinnahme erst nach 1 – 2 Stunden einsetzt. Prednisolon wird in der Leber metabolisiert und hormonell inaktiviert, bevor es renal eliminiert wird. Die Halbwertszeit wird nach etwa drei Stunden erreicht, während die Wirkdauer bis zu 36 h betragen kann. Die Dosierung für Erwachsene schwank je nach Bedarf von 1,5 – 100 mg täglich (Gelbe Liste, 2021).

3.6.4 Clobetasol

Clobetasol zählt zu den topisch applizierten GC. Entsprechend ihrer Effektivität werden topische GC in 4 Klassen eingeteilt, wobei Clobetasol der höchsten Klasse zugeteilt wird und somit eine sehr starke Wirkung hat (Aubert-Wastiaux et al., 2011). Es findet Anwendung in der Behandlung nichtinfektiöser entzündlicher Hauterkrankungen (Gelbe Liste, 2016).

3.7 Forschungsziele

In dieser Arbeit wird der Fokus auf die Untersuchung der Wirkung von Glucocorticoiden im Hautorgan-Kulturmodell, sowie die Identifikation neuer Angriffsziele bei der medikamentösen Therapie von PV gelegt. Genauer beleuchtet werden soll die Rolle von Protein-Kinasen im Pathomechanismus der Erkrankung.

Dafür werden mit PV-Antikörpern behandelte Hautproben im Hautorgan-Kulturmodell mithilfe der PamGene-Technologie auf deren intrazelluläre Protein-Kinasen-Aktivität untersucht. Somit können einzelne Kinasen differenziert auf deren Beteiligung bei der Pathogenese von PV beleuchtet werden.

Sofern sich in ihrer Aktivität signifikant veränderte Kinasen identifizieren lassen, wird in weiterführenden Zellkultur-Experimenten untersucht, ob eine Inhibition der beteiligten Kinasen in mit PV-Antikörpern behandelten Keratinozyten im Keratinozyten-Dissoziations-Assay zu einer Stärkung der Zell-Zell-Adhäsion beitragen kann.

4 Material

4.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Deutschland (DE), Japan (JPN), Niederlande (NE), Vereinigtes Königreich (UK), Vereinigte Staaten von Amerika (USA)

Gerät	Modellbezeichnung	Hersteller
37 °C Trockenschrank	Binder Serial No.: 10-17114	Binder GmbH, Tuttlingen, DE
CO ₂ - Inkubationsschrank	Hera cell CO ₂ -Inkubator	Haeraeus Konzern, Hanau, DE
CO ₂ - Inkubationsschrank	HeroCell Vios 250i CO ₂ Inkubator	Haeraeus Konzern, Hanau, DE
Cryostat	Leica CM-3050S	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH; Wetzlar, DE
Eindeckautomat	Leica CM-3050S	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH; Wetzlar, DE
Feuchte Kammer	300T	LabArt UG und Co. KG; Waldbrüttelbrunn, DE
Fluoreszenzmikroskop	BZ9000	Keyence; Osaka, JPN
Gefrierschrank -20 °C	LGPV6520	Liebherr-International Deutschland; Biberach an der Riß, DE
Gefrierschrank -80 °C	TSX400V	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Kühlplatte für Paraffin	EG 1130	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH; Wetzlar, DE
Kühlplatte für Paraffin aus der Routine	Tissue-Tek®	Sakura Finetek Europe B.V.; Alphen aan den Rijn, NE
Kühlschrank +4 °C	KS95	Liebherr-International Deutschland; Biberach an der Riß, DE
Magnetrührer mit Heizung	RSM-04H	Phoenix Instrument GmbH; Garbsen, DE
Mikroskop	Leitz Biomed	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH; Wetzlar, DE

Material

Mikrotom Modell	1140/Autocut	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH; Wetzlar, DE
Mikrowell Plattenlesegerät	Promega GloMax Discover Microplate Reader # GM3000	Promega GmbH, Walldorf, DE
Neubauer Zählkammer	# 430150	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG; Lauda-Königshofen; DE
PamStation	PamStation 12	PamGene International BV; Herzogenbusch, NE
Paraffin-Ausgieß-Konsole	Tissue-Tek® TEC TM5 embedding station	Sakura Finetek Europe B.V.; Alphen aan den Rijn, NE
Paraffin-Streckbad	MEDAX WB24	MEDAX GmbH; Neumünster, DE & Co. KG
pH-Meter	inolab® pH7110	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG (WTW); Weilheim, DE
Pipetten	Research plus (0.5-10µL, 2-20 µL, 20-200µL, 100-1000 µL)	Eppendorf AG; Hamburg, DE
Pipettenfüller	Hirschmann™ Pipetus™ Akku Pipettenfüller	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Tischzentrifuge	Micro Centrifuge, Modell SD 220VAC	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe, DE
Vortex	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc.; Bohemia, New York, USA
Waage	Highland HCB3001	Adam Equipment Ltd.; Milton Keynes, UK
Wasserbad	Typ 1004	Gesellschaft für Labortechnik mbH; Burgwedel, DE
Zentrifuge	Zentrifuge 5810	Eppendorf AG; Hamburg, DE

4.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Deutschland (DE), Japan (JPN), Niederlande (NE), Österreich (AUT), Vereinigte Staaten von Amerika (USA)

Material	Bezeichnung + Artikelnummer (#)	Hersteller
Biopsie Stanze 4 mm / 6 mm	# 48401 / # 48601	KAI Europe GmbH; Solingen; DE
Cryomolds	Tissue Tek® Intermediate (15x15x5 mm) # 4566	Sakura Finetek Europe B.V.; Alphen aan den Rijn, NE
Deckgläschen	# H878	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, DE
Einfriermedium	TissueTek® O.C.T. Compound # 6769006	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Fettstift	DAKO Pen # S2002	Agilent; Santa Clara, USA
Handschuhe Größe M	Peha-soft® latexfree powderfree # 942197	PAUL HARTMANN AG; Heidenheim, DE
Inserts	TC-Insert 6 Well, 4 µm Pore # 83.3930.041	Sarstedt AG & co.; Nümbrecht, DE
Insulin-Spritzen	BD Micro-Fine™ U-100 Insulinspritzen # 324827	Becton Dickinson GmbH; Heidelberg, DE
Klingen	LEICA 819 # 14035838925	Leica Biosystems Nussloch GmbH; Nussloch, DE
Objekträger	SuperFrost Plus # J1800AMNZ	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
PamChip microarrays		
Paraffin-Kassetten	Einbettkassetten # 70025	MEDITE Medical GmbH; Burgdorf, DE
Pasteurpipetten	3 mL PE unsterile # 1131303	Th. Geyer GmbH & Co. KG; Renningen, DE
Petrischale	92x16mm # 821,472	Sarstedt AG & co.; Nümbrecht, DE

Material

Pinzetten	Nicht vorhanden	Nicht vorhanden
Pipettenspitzen	10 µL, # 70,1114 200 µL, # 70.760.012 1000 µL, # 70.762.010	Sarstedt AG & co.; Nümbrecht, DE
Präparatemappen	# 51.850042	Marburger STS GmbH & Co KG, Marburg, DE
Reaktionsgefäße 0,2 mL	PCR SingleCap 8er-Softstrip 0,2 mL, farblos #710970	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, DE
Reaktionsgefäße 1,5 mL	SafeSeal Gefäß 1,5 ml # 7696751	Sarstedt AG & co.; Nümbrecht, DE
Reaktionsgefäße 2,0 mL	SafeSeal Gefäß 2,0 ml # 72,695,006	Sarstedt AG & co.; Nümbrecht, DE
Serologische Pipette	25 mL, #86.1685.001 10 mL, #86.1254.001 5 mL, #86.1253.001	Sarstedt AG & co.; Nümbrecht, DE
Spatel	Nicht vorhanden	Nicht vorhanden
Sterile Filtervorrichtung	Filtropur S 0,2 # 83.1826.001	Sarstedt AG & co.; Nümbrecht, DE
Steriles Einwegskalpell	Einwegskalpell # 02.001.30.010	FEATHER Safety Razor Co., Ltd.; Osaka, JPN
Transwellplatte, steril	TC-Platte 6 Well: # 83.3920500 12 Well: # 83.3921.500	Sarstedt AG & co.; Nümbrecht, DE
Transwellplatte, steril	TC-Platte 96 Well / Mikroplatte # 655901	Greiner Bio-One International GmbH; Kremsmünster, AUT
wasserfeste Unterlage	MoliCare® Premium # 161061	PAUL HARTMANN AG; Heidenheim, DE
Zellkulturflaschen 75 cm ²	TC-Flasche T75, Stand, Vent.Cap. #83.3911.002	Sarstedt AG & co.; Nümbrecht, DE
Zentrifugenröhrchen 15 mL	Falcon Röhre 15 mL # 62.554.502	Sarstedt AG & co.; Nümbrecht, DE
Zentrifugenröhrchen 50 mL	Falcon Röhre 50 mL # 62.547.254	Sarstedt AG & co.; Nümbrecht, DE

4.3 Reagenzien

Tabelle 3: Verwendete Reagenzien

Deutschland (DE), Japan (JPN), Vereinigte Staaten von Amerika (USA), Vereinigtes Königreich (UK)

Reagenz	Artikelnummer	Hersteller
10x Tris Buffered Saline (TBS)	# 170-6435	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, DE
Aceton	# 15568494	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Bovines Serumalbumin (BSA) für <i>BCA-Protein-Assay</i>	# 30036578	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Bovines Serumalbumin (BSA) für Keratinocyten-Dissoziations- Assay	# 0163.2	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, DE
Calciumchlorid-Dihydrat	# 24610500	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Chemsolute); Renningen, DE
Crystal violet solution 1 %	# 548-62-9	Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, USA
4,6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) Fluoromount-G®	# 0100-20	Southern Biotech; Birmingham, USA
Destilliertes Wasser	Nicht vorhanden	Klinisch Experimentelle Forschungseinrichtung; Universität zu Lübeck
Dispase 5 U/mL	# 07913	Stemcell Technologies Germany GmbH; Köln, DE
Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)	# 14190-094	Merck; Darmstadt, DE
Esel Normalserum	# 017-000-121	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.; Ely, UK
Ethanol (70 %, 96 %, 99,8 %)	70 %: # T913.3 96 %: # T171.4 99,8 %: # K928.4	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, DE
Fetales bovines Serum (FBS)	# FBS-GP-0500	Bio & Sell GmbH; Feucht/Nürnberg, DE
<i>Halt phosphatase inhibitor cocktail (100x)</i>	# 78420 or # 78426 or # 78427 or # 78428	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA

Material

<i>Halt protease inhibitor cocktail, EDTA free (100x)</i>	# 78437 or # 78425 or # 78439	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
<i>Hank's balanced salt solution (HBSS)</i>	# 14045	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Kalibrierpuffer pH = 4, 7, 10	4: # 1134.0252. 7: # 1137.0252. 10: # 1140.0252	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Chemsolute); Renningen, DE
<i>Keratinocyte growth medium 2 supplementmix calcium chloride</i>	500 mL: # C-20011 For 500 mL: # C-39016 For 500 mL: # C-34005	PromoCell GmbH; Heidelberg, DE
Methylenblau	# A514.1	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, DE
M-PER Mammalian Extraction Buffer	# 78503 or # 78501 or # 78505	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Natriumzitat-Dihydrat	# STBG2259V	Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, USA
<i>Phosphate Buffered Saline (PBS) x1, 7,2 pH</i>	# 20012027	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Pierce™ Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit	# 23236	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
RNAlater	# 1017980	Qiagen GmbH, Hilden, DE
Roti® -Histofix	4 %	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, DE
Trypan-blue solution (0,4 %)	# 15250-061	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Trypsin / Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	# P10-023100	PAN-Biotech GmbH; Aidenbach, DE
Tween® 20	# P9416-50ml	Sigma; Kawasaki, JPN
William's E Medium	# BS.F1115	Bio & Sell GmbH; Feucht, DE
Xylol	# 108633	Merck; Darmstadt, DE
Ziegen Normalserum	# X0907	DAKO GmbH; Jena, DE

4.4 Medikamente und Inhibitoren

Tabelle 4: Verwendete Medikamente/Inhibitoren
Deutschland (DE), Vereinigte Staaten von Amerika (USA)

Medikament	Artikelnummer	Hersteller
Prednisolut 250 mg	PZN-14142152	Mibe GmbH, Brehna, DE
Clobetasol-17-protrionat-Creme (0,5 mg/1 g Creme)	Nicht vorhanden	Wandels Apotheke St. Hubertus, Groß-Grönau, DE
Basiscreme	Nicht vorhanden	Wandels Apotheke St. Hubertus, Groß-Grönau, DE
Inhibitor KX2-391	Katalog Nr. S2700	Selleck Chemicals LLC, Houston, USA
Inhibitor PF-573228	Katalog Nr. S2013	Selleck Chemicals LLC, Houston, USA
Inhibitor PP2	Katalog Nr. S7008	Selleck Chemicals LLC, Houston, USA
Inhibitor PRT062607	Katalog Nr. S8032	Selleck Chemicals LLC, Houston, USA
Inhibitor RK 24466	Katalog Nr. S0020	Selleck Chemicals LLC, Houston, USA
Inhibitor Saracatinib	Katalog Nr. S1006	Selleck Chemicals LLC, Houston, USA
Inhibitor SU 6656	Katalog Nr. S7774	Selleck Chemicals LLC, Houston, USA

4.5 Antikörper

Tabelle 5: Verwendete Antikörper
Deutschland (DE), *Heavy chain + Light chain* (H+L), Hämagglutinin (HA), Immunglobulin Klasse G (IgG), Vereinigtes Königreich (UK), Vereinigte Staaten von Amerika (USA)

Antikörper	Artikelnummer	Hersteller
<i>Anti-HA high affinity, rat monoclonal antibody</i>	# 11867423001	Roche Deutschland Holding GmbH; Grenzach-Wyhlen, DE
<i>Goat anti-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 488</i>	# A11029 clone: polyclonal	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
<i>Goat anti-rat IgG (H+L) Alexa Fluor 594</i>	# A11007	Invitrogen AG; Carlsbad, CA, USA

Material

<i>Mouse anti-human desmoglein-3</i>	# SM2037PS clone: polyclonal	5G11 OriGene Technologies, Inc.; Rockville, MD, USA
<i>Goat anti-mouse IgG (H+L) Cy3-conjugated</i>	# 115-165-146 clone: polyclonal	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.; Ely, UK
<i>Mouse anti-human desmoglein-1</i>	# AM26377PU-N clone: monoclonal	5G11 OriGene Technologies, Inc.; Rockville, MD, USA
Intratect 50 g/l; Immunglobulin vom Menschen (IVIG)	# 624101	Biotest Pharma GmbH, Dreieich, DE
<i>Single-chain variable fragment</i>	Nicht vorhanden	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herr Dr. Dr. Christoph Hammers

4.6 Software

Tabelle 6: Verwendete Software

Japan (JPN), Niederlande (NE)

Software	Hersteller
BZII Analyzer	Keyence; Osaka, JPN
BZII Viewer	Keyence; Osaka, JPN
ImageJ	Public domain
GraphPad Prism 8	Graphpad Software, Inc
BioNavigator®	PamGene International BV; Herzogenbusch, NE

5 Methoden

5.1 Hautorgan-Kulturmodell für *Pemphigus vulgaris*

Das humane Hautorgan-Kulturmodell ist ein standardisiertes Test-System, um *in vitro* die Wirkung pharmakologischer Substanzen auf humane Haut zu evaluieren. In diesem Modell bleiben alle drei Hautschichten, inklusive Desmosomen und Desmoglein-Expressions-Level, erhalten und alle Zellen verbleiben in ihrer physiologischen Nische und Orientierung. Somit bietet dieses etablierte Modell eine interessante Alternative zu Zellkultur-, bzw. Mausmodellen in der *Pemphigus vulgaris*-Forschung (Burmester et al., 2019). In dieser Arbeit soll innerhalb dieses Modells der Einfluss von GC auf die intraepidermale Blasenbildung getestet, sowie die intrazelluläre Kinase-Aktivität ermittelt werden.

5.1.1 Aufbau und Anwendung

Für das humane Hautorgan-Kulturmodell wurde Haut von gesunden Patienten verwendet, welche elektiven Schönheitsoperationen unterzogen wurden. Diese wurde freundlicherweise von der die Operation durchführenden Praxis/Klinik zur Verfügung gestellt. Die Genehmigung der Ethikkommission der Universität zu Lübeck liegt vor (Antragsnummer 06-109; siehe Anhang). Nach Erhalt der Haut wurde diese in William's E Medium bei + 4 °C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert. Die Kultivierung der Haut sollte so schnell wie möglich, spätestens jedoch 24 h nach der Operation erfolgen. Für die Kultur wurde lediglich unversehrte Haut verwendet, also ohne Narben, Tattoos oder Leberflecken. In der nachfolgenden **Tabelle 7** sind Informationen über die Haut und deren Spender aufgelistet.

Zu Beginn wurde mittels Einwegskalpellen das Fettgewebe getrimmt und die Haut in 1 cm x 1 cm große Quadrate geschnitten. Dabei sollten alle drei Hautschichten erhalten bleiben. Anschließend wurden die Hautstücke in einer mit William's E Medium gefüllten Petrischale bei +4 °C, bzw. auf Eis, zwischengelagert.

Folgende Schritte fanden unter einer sterilen Bank statt. In die verwendeten Transwell-Platten mit je 6 Wells wurde jeweils 2 mL William's E Medium pipettiert und anschließend ein spezieller Well-Einsatz eingehängt. Diese Einsätze hatten eine membranöse Struktur, durch welche das William's E Medium hindurchtreten und die Hautstücke versorgen konnte. Die Epidermis hatte derweil weiterhin Kontakt zur Luft, wodurch weitestgehend physiologische Bedingungen simuliert wurden (**Abb.13**).

Der Einfluss von GC wurde in diesem Modell sowohl durch intradermale Injektion von Prednisolon als auch durch topische Applikation in Form von Clobetasol-haltiger Creme untersucht. Beide Applikationsformen wurden auf einer jeweils eigenen Transwell-Platte durchgeführt. Zusätzlich

wurde pro Probandenhaut eine Platte mit Proben angelegt, welche für die Analyse der intrazellulären Kinase-Aktivität in der PamStation verwendet wurden. Die drei verschiedenen Platten-Layouts sind bis zu einem n = 5 durchgeführt worden. Im Folgenden sind diese aufgeschlüsselt.

Tabelle 7: Informationen über die Herkunft der Haut

Durch die laborinterne Hautnummer lässt sich die verwendete Haut spezifisch zuordnen. HS steht dabei für *human skin*. Außerdem ist aufgelistet, in welchem Experiment die Haut Verwendung fand.

Hautnummer	Patienteninformation (Geschlecht, Geburtsjahr)	Lokalisation	Experiment
HS 20-022	weiblich, 1967	Brust	PamGene
HS 20-023	weiblich, 1976	Bauch	PamGene
HS 20-026	weiblich, 1982	Bauch	PamGene Prednisolon-Injektion
HS 20-027	weiblich, 1988	Bauch	PamGene Prednisolon-Injektion Clobetasol-Topisch
HS 20-028	weiblich, 1980	Bauch	PamGene Prednisolon-Injektion Clobetasol-Topisch
HS 20-029	männlich, 1954	Bauch	PamGene Prednisolon-Injektion Clobetasol-Topisch
HS 20-030	weiblich, 1943	Oberarm	Prednisolon-Injektion Clobetasol-Topisch
HS 21-001	weiblich, 1984	Bauch	Clobetasol-Topisch

Mittels Einmal-Insulinspritze wurde die Injektionslösung, welche immer ein Gesamtvolumen von 50 µL aufwies, in die Dermis injiziert. Hatte eine scFv-Prednisolon-Injektion ein niedrigeres Gesamtvolumen, wurde dieses mit *Dulbecco's phosphate-buffered saline* (DPBS) auf 50 µL aufgestockt. Für jede Transwell-Platte wurde mindestens eine Positivkontrolle (PC) und eine Negativkontrolle (NC) angefertigt. Die PC bestand aus 28,2 µL des scFv (Konz. 1,6 µg/µL), verdünnt in 21,8 µL DPBS. Dadurch konnte künstlich eine intraepidermale Blasenbildung wie bei PV simuliert werden. Die NC bestand aus 30 µL menschlichem IVIG (Konz. 50g/L), verdünnt in 20 µL DPBS. Hier wurde keine Blasenbildung erwartet. Anschließend wurden die Hautproben auf den Transwell-Platten für 24 h ab der letzten Injektion bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.



Abbildung 13: Mit Hautproben bestückte Transwell-Platte. Die Transwell-Platte wurde zunächst mit 2 mL Williams-E-Medium pro Well bestückt. Anschließend wurden die 1 x 1 cm großen, beimpften Hautproben auf einem Well-Einsatz für 24 h bei 37 °C / 5 % CO₂ inkubiert.

Platten-Layout der Prednisolon-Injektion

In diesem Platten-Layout wurde Prednisolon zusätzlich zum scFv in verschiedenen Präinkubationszeiten injiziert. Dabei wurde neben der PC und NC eine Probe lediglich mit Prednisolon (45 µL / 0,25 mM) beimpft. So konnte gezeigt werden, dass Prednisolon ohne scFv keine Blasenbildung auslöst.

Eine Probe wurde zum Zeitpunkt 0 h mit 28,2 µL scFv und 11,2 µL Prednisolon (1 mM), beimpft. Zwei weitere Proben wurden zum Zeitpunkt 0 h zunächst für 2, bzw. 4 h, mit 22,5 µL (0,25 mM) Prednisolon präinkubiert, bevor auch hier 28,2 µL scFv (1,6 µg/µL) und weitere 22,5 µL (0,25 mM) Prednisolon appliziert wurden. Der nachfolgenden **Tabelle 8** kann das genaue Injektions-Schema entnommen werden. Am Ende der Prozedur hatte jede Hautprobe die gleiche Menge scFv und Prednisolon erhalten. So war eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse gegeben. Hier sollte untersucht werden, ob eine Prednisolon-Präinkubation das Ausmaß der Blasenbildung beeinflusst.

Tabelle 8: Zeitlicher Ablauf der Antikörper/Prednisolon-Injektion in die Hautproben auf der Transwell-Platte. In der Zeit zwischen den Injektionen wurden die Platten bei 37 °C / 5 % CO₂ inkubiert.

Zeit nach 1. Injektion	Prednisolon-Injektion + scFv 0 h	Prednisolon-Injektion + scFv 2 h	Prednisolon-Injektion + scFv 4 h
0 h	Prednisolon 11,25 µL (1 mM) + scFv 28,2 µL (1,6 µg/µL)	Prednisolon 22,5 µL (0,25 mM)	Prednisolon 22,5 µL (0,25 mM)
2 h	-	Prednisolon 5,6 µL (1 mM) + scFv 28,2 µL (1,6 µg/µL)	-
4 h	-	-	Prednisolon 5,6 µL (1 mM) + scFv 28,2 µL (1,6 µg/µL)

Platten-Layout der topischen Applikation von Clobetasol

Neben der PC und NC wurden drei Proben angelegt, welche supraepidermal mit Creme behandelt wurden. Auf jedes Hautstück wurden 1,5 g angewendet. Zwei Proben wurden wirkstoffloser Basiscreme ausgesetzt, wobei eine davon zusätzlich eine scFv-Injektion (28,2 µL [1,6 µg/µL]) erhalten hat. Die dritte Probe wurde ebenfalls mit einer scFv-Injektion sowie Clobetasol-haltiger Creme (0,5 mg/g) behandelt (vgl. Kap. 3.6.4). Im letzten Well wurde eine Prednisolon-Injektion 4 h Probe (s. Plattenlayout Prednisolon-Injektion) als Kontrolle mitgeführt, um einen direkten Vergleich von topischer und injizierter GC-Applikation zu haben.

Tabelle 9: Behandlungsschema der Haut-Proben im Platten-Layout der topischen Applikation von Clobetasol.

Zeit nach 1. Injektion	Basiscreme	Basiscreme + scFv	Clobetasol-Creme + scFv
0 h	Basiscreme 1,5 g	Basiscreme 1,5 g + scFv 28,2 µL (1,6 µg/µL)	Clobetasol-Creme 1,5 g (0,5 mg/g) + scFv 28,2 µL (1,6 µg/µL)

Platten-Layout für die Analyse der Kinase-Aktivität mit PamGene-Technologie

Bei diesem Projekt wurden jeweils zwei PC, zwei NC, sowie zwei Proben mit Prednisolon- und scFv-Injektion mit 4-stündiger Inkubationszeit verwendet.

Nach Ablauf der 24 h Inkubationszeit erfolgte die Ernte der Hautproben. Dabei wurden diese in kleinere Stücke geteilt. Bei den Platten-Layouts Prednisolon-Injektion und der topischen Applikation von Clobetasol, wurde jede Hautprobe in jeweils zwei Viertel und eine Hälfte geteilt.

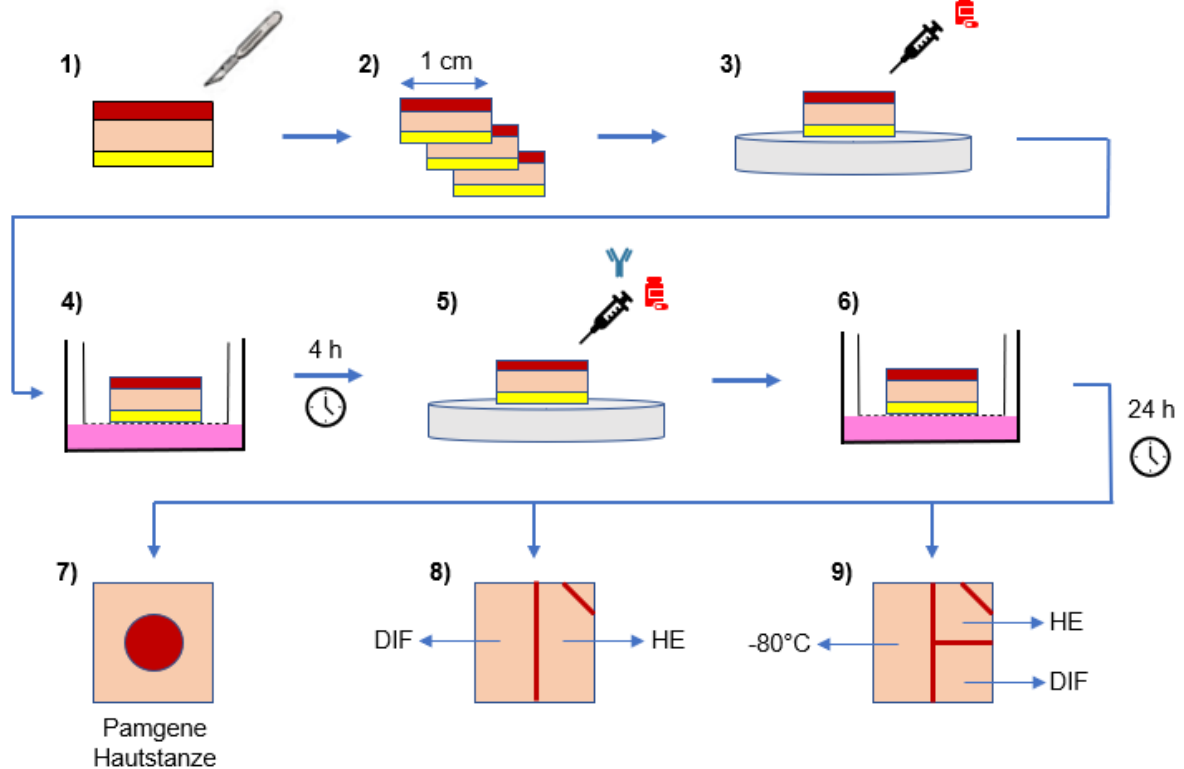


Abbildung 14: Durchführung des humanen Hautorgan-Kulturmodells. 1) Die Haut wurde getrimmt und in 1 x 1 cm große Stücke geschnitten (2). 3) Intradernale Injektion von 50 µL Prednisolon-Lösung. 4) Inkubation der beimpften Hautproben für den jeweiligen Zeitraum (hier Bsp. 4 h). 5) Intradernale Injektion von Antikörper und Prednisolon. 6) Inkubation der Proben für 24 h ab der letzten Injektion. Anschließende Ernte der Proben je nach Platte: 7) 4 mm Biopsie-Hautstanze mittig aus der Probe für die PamGene-Analyse. 8) Teilen der Proben zur Einbettung in Paraffin und Cryomatrix. 9) Halbieren bzw. Vierteln der Probe zur Einbettung in Paraffin und Cryomatrix, sowie Wegfrieren von Probe in RNAlater bei -80 °C zur RNA-Isolation.

Ein Viertel wurde für die HE-Färbung in eine Paraffin-Einbettkassette abgelegt und für mehrere Tage in Roti-Histofix 4 % fixiert. Im Weiteren wurden die Proben mittels Paraffin-Einbettautomat mit der Schnittkante nach unten in Paraffin eingebettet. Das andere Viertel wurde für die Immunfluoreszenz-Färbung in ein Cryomold (Einbettenschälchen), gefüllt mit TissueTek O.C.T. Compound (Einfriermedium), mit der Schnittkante nach unten eingebettet. Anschließend wurde dieses bei -20 °C tiefgefroren und dann bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Die verbliebene Hälfte der Haut-Probe wurde für eine RNA-Isolation in einem RNase-freien Reaktionsgefäß, gefüllt mit 400 µL RNA-later, für 48 h bei +4 °C gekühlt. Anschließend wurden diese bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C eingefroren.

Bei der Ernte der Proben, welche für die PamGene-Analyse bestimmt waren, wurde je Bedingung ein Hautstück halbiert. Eine Hälfte für die HE-Färbung, die andere für die Immunfluoreszenz-Färbung (s.o.). Die andere Probe jeder Bedingung wurde mit einer 4 mm Biopsie-Hautstanze

mittig gestanzt, welche unmittelbar in einem RNase-freien Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und anschließend bei -80°C gelagert wurde.

5.1.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die HE-Färbung wurde bei allen Hautproben durchgeführt, um das Ausmaß der Blasenbildung entlang der kompletten Epidermis quantitativ genau auszuwerten.

Aus den entstandenen Paraffin-Blöcken wurden zunächst mit einem Mikrotom 4 µm dicke Hautschnitte angefertigt. Diese wurden in ein warmes Paraffin-Streckbad gegeben und anschließend auf Objektträgern platziert, welche dann über Nacht in einen 37 °C Trockenschrank gegeben wurden. Es wurden lediglich vollständig intakte Schnitte verwendet, welche vor dem Trocknen unter einem Lichtmikroskop beurteilt wurden.

Für die eigentliche HE-Färbung wurden die Hautschnitte zunächst für 20 min in Xylol entparaffiniert, gefolgt von wenigen Sekunden in zwei weiteren Xylol-Bädern. Darauf folgte eine Rehydrierung der Schnitte durch kurzes Schwenken in einer absteigenden Alkoholreihe [Ethanol 100 % (1), Ethanol 100 % (2), Ethanol 96 %, Ethanol 70 %] mit abschließendem Spülen in destilliertem Wasser. Nun wurden die Schnitte für 5 min in Hämatoxylin eingefärbt, mit anschließendem spülen in Leitungswasser. Danach wurden sie ca. 3 Sekunden in Essigsäure und Alkohol geschwenkt, mit Leitungswasser gespült, in einer Ammoniaklösung ca. 3 Sekunden geschwenkt und erneut in Leitungswasser gründlich gewässert. Jetzt folgte die Gegenfärbung in einer Eosin-Lösung für 30-90 Sekunden, abhängig vom Alter der Lösung. Zum Schluss wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe [96 % Ethanol, 100 % Ethanol, Xylol (1), Xylol (2), Xylol (3)] dehydriert und abschließend mithilfe eines Eindeckautomaten eingedeckt.

5.1.3 Quantitative histometrische Auswertung

Von den gefärbten Schnitten wurden unter dem Lichtmikroskop mit dem BZ-II-Viewer in 100facher Vergrößerung nicht-überlappende Fotos der gesamten Epidermis-Länge geschossen. Dabei wurde jedes dieser Fotos mit aufsteigender Nummerierung (1 - x) als *visual field* (VF) bezeichnet. Das erste Foto jedes Schnitts wurde mit einem 100 µm Maßstabsbalken versehen.

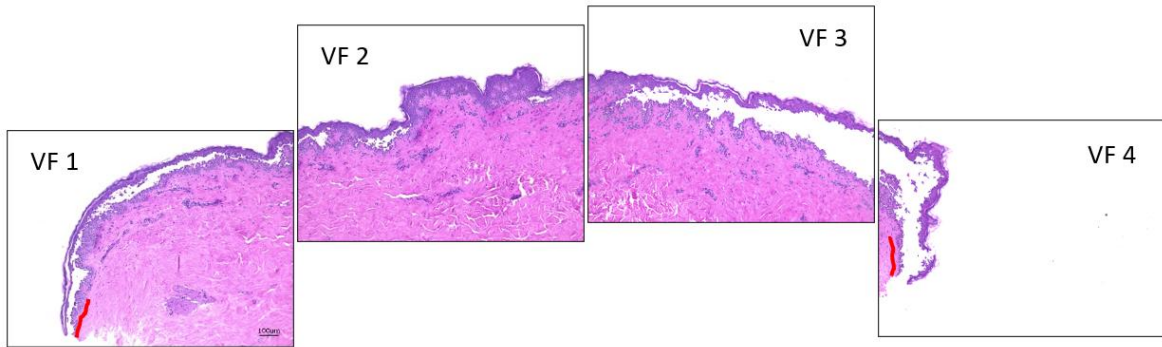


Abbildung 15: Nicht-überlappende Fotos der Epidermis. Die gefärbten Schnitte wurden entlang der kompletten Epidermis in mehreren *visual fields* (VF) ab fotografiert. Von den Außenrändern des Schnitts wurde jeweils 200 µm subtrahiert (rote Linien).

Die Ausmessung der Schnitte erfolgte mit dem Programm ImageJ. Dabei wurde in jedem VF mit einer segmentierten Linie die komplette Länge der Epidermis suprabaasal ausgemessen. Anschließend wurde, sofern vorhanden, mit der gleichen Technik die Länge der intraepidermalen Spaltbildung bestimmt und diese durch die Gesamtlänge der Epidermis geteilt, wodurch die prozentuale Spaltbildung in jedem VF bestimmt wurde $\left[\frac{\text{Länge Spaltbildung VF1}}{\text{Gesamtlänge Epidermis VF1}} = \% \text{ der Spaltbildung VF1} \right]$. Die ersten bzw. letzten 200 µm des ersten bzw. letzten VF wurde von der Gesamtlänge der Epidermis subtrahiert, um Fehler durch mögliche Schneideartefakte zu vermeiden.

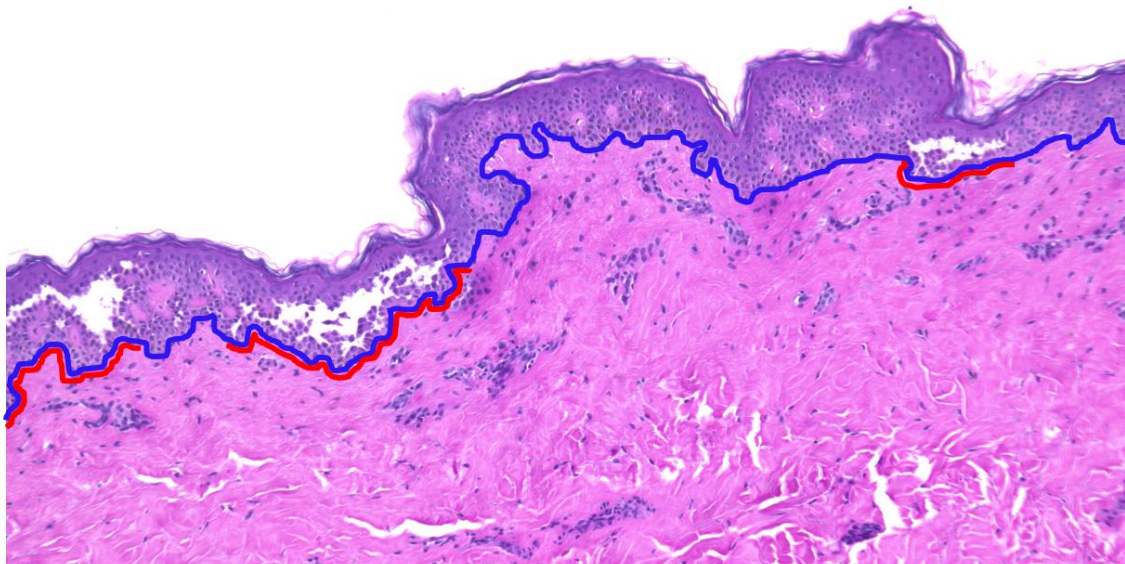


Abbildung 16: Ausmessung der epidermalen Spaltbildung. Exemplarisches Beispiel für die Ausmessung der *visual fields* (VF). Zunächst wurde mit ImageJ die komplette Länge der Epidermis abgemessen (blaue Linie), gefolgt von der Messung des Blasenanteils (rote Linie). Die beiden Werte wurden in ein prozentuales Verhältnis gesetzt.

5.1.4 Direkte Immunfluoreszenz-Färbung

Die direkte Immunfluoreszenz (DIF)-Färbung wurde bei allen erstellten Hautorgan-Kulturen durchgeführt. Dabei wurde auf das bereits injizierte scFv gefärbt, welches an die Keratinozyten bindet. So konnte nachgewiesen werden, dass eine Bindung des Antikörper-Fragments mit einer epidermalen Blasenbildung in Zusammenhang steht.

Vor der Färbung wurden die in TissueTek O.C.T. Compound tiefgefrorenen Proben mit einem Cryostat in 6 µm dicke Proben geschnitten und auf Objektträgern platziert. Bis zur weiteren Verwendung wurden diese bei -80 °C gelagert.

Auf jedem Objektträger waren 2 identische Schnitte. Im Verlauf der DIF wurde ein Schnitt mit, der andere ohne sekundären Antikörper inkubiert. Dadurch konnte die Spezifität des tertiären Antikörpers überprüft und auf jedem Objektträger eine NC der Färbung mitgeführt werden.

Tabelle 10: Verwendete Lösungen und Antikörper-Verdünnungen für die direkte Immunfluoreszenz-Färbung des variablen Einzelkettenfragments.

Waschpuffer	100 mL 10x <i>Tris buffered saline</i> (TBS) 500 µL 2M Calcium-Chlorid (CaCl ₂) 900 mL NanoPure destilliertes Wasser 500 µL Tween-20
Blockpuffer	0,5 g Bovines Serumalbumin (BSA) In Waschpuffer auf Endvolumen von 50 mL verdünnen und steril filtern mit 0.22 µm Filtrapur
Sekundärer Antikörper	Ratte Anti-HA monoklonaler Antikörper High Affinity 0,1 µg / µL Verdünnung 1:100 in Blockpuffer
Tertiärer Antikörper	Alexa Fluor 594 Ziege Anti-Ratte IgG (H+L) Verdünnung 1:200 in Blockpuffer

Vor der Färbung mussten zunächst Waschpuffer und Blockpuffer angesetzt werden (siehe Tabelle). Für die eigentliche Färbung wurden die Schnitte zunächst in einer Feuchtkammer für 3-5 min bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden diese mit einem Fettstift umrandet und für jeweils zweimal 3 min mit Waschpuffer gewaschen. Danach wurde für 30 min mit Blockpuffer inkubiert, um unspezifische Bindestellen für die Antikörper zu blockieren. Nun wurde der sekundäre Antikörper, verdünnt in Blockpuffer, für 60 min auf den Schnitten inkubiert. Darauf folgte dreimal 3 min waschen der Schnitte mit Waschpuffer. Währenddessen wurde der in Blockpuffer verdünnte tertiäre Antikörper mit einer Tischzentrifuge bei Maximalgeschwindigkeit und 4 °C für 5 min lichtgeschützt zentrifugiert. Dann wurde die benötigte Menge an Antikörper-

Verdünnung aus dem oberen Teil des Reaktionsgefäßes auf die Schnitte pipettiert. Nach der Inkubationszeit von 30 min wurden die Schnitte erneut dreimal 3 min mit Waschpuffer gewaschen, bevor sie mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Fluoromount-G eingedeckelt wurden. Abschließend wurden die Schnitte für 60 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt getrocknet und anschließend bei -20 °C in einer Präparate-Mappe gelagert. Das Abfotografieren der Schnitte sollte 24 h nach Abschluss der Färbung erfolgen.

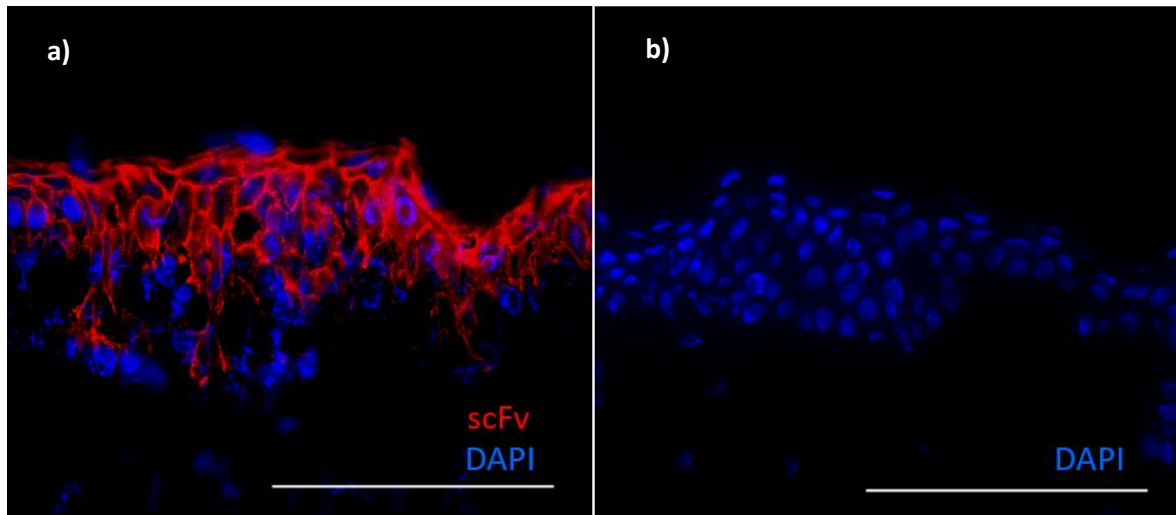


Abbildung 17: Bindeverhalten des variablen Einzelkettenfragments in menschlicher Haut. **a):** Gezeigt ist mit direkter Immunfluoreszenz gefärbtes anti-Dsg1/anti-Dsg3 variables Einzelkettenfragment (scFv) (rot) und 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (blau). Dadurch kann eine Bindung des scFv an die Keratinozyten gezeigt werden. **b):** Direkte Immunfluoreszenz-Färbung eines Schnitts einer mit menschlichem intravenösem Immunglobulin G (IVIg) behandelten Hautprobe. Es ist kein scFv nachweisbar. Maßstabsbalken: 100 µm.

5.1.5 Immunfluoreszenz-Färbung

Um den genauen Ablagerungsort für das scFv zu zeigen, müssen im nächsten Schritt die entsprechenden Antigene (Desmoglein-1 & -3) mittels Immunfluoreszenz (IF)-Färbung nachgewiesen werden. Die IF auf Dsg1 und Dsg3 wurde bei allen erstellten Hautorgankulturen durchgeführt.

Vor der Färbung wurden die in TissueTek O.C.T. Compound tiefgefrorenen Proben mit einem Cryostat in 6 µm dicke Proben geschnitten und auf Objektträgern platziert. Bis zur weiteren Verwendung wurden diese bei -80 °C gelagert.

Auf jedem Objektträger waren 2 identische Schnitte. Im Verlauf der IF wurde ein Schnitt mit, der andere ohne primären Antikörper inkubiert. Dadurch konnte die Spezifität des sekundären Antikörpers überprüft werden. Somit wurde auf jedem Objektträger eine NC der Färbung mitgeführt.

5.1.5.1 Desmoglein-1-Färbung

Tabelle 11: Verwendete Lösungen und Antikörper-Verdünnungen zur Färbung von Desmoglein-1

Waschpuffer	<i>Phosphate-buffered saline (PBS), pH 7,2</i>
Blockpuffer	PBS 10 % Ziegen-Normalserum (ZNS)
Primärer Antikörper	Maus <i>anti-human</i> Desmoglein-1 Antikörper Verdünnung 1:100 in PBS 2 % ZNS
Sekundärer Antikörper	Cy TM 3-komjugierter AffiniPure Ziege Anti-Maus IgG Verdünnung 1:200 in PBS 2 % ZNS

Nach initialer Trocknung der Schnitte für 10 min bei Raumtemperatur, wurden diese für 10 min bei -20 °C in Aceton fixiert. Anschließend wurde jeder Schnitt mit einem Fettstift umrandet und für zweimal 5 min mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Schnitte für 20 min mit 10 % Ziegen-Normalserum (ZNS) präinkubiert und blockiert. Ohne Waschen wurde nun die Verdünnung des primären Antikörpers auf die Schnitte pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am Folgetag wurden die Schnitte dreimalig für 5 min mit PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Währenddessen wurde die Verdünnung des sekundären Antikörpers mit der Tischzentrifuge bei Maximalgeschwindigkeit für einige Sekunden lichtgeschützt zentrifugiert. Dann wurde die benötigte Menge an sekundärer Antikörper-Verdünnung aus dem oberen Teil des Reaktionsgefäßes auf die Schnitte pipettiert und für 45 min in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Danach wurden diese erneut dreimal mit PBS für 5 min gewaschen und abschließend mit DAPI Fluoromount-G eingedeckelt. Nach dem Trocknen für 60 min bei Raumtemperatur wurden sie bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

In **Abb. 18** ist ein Beispielfoto der Färbung dargestellt.

5.1.5.2 Desmoglein-3-Färbung

Tabelle 12: Verwendete Lösungen und Antikörper-Verdünnungen zur Färbung von Desmoglein-3

Waschpuffer	<i>Phosphate-buffered saline (PBS), pH 7,2</i>
Blockpuffer	PBS 10 % ZNS
Primärer Antikörper	Maus Anti-Human Desmoglein-3 Verdünnung 1:50 in PBS 2 % ZNS
Sekundärer Antikörper	Alexa Fluor 488 Ziege Anti-Maus IgG (<i>heavy + light chain</i>) Verdünnung 1:200 in PBS 2 % ZNS

Nach initialer Trocknung der Schnitte für 10 min bei Raumtemperatur, wurden diese für 10 min bei -20 °C in Aceton fixiert. Anschließend wurde jeder Schnitt mit einem Fettstift umrandet und für zweimal 5 min mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Schnitte für 20 min mit 10 % Ziegen-Normalserum (ZNS) präinkubiert und blockiert. Ohne Waschen wurde nun die Verdünnung des primären Antikörpers auf die Schnitte pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am Folgetag wurden die Schnitte dreimalig für 5 min mit PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Währenddessen wurde die Verdünnung des sekundären Antikörpers mit der Tischzentrifuge bei Maximalgeschwindigkeit für einige Sekunden lichtgeschützt zentrifugiert. Dann wurde die benötigte Menge an sekundärer Antikörper-Verdünnung aus dem oberen Teil des Reaktionsgefäßes auf die Schnitte pipettiert und für 45 min in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Danach wurden diese erneut dreimal mit PBS für 5 min gewaschen und abschließend mit DAPI Fluoromount-G eingedeckelt. Nach dem Trocknen für 60 min bei Raumtemperatur wurden sie bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

In **Abb. 18** ist ein Beispielfoto der Färbung dargestellt.

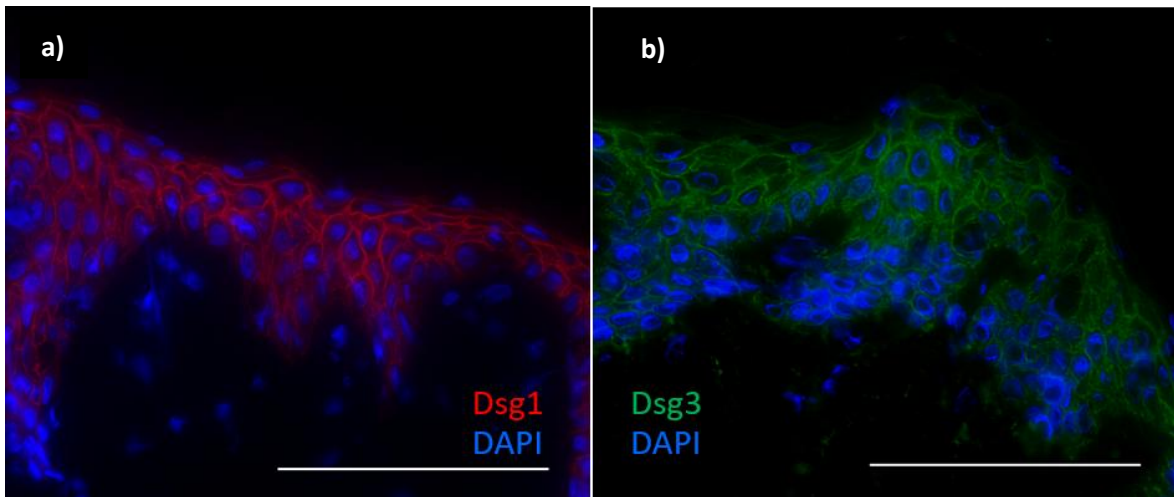


Abbildung 18: Immunfluoreszenz-Färbung von Desmoglein-1 und Desmoglein-3. **a):** Gezeigt ist das Immunfluoreszenz gefärbte Cadherin Desmoglein-1 (rot) und 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (blau). **b):** Gezeigt ist das Immunfluoreszenz gefärbte Cadherin Desmoglein-3 (grün) und DAPI (blau); Maßstabsbalken 100 μm .

5.2 Messung der Kinase-Aktivität mit der PamGene-Technologie

Die Hautstanzen mussten zunächst für die eigentliche Messung in der PamStation vorbereitet werden. Dafür wurden die Proben erst mechanisch zerkleinert, bevor aus ihnen mittels eines Lyse-Puffers die vorhandenen Proteine isoliert wurden. Nachdem das entstandene Lysat auf ausreichende Protein-Konzentration getestet wurde, konnten die Kinasen im Protein-Lysat auf deren Aktivität in der PamStation gemessen werden. Im Folgenden sind die Einzelschritte detailliert beschrieben.

5.2.1 Anfertigung von Haut-Schnitten für die PamGene-Messung

Zu Beginn wurden die 4 mm Biopsie-Hautstanzen mechanisch zerkleinert. Die Hautproben wurden mittels eines Cryostats in viele einzelne Schnitte zerlegt, wodurch die Gesamtoberfläche des Gewebes deutlich erhöht wurde.

Vorbereitend wurde der Cryostat auf eine Temperatur von mindestens $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgekühlt. Außerdem wurden beschriftete 1,5 mL Reaktionsgefäße für eine Stunde bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgekühlt, wodurch ein späteres Anhaften oder Schmelzen des Gewebes an der Innenseite der Gefäße verhindert wurde. Die Proben, Reaktionsgefäße, sowie eine Pinzette, wurden im Cryostat platziert. Zum Schneiden der Hautstanze wurde diese mit ultrareinem Wasser auf der Präparate-Halterung des Cryostats festgefroren, da reguläres Cryomatrix-Einfriermedium nicht mit der PamStation kompatibel ist.

Nach dem Schneiden der Hautstanze in 30 µm dicke Schnitte, wurden diese vorsichtig mit der Pinzette in dem präparierten Reaktionsgefäß platziert. Die Schnitte mussten während der Handhabung durchgängig gefroren bleiben, um die Struktur der Proteine nicht zu zerstören. Dabei war die Integrität der Schnitte weniger entscheidend als bei histologischen Schnitten, da lediglich die Proteine aus dem Gewebe extrahiert wurden. Die Gewebeschnitte enthaltenden Reaktionsgefäße wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

5.2.2 Anfertigung des Gewebe-Lysats

Im nächsten Schritt wurden aus den zerkleinerten Hautstanzen mittels eines Lyse-Puffers die Proteine extrahiert. Dabei sollten alle Proben in der gleichen Weise bearbeitet werden, um Vergleichbarkeit zu wahren. Alle verwendeten Proben, Lösungen und Gefäße wurden kaltgestellt verwendet. Während der Prozedur musste schnellstmöglich gearbeitet werden, weshalb nicht mehr als 4-6 Proben gleichzeitig bearbeitet wurden.

Eine Zentrifuge wurde auf 4 °C vorgekühlt, sowie alle Lösungen und Gefäße auf Eis gestellt. Der Lyse-Puffer wurde hergestellt, indem Halt™ Phosphatase Inhibitor- und Halt™ Protease Inhibitor Cocktail 1:100 in M-PER™ (*Mammalian Protein Extraction Reagent*) verdünnt, und anschließend auf Eis gestellt wurde. Pro Probe wurden mindestens drei 200 µL Reaktionsgefäße beschriftet und auf -20 °C vorgekühlt, in welche später das fertige Protein-Lysat abgefüllt wurde.

Die mit den Hautschnitten gefüllten Reaktionsgefäße wurden nun von -80 °C auf Eis gestellt, wo sie für 2 min belassen wurden. Anschließend wurde, je nach Gewebemenge, 60-100 µL Lyse-Puffer zu den gefrorenen Gewebeschnitten hinzugegeben. Dabei wurde durch mehrmaliges resuspendieren der Mixtur mit einer Pipette das Gewebe zerkleinert, wurde eine weitestgehend homogene Lösung entstand. Dabei musste vorsichtig agiert werden, um die Struktur der Proteine nicht zu verändern. Danach folgte eine Inkubation der Suspension auf Eis von 30 min, in welcher diese regelmäßig zur Förderung des Prozesses vermengt wurde.

Nun wurden die Reaktionsgefäße in der vorgekühlten Zentrifuge für 15 min / 4 °C bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Anschließend wurde das überstehende Lysat mit den gelösten Proteinen auf die gekühlten 200 µL Reaktionsgefäße verteilt. Dieses wurde auf mindestens 3 Gefäße à 20 µL pro Gefäß aliquotiert, um Gefrier-Auftau-Zyklen des Lysats zu vermeiden. Aus einem dieser Aliquots wurde im Weiteren mittels Bicinchoninsäure (*BCA*) *Protein Assay* die Protein-Konzentration des Lysats bestimmt, da für die PamGene-Messung eine Mindestkonzentration benötigt wurde. Die anderen Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

5.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration im Lysat

Zur Bestimmung der Protein-Konzentration wurde ein BCA-Protein-Assay mittels Mikroplattenverfahren durchgeführt. Diese Methode beruht auf dem Prinzip einer Biuret-Reaktion. Zunächst musste eine Albumin-Standard-Reihe hergestellt werden. Dafür wurde der Inhalt einer 1 mL bovines Serumalbumin (BSA)-Ampulle mit einer Konzentration von 2 mg/mL in insgesamt neun 1,5 mL Reaktionsgefäßen verdünnt. Dabei wurde das gleiche Verdünnungsmittel verwendet wie bei den Proben, M-PER™. Das genaue Herstellungsschema der Albumin-Standard-Reihe ist der folgenden **Tabelle 13** zu entnehmen.

Tabelle 13: Verdünnungsschema für das Mikroplatten-Verfahren (Arbeitsbereich = 20-2000 µg/mL)

Gefäß	Volumen des Lösungsmittels [µL]	Volumen und Herkunft des BSA [µL]	Finale BSA-Konzentration [µg/mL]
A	0	300 vom Standard	2000
B	125	375 vom Standard	1500
C	325	325 vom Standard	1000
D	175	175 Gefäß B Lösung	750
E	325	325 Gefäß C Lösung	500
F	325	325 Gefäß E Lösung	250
G	325	325 Gefäß F Lösung	125
H	400	100 Gefäß G Lösung	25
I	400	0	0 = Leerprobe

Quelle: ThermoFisher Scientific, Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Letzter Zugriff am 30.01.2021.

Das hergestellte Lysat wurde vor der Durchführung des Assays 1:10 in M-PER™ verdünnt, um sicherzugehen, dass die gemessene Protein-Konzentration innerhalb des Arbeitsbereiches von 20-2000 µg/mL liegt. Dafür wurde 6 µL des Lysats mit 54 µL des Verdünnungsmittels gemischt. Außerdem wurde ein Arbeitsreagenz (WR) angesetzt, welches im Verhältnis 50:1 aus BCA Reagenz A und BCA Reagenz B bestand. Reagenz A, ein Carbonat-Puffer, der BCA-Reagenz enthält, und Reagenz B, eine Kupfersulfatlösung, ergaben zusammen eine grüne Lösung.

Für das Mikroplatten-Verfahren wurde eine 96-Well-Platte verwendet. Es wurden 25 µL jeder verdünnten Probe bzw. Standards in zweifacher Ausführung in ein Mikroplatten-Well pipettiert. Anschließend wurden 200 µL BCA WR pro Well hinzugegeben. Nach kurzem Durchmischen der Komponenten wurde die 96-Well-Platte für 30 min bei 37 °C inkubiert. Dabei kam es zum Farbumschlag des WR von grün zu violett, welcher linear zur Proteinkonzentration in der Lösung zunahm. Danach wurde mit einem Plattenlesegerät die Extinktion der Lösungen bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen. Die Werte der Replikate wurden gemittelt.

Eine Standardkurve wurde erstellt, indem die mittleren Absorptionswerte der Standards gegen ihre jeweilige Konzentration aufgetragen wurden. Diese wurde dann verwendet, um die Proteinkonzentration jeder Probe, basierend auf ihrem mittleren Absorptionswert, zu ermitteln.

5.2.4 Messung und Interpretation der Kinase-Aktivität mittels PamGene-Technologie

Da alle Gewebe-Lysate ausreichende Proteinkonzentrationen aufwiesen, konnten alle 15 Proben für die PamGene-Messung verwendet werden (5xNC / 5xPC / 5xPrednisolon+scFv). Der eigentliche Messvorgang wurde freundlicherweise von Colin Osterloh, naturwissenschaftlicher Doktorand der Arbeitsgruppe Ludwig, durchgeführt. Die erhobenen Messwerte wurden mittels der zugehörigen BioNavigator[®]-Software analysiert. Bei der Interpretation der Ergebnisse war nicht der Absolutwert der Kinasen-Aktivität in jeder Probe entscheidend, sondern der Aktivitätsunterschied zwischen zwei verschieden behandelten Proben (z.B. NC vs. PC).

Es stellte sich heraus, dass der Vergleich von NC vs. PC die interessantesten Ergebnisse lieferte. In diesem Vergleich waren in der PC insgesamt acht Kinasen in ihrer Aktivität signifikant gesteigert. Um die erhobenen Ergebnisse zu validieren, wurden Zellkultur-Experimente durchgeführt, in welchen durch möglichst spezifische Inhibitoren die entsprechenden Kinasen gehemmt und so deren Rolle im Pathomechanismus bei PV beurteilt werden sollte. Für sieben der insgesamt acht aktivierten Kinasen konnte ein geeigneter Inhibitor gefunden werden, welche im Weiteren in einem Keratinozyten-Dissoziations-Assay auf deren Wirkung getestet wurden.

5.3 Zellkultur

Die Zellkultur ist eine etablierte, weit verbreitete Methode. Sie erlaubt eine Untersuchung der Physiologie des Zell-Stoffwechsels unter standardisierten Bedingungen, welche *in vivo* nicht ohne weiteres möglich wären. Mit Zellkulturen kann das Verhalten einzelner Zelltypen ohne den Einfluss von systemischen Schwankungen untersucht werden. Dabei handelt es sich in der Regel um Zellen, die dem ursprünglichen Gewebe (durch enzymatische, mechanische, oder chemischer Dissoziation), einer Primärkultur oder einer Zelllinie entnommen wurden. Dabei wird unter strengen, sterilen Laborbedingungen in einer kontrollierten Umgebung gearbeitet, was Temperatur, Gase und Drücke beinhaltet. Sie sollte die *in vivo*-Umgebung erfolgreich imitieren, so dass die Zellen in der Lage sind, auf kontrollierte Weise zu überleben und sich zu vermehren (Philippeos et al., 2012).

5.3.1 Humane adulte niedriges Calcium hohe Temperatur Zellen

Für die Zellkultur-Experimente wurden humane adulte niedriges Calcium hohe Temperatur Zellen (HaCaT-Zellen) verwendet. Dabei handelt es sich um eine *in vitro* spontan transformierte Zelllinie

humaner adulter Keratinozyten, welche immortalisiert, allerdings nicht tumorauslösend und *in vivo* nicht invasiv sind. Auch nach vielen Passagen behalten HaCaT-Zellen ihre Fähigkeit zur normalen Differenzierung bei und bieten somit ein geeignetes und stabiles Modell für Verhornungsstudien (Boukamp et al., 1988). Bei niedrigen Medium-Kalziumkonzentrationen (0,02-0,1 mM) wachsen Keratinozyten sehr schnell und bilden lediglich eine Zellschicht. Sie weisen keine Desmosomen auf, wohingegen Gap Junctions sehr häufig beobachtet werden. Eine Erhöhung der Kalzium-Konzentration auf 1,2-1,8 mM induziert eine Schichtung der Keratinozyten in 4-6 Zellschichten, Bildung von verhornten Zellhüllen, sowie starke Ausbildung von Desmosomen (Hennings and Holbrook, 1983). HaCaT-Zellen sind wie normale Keratinozyten in der Lage, Dsg1, Dsg2 und Dsg3 auszubilden. Im Gegensatz zu Dsg2 und Dsg3, welche sowohl bei niedrigen als auch bei hohen Kalziumkonzentrationen im Medium ausgebildet werden, wird Dsg1 lediglich bei Medium mit hohem Kalziumgehalt gebildet (Denning et al., 1998).

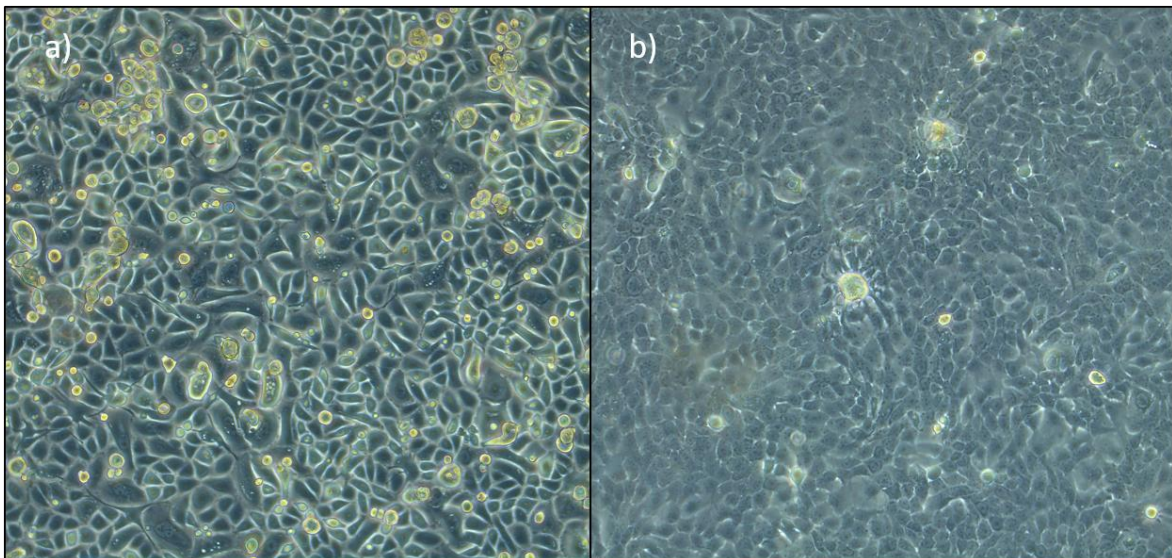


Abbildung 19: Kalziumabhängige Differenzierung von Keratinozyten. a) Gezeigt sind Keratinozyten kultiviert in Low- Ca^{2+} KGM2 (0,06 mM). Die Zellen proliferieren stark und liegen einschichtig mit Ausläufern vor. b) Gezeigt sind Keratinozyten kultiviert in High- Ca^{2+} KGM2 (1,5 mM). Die Zellen bilden untereinander verstärkt Desmosomen und verhornte Zellhüllen aus. KGM2 = Keratinocyte Growth Medium 2.

5.3.2 Kultivierung von Humanen adulten niedriges Calcium hohe Temperatur Zellen

Die HaCaT-Zellen wurden in 75 cm² oberflächenbehandelten (TC)-Zellkultur-Flaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Als Wachstums-Medium wurde Low Ca^{2+} *Keratinocyte Growth Medium 2* (KGM2) verwendet. Dafür wurde Basal Medium mit dem dazugehörigen SupplementMix, sowie 0,06 mM CaCl₂ versetzt. Dieses wurde in 50 mL Zentrifugenröhrchen aliquotiert und bei 4 °C gelagert.

Das Arbeiten mit den HaCaT-Zellen erfolgte ausschließlich unter einem sterilen Abzug. Alle verwendeten Reagenzien wurden 15 min vor Benutzung in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Das Medium der 75 cm² TC-Flaschen wurde alle 2 Tage erneuert. Dafür wurde dieses mit einer Vakuum-Pumpe abgesaugt, bevor mit einer serologischen Pipette frische 10 mL Low Ca²⁺ KGM2 auf die Zellen gegeben wurde. Bei jedem Medium-Wechsel wurden die Zellen unter dem Mikroskop auf deren Morphologie, mögliche Infektionen, sowie deren Konfluenz überprüft.

Sobald die HaCaT-Zellen annähernd konfluent waren (ca. 95 %), wurden diese in frische TC-Flaschen passagiert und aufgeteilt. Dafür wurden zunächst das Medium abgesaugt, bevor 2 mL 0,05 % Trypsin / 0,02 % Ethylendiamintetraacetat (EDTA) auf die Zellen gegeben und anschließend für 10 bis maximal 15 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert wurde. Durch diesen Schritt wurden die Zellen sowohl voneinander als auch von der TC-Flasche gelöst. Gestoppt wurde die Trypsin-Reaktion durch die Zugabe von 10 mL Fetalem Bovinem Serum (FBS), verdünnt auf 10 % in DPBS. Die Lösung wurde in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 220 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Zell-Pellet in 2 mL Low Ca²⁺ KGM2 resuspendiert. Je 1 mL der Zell-Suspension wurde in eine frische, präparierte TC-Flasche mit 9 mL vorgelegtem Low Ca²⁺ KGM2 gegeben. Die passagierten HaCaT-Zellen wurden nun erneut bis zum ersten Medium-Wechsel inkubiert.

5.3.3 Keratinozyten-Dissoziations-Assay

Das Keratinozyten-Dissoziations-Assay ist eine etablierte Methode, um *in vitro* die Stärke der Zell-Zell-Adhäsion innerhalb eines Keratinozyten-Monolayers (einschichtiger Zellrasen) zu testen (Beckert et al., 2019). Es kann genutzt werden, um einen akantholytischen Effekt von PV-Antikörpern (bzw. scFv) zu quantifizieren (van der Wier et al., 2010) und mögliche anti-akantholytisch wirksame Substanzen auf deren Wirksamkeit zu testen (Burmester et al., 2020).

Bei dieser Methode wird ein einschichtiger Zellrasen gezüchtet, auf welchem PV-Antikörpern bzw. anti-Dsg1/anti-Dsg3 scFv inkubiert werden. Dann wird das Enzym Dispase auf die Zellen gegeben, sodass sich das Zell-Monolayer vom Boden der Platte löst, die Zell-Zell-Kontakte allerdings unbeeinflusst bleiben. Anschließend werden die Keratinozyten mechanischem Stress ausgesetzt, wodurch es im Falle einer Schwächung der desmosomalen Adhäsion durch pathogene Antikörper zur Fragmentierung des Monolayers kommt (PC). Zusätzlich zu den Antikörpern können nun noch Substanzen / Inhibitoren auf die Zellen gegeben werden, um mögliche anti-akantholytischen Effekte zu testen. In diesem Falle würde ein mechanischer Stressreiz in einer verminderten Fragmentierungsrate resultieren. Die Anzahl der Fragmente wird ins Verhältnis zu der Anzahl in der PC gesetzt, um die Wirkung der getesteten Substanz zu evaluieren. Als NC dienen Zellen,

welche lediglich mit IVIG behandelt werden. In diesem Falle entstehen durch den Stressreiz nur wenige Fragmente. Beispielhafte Fotos des Experiments können der **Abb. 20** entnommen werden.

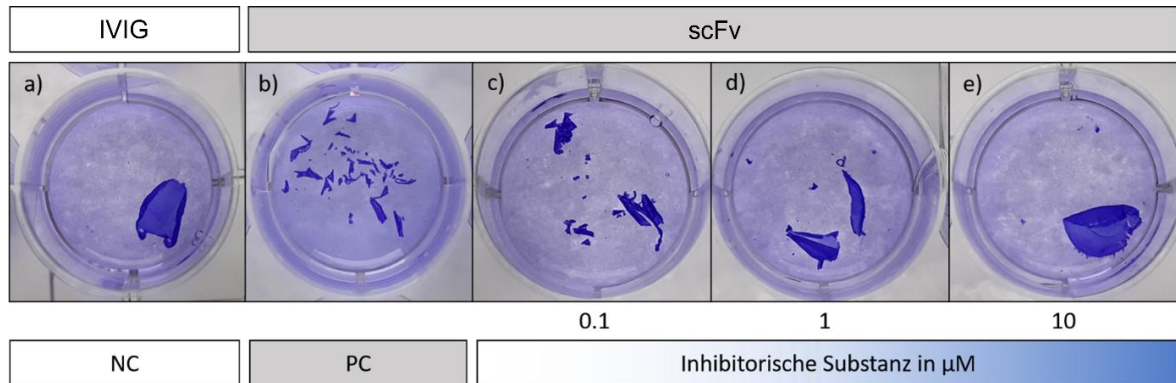


Abbildung 20: Beispiel einer Inhibitor-Evaluierung im Keratinozyten-Dissoziations-Assay. Keratinozyten-Monolayer nach Inkubation mit Antikörper und Kinase-Inhibitor, Dispase-Behandlung und mechanischer Reizung. **a)** Bei Behandlung mit normalen humanen Immunglobulin G als Negativkontrolle bleibt der Monolayer weitestgehend intakt. **b)** Deutliche Fragmentierung des Monolayers durch Behandlung mit scFv als Positivkontrolle. **c)-e)** Inkubation von Test-Substanz und Antikörper zeigt verminderte Fragmentierung mit aufsteigender Substanzkonzentration. IVIG: intravenöses Immunglobulin G, scFv: variables Einzelkettenfragment, NC: Negativkontrolle, PC: Positivkontrolle, µM: Mikromolar.

5.3.4 Ablauf des Keratinozyten-Dissoziations-Assays

Beim Keratinozyten-Dissoziations-Assay wurde als pathogener Antikörper das gleiche scFv verwendet wie in den vorherigen Experimenten im Hautorgan-Kulturmodell. In Vorversuchen musste zunächst die optimale Menge an scFv pro Well ermittelt werden, was in mehreren Versuchsabläufen in aufsteigenden scFv-Konzentrationsreihen geschehen ist.

Der komplette Versuchsablauf erstreckte sich über 6-7 Tage. Zu Beginn wurden die HaCaT-Zellen auf 12-Well-Zellkulturplatten ausgesät, wobei jedes Well 1 mL Low Ca²⁺ KGM2 mit 5x10⁴ Zellen beinhaltete. Dafür wurde das Zell-Pellet (siehe 4.3.2.) in 1 mL Low Ca²⁺ KGM2 resuspendiert und 10 µL dieser Lösung in einem Reaktionsgefäß mit 80 µL Low Ca²⁺ KGM2 und 10 µL Trypanblau-Lösung 0,04 % gemischt (1:10 Verdünnung). Mit einer Neubauer-Zählkammer konnte die Zellzahl in dieser Lösung bestimmt werden. Im Weiteren wurde das in 1 mL resuspendierte Zell-Pellet mit Low Ca²⁺ KGM2 so weit verdünnt, dass pro mL Lösung die richtige Anzahl an Zellen vorhanden war. Die bestückten 12-Well-Zellkulturplatten wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, bis die Zellen eine Konfluenz von annähernd 100 % erreicht hatten. War dies der Fall, wurde das Medium von 1 mL Low Ca²⁺ KGM2, auf 500 µL High Ca²⁺ KGM2 (1,5 mM) gewechselt, was die Ausbildung von Desmosomen stark fördert.

Da sieben verschiedene Kinase-Inhibitoren getestet wurden, wurden insgesamt sieben 12-Well-Zellkulturplatten angefertigt. Auf jeder Platte wurde eine PC und eine NC mitgeführt, sowie drei

verschiedene Konzentrationen (0,1 μM / 1 μM / 10 μM) eines Inhibitors in jeweils dreifacher Ausführung.

Nach exakt 22 h Inkubationszeit, wurde das Medium entfernt und die Kinase-Inhibitoren in High Ca^{2+} KGM2 mit einem Gesamtvolumen von 500 μL pro Well auf die Zellen gegeben. Da die Inhibitoren in 0,1 % Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst waren, wurden auch die PC und NC mit 0,1 % DMSO, gelöst in High Ca^{2+} KGM2, behandelt.

Nach 2-stündiger Präinkubation der Zellen mit den Inhibitoren wurden diese nach Entfernung des Überstands erneut hinzugegeben. Zusätzlich wurde das scFv in einer Endkonzentration von 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sowohl zur PC als auch zu den bereits mit Inhibitoren vorbehandelten Wells hinzugegeben. Die NC wurde mit IVIG behandelt (Endkonzentration 225 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Die IVIG der NC wurden fünffach höher konzentriert als die scFv, da deren Molekulargewicht um den gleichen Faktor größer ist und somit die gleiche Anzahl potenzieller Bindungen vorlag. Außerdem wurden sowohl PC also auch NC erneut mit 0,1 % DMSO behandelt, um die Vergleichbarkeit mit den Inhibitor-behandelten Wells zu bewahren. Es folgte eine Inkubation der Platten für 24 h (37°C / 5 % CO_2).

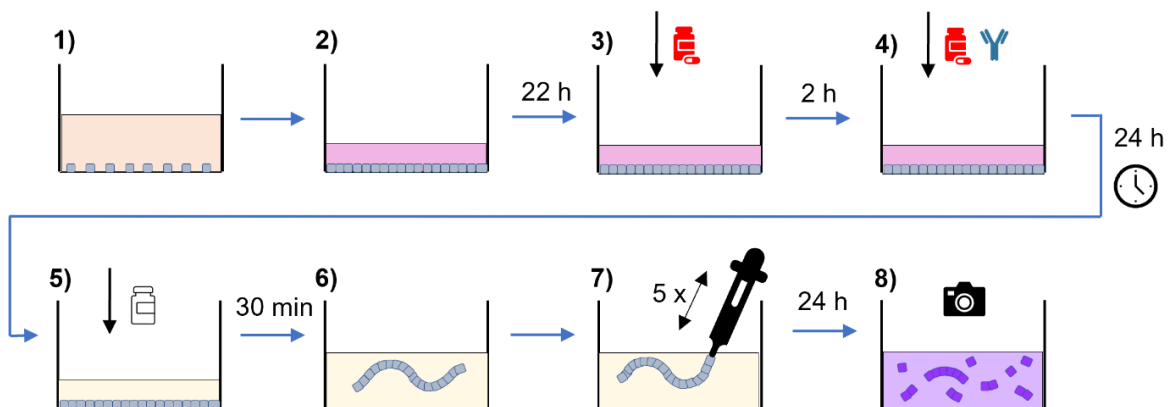


Abbildung 21: Ablauf des Keratinozyten-Dissoziations-Assays. **1)** Die Keratinozyten werden auf 12-Well-Platten bei 37 °C / 5 % CO_2 in Low- Ca^{2+} KGM2 inkubiert. **2)** Bei konfluentem Zell-Rasen erfolgt ein Medium-Wechsel auf High- Ca^{2+} KGM2. **3)** Nach 22 h erfolgte eine 2-stündige Inkubation mit Inhibitor. **4)** Anschließend eine 24-stündige Inkubation mit Inhibitor und scFv. **5)-6)** Ablösung des Monolayers von der Platte durch 30-minütige Inkubation mit Dispase. **7)** Mechanische Reizung des Zell-Monolayers durch 5-maliges Pipettieren. **8)** Fotografieren und Auszählen der gefärbten Zell-Fragmente am Folgetag.

Nach Ablauf der Inkubation wurde der Überstand entfernt und jedes Well zweimal mit 1 mL *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) gewaschen. Anschließend wurde 500 μL der zuvor auf eine Zielkonzentration von 2,5 U/mL verdünnten Dispase/HBSS-Lösung in die Wells gegeben, wodurch sich diese nach 30-minütiger Inkubation (37 °C / 5 % CO_2) als ein Zell-Monolayer vom Boden der Wells lösten. Es folgte zweimaliges Waschen der Zell-Monolayer mit je 500 μL HBSS, bevor diese in 1 mL HBSS belassen wurden.

Die Zell-Monolayer wurden mit einer 1 mL Pipette durch 5-maliges Auf- und Abpipettieren mechanischem Stress ausgesetzt, wodurch es ggf. zu einer Fragmentierung der Zell-Monolayer in mehrere Fragmente kam. Ein Anhaften von Zell-Fragmenten an der Innenseite der Pipettenspitze wurde verhindert, indem diese zuvor für ca. 30 min in 1 %-igem bovines Serumalbumin, gelöst in HBSS, gelagert wurden.

Anschließend wurden die Zellen in 100 μ L Roti[®]-Histofix 4% pro Well fixiert und mit 1 μ L einer Crystal-Violet-Lösung angefärbt. Am Folgetag wurde jedes Well einzeln mit einer hochauflösenden Kamera abfotografiert und alle Fragmente auf dem Computer mit dem Programm ImageJ ausgezählt.

5.4 Statistische Auswertung

Für die statistische Analyse der erhobenen Daten im Hautorgan-Kulturmodell und Zellkultur-Modell wurde das Programm GraphPad Prism 8 verwendet. Die erhobenen Daten wurden zunächst auf Normalverteilung getestet, bevor sie mit statistischen Tests auf deren Signifikanz geprüft wurden. Alle Daten waren nicht gepaart und unabhängig voneinander. Die Tests auf Normalverteilung umfassten den Anderson-Darling Test, D'Agostino & Pearson Test, Shapiro-Wilk Test und den Kolmogorov-Smirnov Test. Waren die Daten beim Vergleich mehrerer Gruppen normalverteilt, wurde sie mit dem one-way ANOVA und dem Tukey's Posthoc-Test auf deren Signifikanz geprüft. Bei keiner Normalverteilung, wurde stattdessen der Kruskal-Wallis-Test und der Dunns' Posthoc-Test verwendet. Wurden lediglich zwei Gruppen mit Normalverteilung miteinander verglichen, wurde der t-Test durchgeführt. Bei zwei nicht normalverteilten Gruppen der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. Jeweils letzteres war bei den vorhandenen Daten der Fall. Bei den Daten der Zellkultur-Experimente wurde zusätzlich noch ein Ausreißer-Test nach Grubbs angewendet. Die ermittelten p-Werte wurden bei einem $p \leq 0,05$ als signifikant markiert.

* = $p \leq 0,05$

** = $p \leq 0,01$

*** = $p \leq 0,001$

**** = $p \leq 0,0001$

6 Ergebnisse

6.1 Exprimierung von Desmoglein-1 und Desmoglein-3

Durch die Färbung von Dsg1 und Dsg3 konnte deren Ausprägungsmuster in der Epidermis gezeigt werden, welches sich durch ein Wabenmuster um die blau gefärbten Zellkerne präsentierte. Es zeigte sich eine bevorzugte Ausprägung von Dsg1 in den apikalen Schichten der Epidermis, während Dsg3 eher basal exprimiert wurde (**Abb. 22**). Die Färbung wurde bei allen Hautorgankulturen durchgeführt und von jeder Probe ein exemplarisches Foto geschossen.

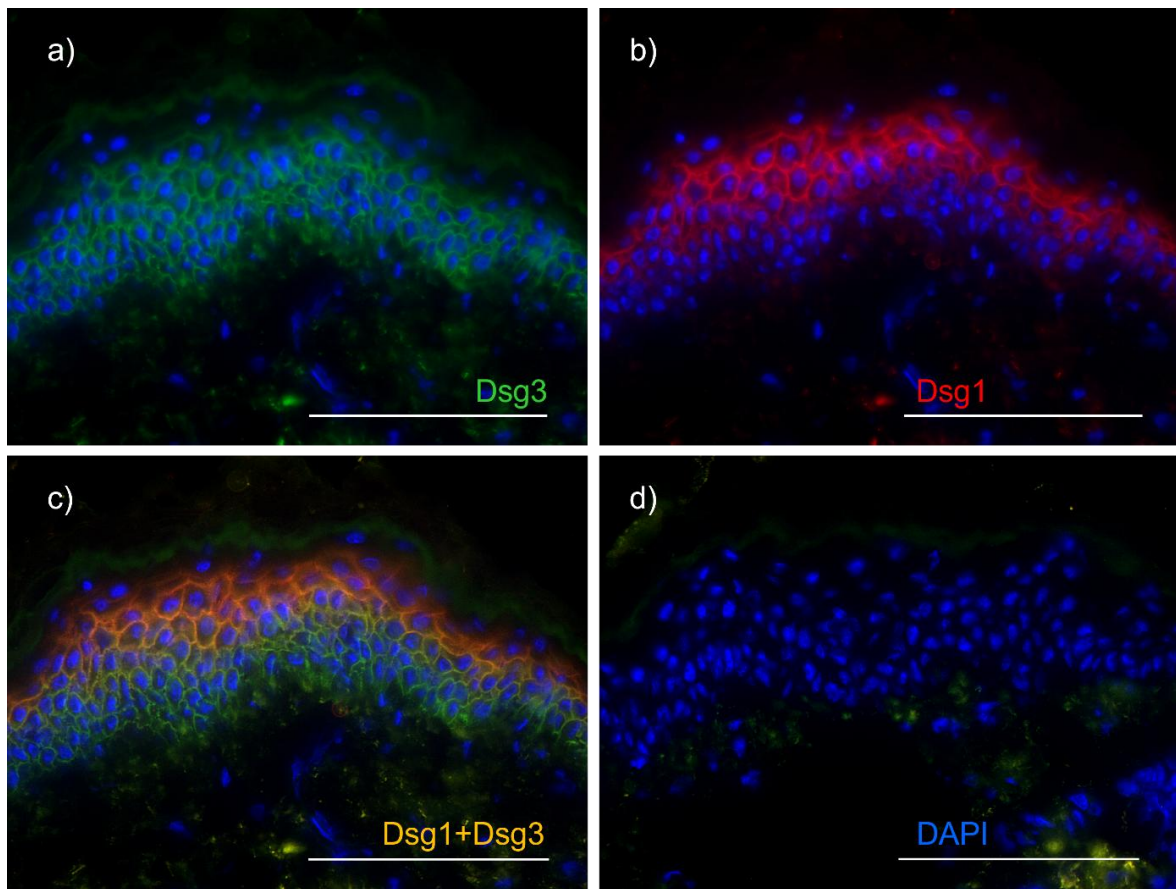


Abbildung 22: Ausprägungsmuster von Desmoglein-1 und -3 in der Epidermis. Hier eine exemplarische Darstellung der Färbung der Desmogleine (Dsg) einer Hautprobe. Es zeigt sich eine wabenartige Ausprägung von Dsg1 und 3 über die komplette Epidermis um die Zellkerne (blau) herum, wobei Dsg1 (rot) bevorzugt apikal, Dsg3 (grün) eher basal exprimiert ist. **a)** Färbung von Dsg3. **b)** Färbung von Dsg1. **c)** Dsg1 und Dsg3 im *overlay* (orange). **d)** Negativkontrolle der Färbung. DAPI = 4,6-Diamidin-2-Phenylindol. Maßstabsbalken: 100 μ m.

6.2 Das variable Einzelkettenfragment löst epidermale Spaltbildung in menschlicher Haut aus

In der HE-Färbung ist deutlich zu sehen, dass durch die Injektion des scFv in die Dermis der Haut eine suprabasale Spaltbildung ausgelöst wird. Durch die Injektion von IVIG wurde diese Spaltbildung nicht ausgelöst (**Abb. 23**).

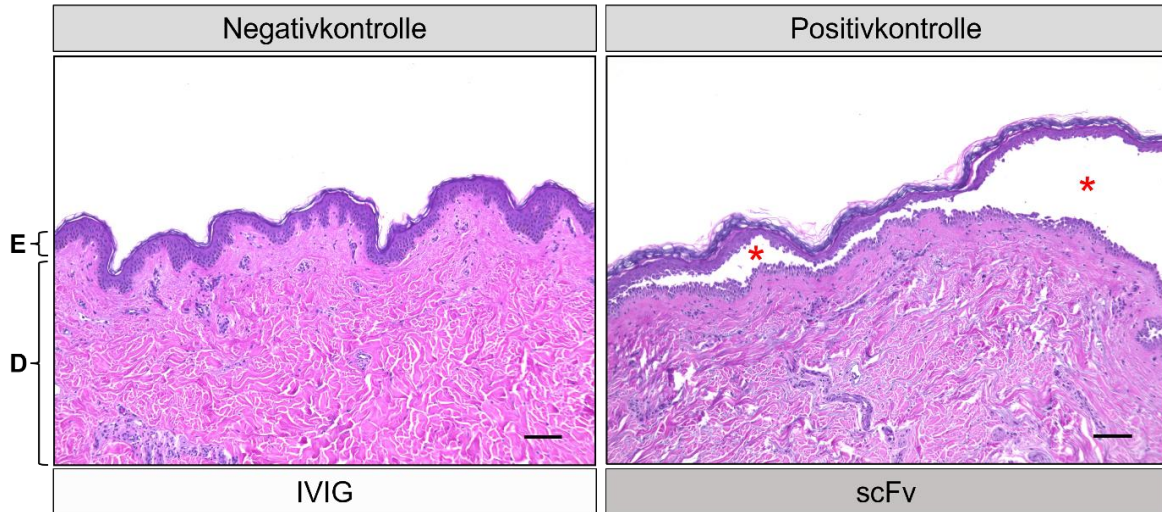


Abbildung 23: Die Injektion des variablen Einzelkettenfragments in die Dermis löst Spaltbildung aus. In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist deutlich zu erkennen, dass die Injektion des variablen Einzelkettenfragments (scFv) in die Dermis eine suprabasale Spaltbildung verursacht (rote Sterne). Diese Hautprobe stellte die Positivkontrolle dar. Eine Probe mit Injektion von intravenösem Immunglobulin G (IVIG) löste keine Spaltbildung aus und stellte somit die Negativkontrolle dar. E = Epidermis. D = Dermis. Maßstabsbalken: 100 μ m.

Bei der statistischen Auswertung der quantitativen, histometrischen Ausmessung der intraepidermalen Spaltbildung wurde jedes VF einzeln gewertet. Dabei zeigte sich im Vergleich von der Behandlung mit scFv und IVIG ein hochsignifikanter Unterschied in der quantitativen Spaltbildung nach 24-stündiger Inkubationszeit (**Abb. 24**).

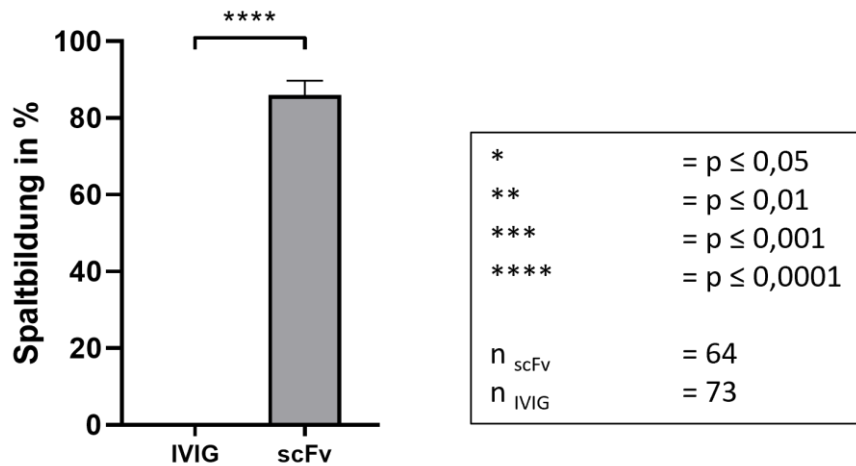


Abbildung 24: Hochsignifikanter Unterschied in der prozentualen intraepidermalen Spaltbildung im Hautorgan-Kulturmodell. Die prozentuale intraepidermale Spaltbildung ist graphisch als Balkendiagramm mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Es wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test durchgeführt. Der Vergleich der Behandlungen mit variablem Einzelkettenfragment (scFv) und intravenösem Immunglobulin G (IVIG) zeigte einen hochsignifikanten Unterschied. n = Anzahl ausgewerteter *visual fields*.

6.3 Bindeverhalten des variablen Einzelkettenfragments

Mit der Färbung des scFv konnte dessen Bindeverhalten untersucht werden. Die Färbung wurde bei jeder Hautprobe durchgeführt. Es zeigte sich eine ausgeprägte Rotfärbung der Epidermis in allen Hautproben, in welche das scFv injiziert wurde (**Abb. 25**). Das deckt sich mit der Tatsache, dass das scFv gegen Dsg1 und Dsg3 gerichtet ist, welches ausschließlich in der Epidermis exprimiert wird (siehe 5.1). Dementsprechend ist auch hier das wabenartige Muster um die Zellkerne herum sichtbar. Bei Hautproben, in welche keine Injektion bzw. lediglich IVIG injiziert wurde, zeigte sich keine Rotfärbung der Epidermis.

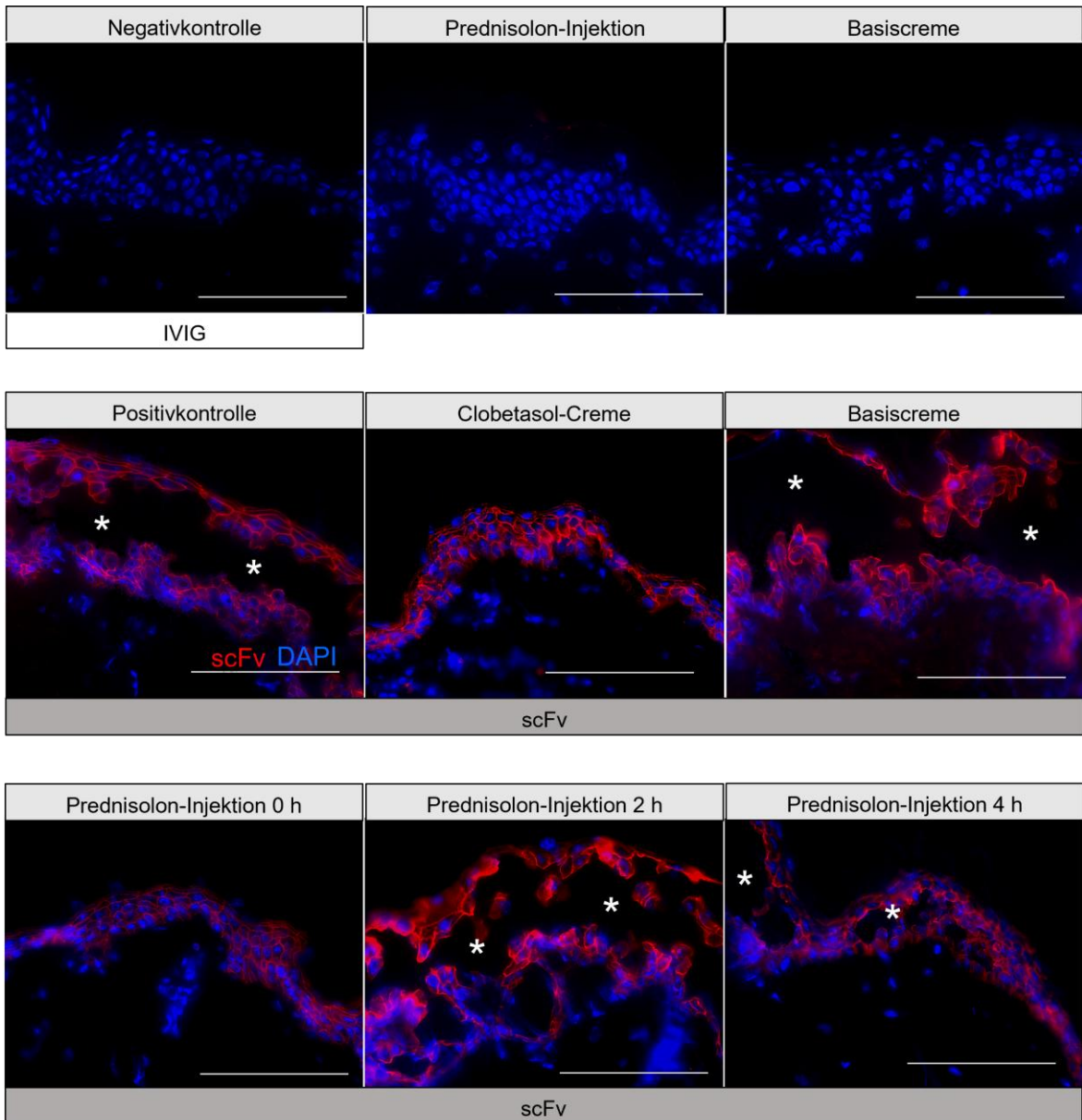


Abbildung 25: Beispielhafte Fotos der Färbung des variablen Einzelkettenfragments. Es ist ein exemplarisches Foto für jede durchgeführte Behandlung dargestellt. Das variable Einzelkettenfragment (scFv) bindet in der Epidermis an Desmoglein (Dsg) -1 und -3 (rot). Die Färbung war in allen Fällen positiv, in denen das scFv in die Dermis injiziert wurde. Wurde keine Injektion oder intravenöses Immunglobulin G (IVIG) als Negativkontrolle injiziert, zeigte sich keine Rotfärbung der Epidermis. * = Spaltbildung. DAPI = 4,6-Diamidin-2-Phenylindol. Maßstabsbalken: 100 µm.

6.4 Eine intradermale Injektion von Prednisolon zeigt keine signifikante Reduktion der Spaltbildung im Hautorgan-Kulturmodell

Im Hautorgan-Kulturmodell konnte die Spaltbildung in denen mit scFv behandelten Hautproben durch die intradermale Injektion von Prednisolon nicht signifikant reduziert werden. Das lässt sich bereits in den beispielhaften HE-Bildern (**Abb. 26**) an der deutlichen intraepidermalen Spaltbildung erahnen. Sowohl die gleichzeitige Gabe von scFv und Prednisolon als auch die 2-, bzw. 4-stündiger Präinkubation von Prednisolon mit anschließender Injektion des scFv, konnte die Spaltbildung nicht signifikant hemmen. Wurde ausschließlich Prednisolon injiziert, fand keine Spaltbildung statt. Es wurde immer ein PC und eine NC mitgeführt. Die Hautproben wurden jeweils 24 Stunden nach der letzten Injektion geerntet.

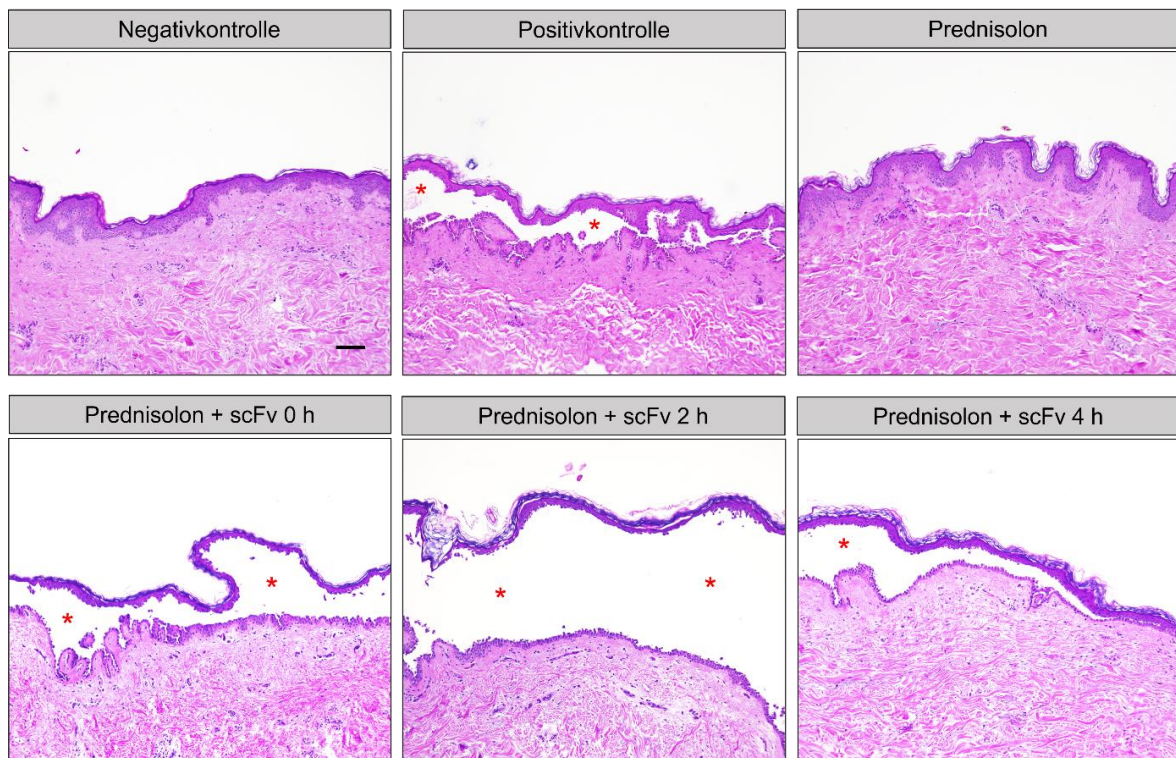


Abbildung 26: Beispielhafte Hämatoxylin-Eosin-Fotos der intraepidermalen Spaltbildung in mit Prednisolon und variablem Einzelkettenfragment behandelten Hautproben. In allen mit variablem Einzelkettenfragment (scFv) behandelten Hautproben fand eine ausgeprägte Spaltbildung (rote Sterne) statt. Eine zusätzliche Injektion von Prednisolon konnte diese nicht signifikant reduzieren. In der Negativkontrolle, sowie in der lediglich mit Prednisolon behandelten Probe, blieb die Epidermis unbeschädigt. Maßstabsbalken: 100 μ m.

In der statistischen Auswertung der quantitativen, histometrischen Ausmessung der intraepidermalen Spaltbildung (**Abb. 27**) wurde jedes VF einzeln gewertet. Zwischen NC und allen Proben mit Injektion des scFv zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied mit einem p-Wert von $p \leq 0,0001$. Im Vergleich von PC und mit Prednisolon und scFv behandelten Proben konnte lediglich bei den Proben [Prednisolon + scFv 0 h], sowie [Prednisolon + scFv 4 h] eine leichte Tendenz zur Reduktion der Spaltbildung gesehen werden, allerdings ohne messbare Signifikanz.

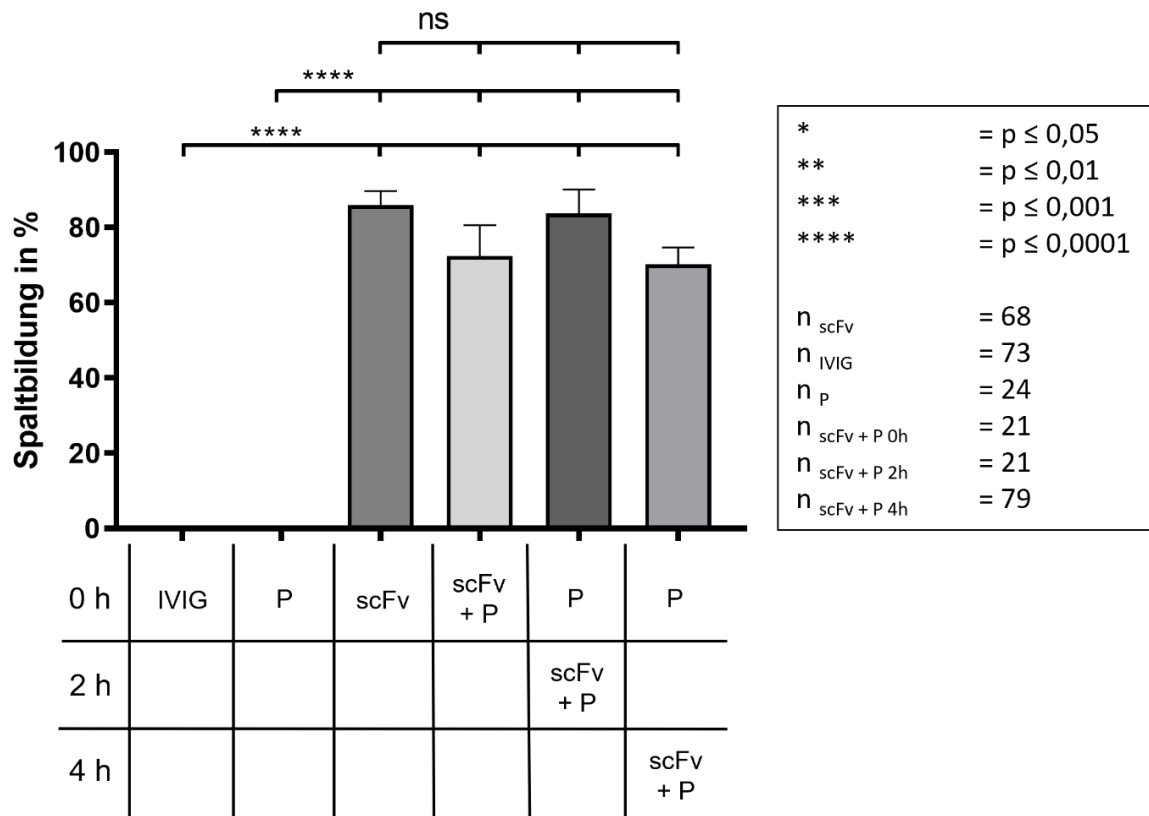


Abbildung 27: Keine signifikante Reduktion der Spaltbildung durch Injektion von Prednisolon. Graphische Darstellung der prozentualen Spaltbildung im Balkendiagramm mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM), sowie tabellarische Darstellung des Injektionsschemas der genommenen Proben. Für die statistische Auswertung wurde der Kruskal-Wallis-Test und der Dunns' Posthoc-Test durchgeführt. scFv = variables Einzelkettenfragment. IVIG = intravenöses Immunglobulin G. P = Prednisolon. n = Anzahl ausgewerteter *visual fields*. ns = Nicht signifikant.

6.5 Eine epidermale Auftragung von Clobetasol-haltiger Creme zeigt keine signifikante Reduktion der Spaltbildung im Hautorgan-Kulturmodell

Im Hautorgan-Kulturmodell konnte die Spaltbildung in denen mit scFv behandelten Proben durch die epidermale Auftragung von Clobetasol-haltiger Creme, ähnlich wie bei der intradermalen Injektion von Prednisolon, nicht signifikant reduziert werden. Es zeigte sich jedoch eine deutliche Tendenz zur Reduktion der Spaltbildung, jedoch ohne statistische Signifikanz. In **Abb. 28** sind beispielhafte HE-Fotos von allen durchgeführten Behandlungen zu sehen. Wurde auf die Haut lediglich Basiscreme aufgetragen, konnte keine Spaltbildung festgestellt werden. Wurde zusätzlich dazu das scFv injiziert, konnte kein Unterschied im Ausmaß der Spaltbildung im Vergleich zur PC festgestellt werden. Es wurde immer eine PC und eine NC mitgeführt. Die Hautproben wurden jeweils 24 Stunden nach der letzten Behandlung geerntet.

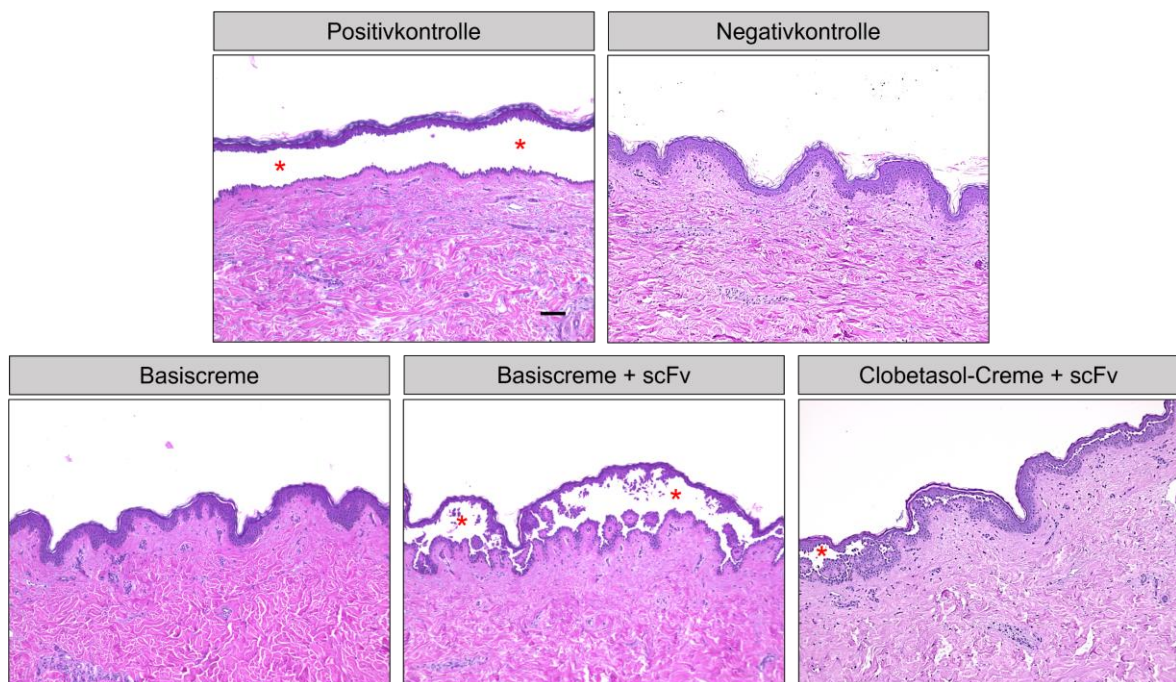


Abbildung 28: Beispielhafte Hämatoxylin-Eosin-Fotos der intraepidermalen Spaltbildung in mit Cremes und variablem Einzelkettenfragment behandelten Hautproben. In allen mit variablem Einzelkettenfragment (scFv) behandelten Hautproben fand eine Spaltbildung (rote Sterne) statt. Eine zusätzliche epidermale Auftragung von Clobetasol-haltiger Creme konnte die Spaltbildung nicht signifikant reduzieren. Eine zusätzliche Behandlung mit wirkstoffloser Basiscreme zur scFv-Injektion hatte keinen Effekt im Vergleich zur Positivkontrolle. In der Negativkontrolle, sowie in der lediglich mit Basiscreme behandelten Probe, blieb die Epidermis unbeschädigt. Maßstabsbalken: 100 μ m.

In der statistischen Auswertung der quantitativen, histometrischen Ausmessung der intraepidermalen Spaltbildung (**Abb. 29**) wurde jedes VF einzeln gewertet. Zwischen NC und allen Proben mit Injektion des scFv zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied mit einem p-Wert von $p \leq 0,0001$. In denen mit Clobetasol-haltiger Creme und scFv behandelten Proben konnte im Vergleich zur PC eine Reduktion der Spaltbildung gesehen werden, mit einem $p = 0,1082$ jedoch ohne Signifikanz.

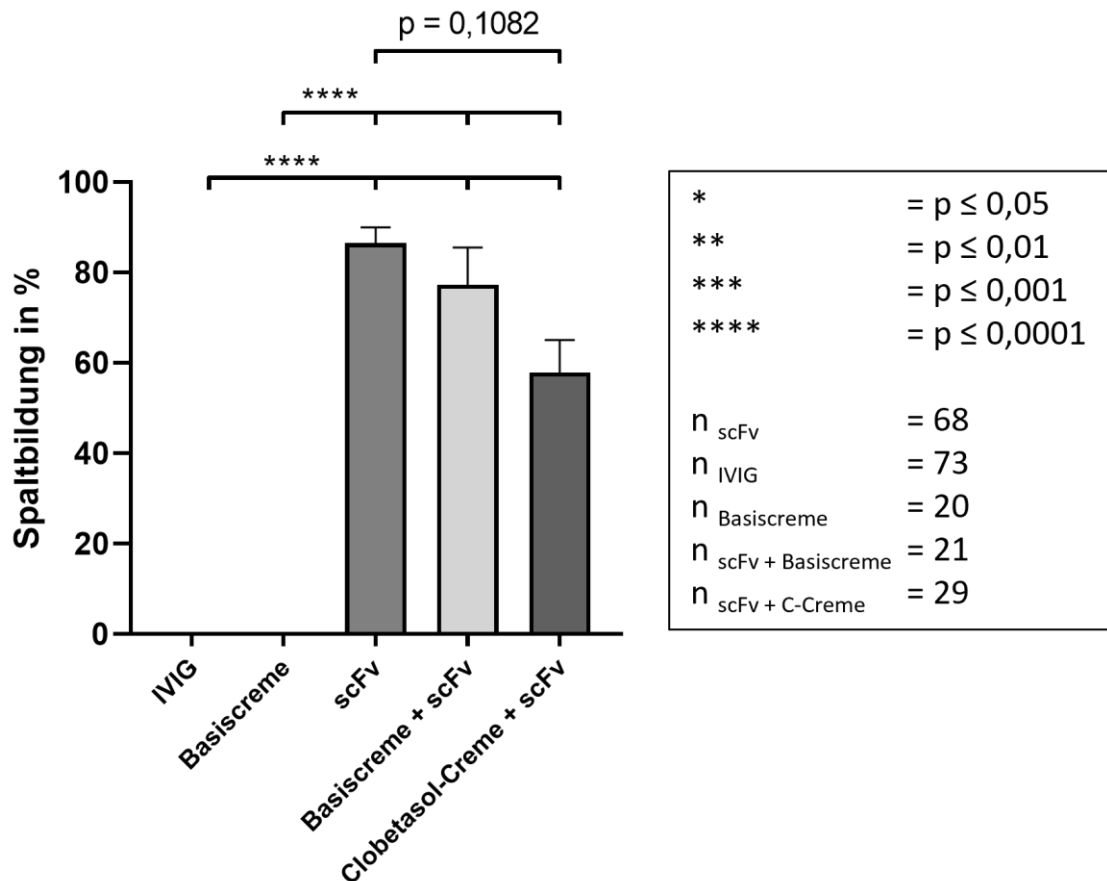
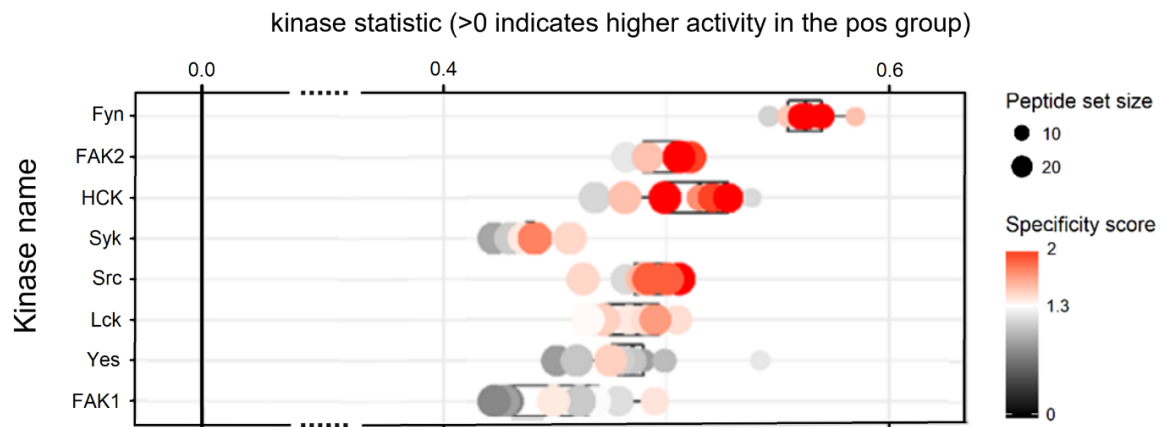


Abbildung 29: Keine signifikante Reduktion der Spaltbildung durch epidermale Auftragung von Clobetasol-haltiger Creme. Graphische Darstellung der prozentualen Spaltbildung im Balkendiagramm mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Für die statistische Auswertung wurde der Kruskal-Wallis-Test und der Dunns' Posthoc-Test durchgeführt. scFv = variables Einzelkettenfragment. IVIG = intravenöses Immunglobulin G. n = Anzahl ausgewerteter *visual fields*. C = Clobetasol.

6.6 PamGene-Analyse: Acht Kinasen in Positivkontrollen signifikant aktiver als in Negativkontrolle

Bei der Analyse der Hautproben in der PamStation konnten in der PC, im Vergleich zur NC, insgesamt acht Kinasen mit signifikant erhöhter Aktivität detektiert werden. Darunter befanden sich mit **Fyn**, **HCK**, **Src**, **Lck** und **Yes** fünf Vertreter der Src-Kinase-Familie, **FAK1** und **FAK2** aus der FAK-Familie, sowie **Syk**. Diese sind in **Abbildung 30** graphisch und tabellarisch dargestellt.



Kinase name	Kinase Uniprot ID	Mean specificity score	Mean significance score	Mean final score	Mean kinase statistic
Fyn	P06241	1,7893	0,5985	2,3878	0,5645
Fak2	Q14289	1,5107	0,6252	2,1359	0,4971
HCK	P08631	1,5612	0,5758	2,1371	0,5087
Syk	P43405	1,4398	0,5033	1,9432	0,4388
Src	P12931	1,6756	0,5256	2,2012	0,4894
Lck	P06239	1,4422	0,5362	1,9785	0,4863
Yes	P07947	1,0698	0,5470	1,6168	0,4848
FAK1	Q05397	1,0417	0,5270	1,5688	0,4554

Abbildung 30: Acht Kinasen waren in der Positivkontrolle signifikant aktiver als in der Negativkontrolle. Im oberen Teil der Grafik sind die acht signifikant aktivierten Kinasen dargestellt (y-Achse). Je größer der Zahlenwert der *Mean kinase statistic* (x-Achse), desto größer das Ausmaß der Aktivitätssteigerung. Die Größe der die Aktivitätsänderung markierenden Kreise, zeigt die Größe des jeweiligen Peptid-Satzes, welcher auf dem *PamChip microarray* immobilisiert war. Ihre Farbe (schwarz-rot) gibt den *Mean specificity score* an. In der unter der Grafik aufgeführten Tabelle sind die Rohwerte der scores aller acht Kinasen aufgelistet.

Als Ergebnis der Analyse wurden die Namen aller gemessenen Kinasen aufgelistet, sowie deren Identifizierungsnummer in der Proteindatenbank Uniprot. Die Aktivität jeder gemessenen Kinase konnte dabei unverändert, gesteigert, oder vermindert sein. Dies wurde in der *Mean kinase statistic* ausgedrückt. Ein positiver bzw. negativer Wert bedeutet, dass die Kinase in ihrer Aktivität hoch- bzw. runterreguliert war. Der Zahlenwert beschreibt das Ausmaß der Aktivitätsänderung.

Des Weiteren wurde für jede Kinase ein *Mean specificity score* und ein *Mean significance score* generiert, aus deren Summe sich der *Mean final score* addierte. Der *Mean specificity score* beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit der eine Kinase einer bestimmten Protein-Phosphorylierung falsch zugeordnet wurde, angegeben als der negativ dekadische Logarithmus. Das Signifikanz-Niveau wurde auf 1 festgelegt. Dementsprechend liegt bei einem *Mean specificity score* von 1 eine Wahrscheinlichkeit von 10 % vor, dass die Kinase einer bestimmten Protein-Phosphorylierung falsch zugeordnet wurde. Der *Mean significance score* hingegen beschreibt, ob sich die Kinase-Aktivität in den verglichenen Proben signifikant voneinander unterscheidet. Der Wert ist als der negative dekadische Logarithmus des p-Wertes angegeben. Das Signifikanz-Niveau wurde auf 0,5 festgelegt. Dementsprechend liegt bei einem *Mean significance score* von 0,5 ein $p = 0,316$ vor.

Hat eine Kinase sowohl im *Mean specificity score* als auch im *Mean significance score* jeweils den festgelegten Grenzwert erreicht, galt diese als signifikant verändert. Von besonderem Interesse waren dabei vor allem die aktivierten Kinasen, da diese potenzielle Ziele in der medikamentösen Therapie bei PV darstellen.

6.7 Auswahl der Kinase-Inhibitoren für den Keratinozyten-Dissoziations-Assay

Im Keratinozyten-Dissoziations-Assay sollte nun evaluiert werden, ob das Inhibieren der Kinasen, zusätzlich zur Behandlung mit dem scFv, zur Reduktion der Fragmentierung des Keratinozyten-Monolayers führt. Dabei wurde versucht, jede Kinase möglichst spezifisch und einzeln zu inhibieren. In der folgenden **Tabelle 14** sind die sieben ausgewählten Inhibitoren aufgelistet sowie die durch sie inhibierten Kinasen.

Tabelle 14: Auswahl der Kinase-Inhibitoren. Aus der Tabelle können die Namen der ausgewählten Kinase-Inhibitoren (linke Seite) sowie der von ihnen inhibierten Kinase(n) (rechte Seite) entnommen werden.

Name des Kinase-Inhibitors	Name der inhibierten Kinase(n)
KX2-391	Src
RK 24466	Lck
PP2	Lck / Fyn
SU 6656	Fyn / Lck / Yes
Saracatinib	Src Pan (ganze Src-Familie)
PF-573228	FAK1 / FAK2
PRT062607	Syk

6.8 Das variable Einzelkettenfragment löst eine Fragmentierung bei HaCaT-Zellen aus

Bevor die im Hautorgan-Kulturmodell aktivierten Kinasen im Keratinozyten-Dissoziations-Assay auf deren Mitwirken bei der Pathogenese von PV evaluiert werden konnten, musste zunächst eine scFv-Konzentration zur Durchführung der Experimente ermittelt werden. Bisher wurden diese mit IgG aus dem Blut von PV-Patienten durchgeführt, welche zuvor mittels Immunapherese isoliert wurden. Dafür wurden Konzentrationsreihen des Antikörpers angelegt und dessen Einfluss auf die Fragmentierung des Zell-Monolayers beurteilt. Parallel zum scFv, wurden isolierte PV-IgG getestet, um einen Aktivitätsvergleich von künstlich hergestellten scFv und isoliertem PV-IgG zu bekommen (**Abb. 31**). Dabei wurde bei den PV-IgG die 5-fache Konzentration des scFv verwendet, da diese ein um den gleichen Faktor höheres Molekulargewicht haben und somit gleiche Anzahl an Bindungen besteht.

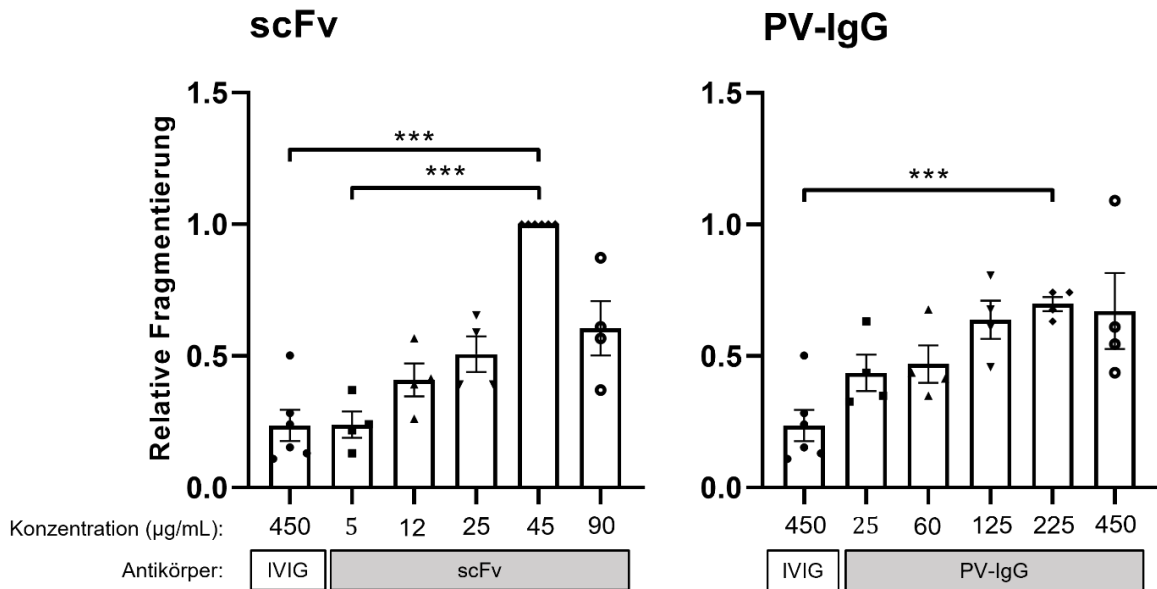
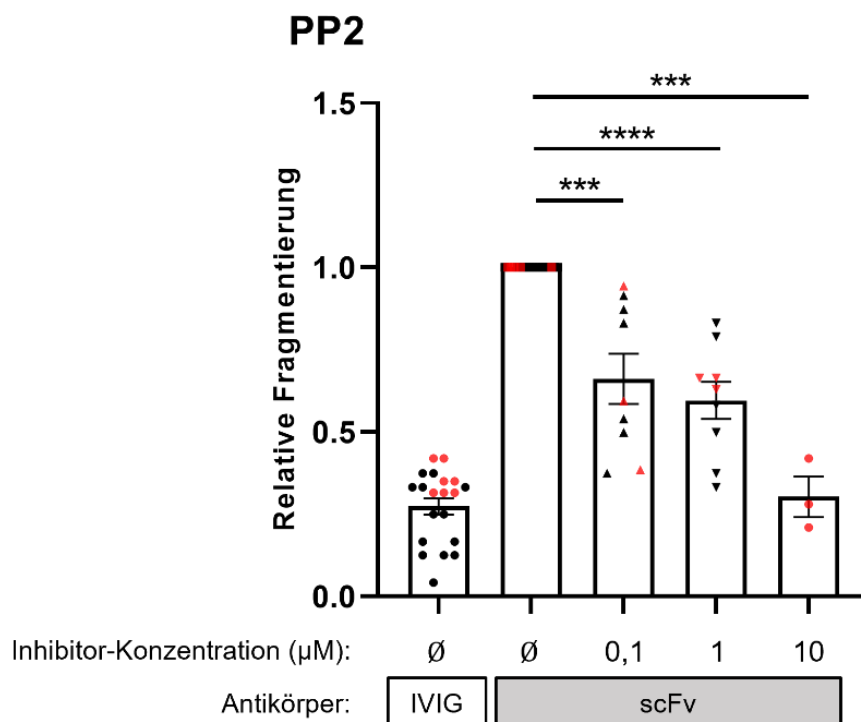


Abbildung 31: Antikörper-Konzentrationsreihe im Keratinozyten-Dissoziations-Assay. Vor Evaluierung der Kinase-Inhibitoren wurde zunächst eine Antikörper-Konzentration für das Assay bestimmt. Diese Vorversuche wurden sowohl mit variablem Einzelkettenfragment (scFv), also auch mit Pemphigus vulgaris-Immunglobulin G (PV-IgG) durchgeführt. Es zeigte sich beim scFv mit der Konzentration von 45 µg/mL, sowie bei PV-IgG mit äquivalenter Bindungsanzahl (225 µg/mL), eine signifikant höhere Fragmentierung des Zell-Monolayers im Vergleich zur Behandlung mit intravenösem Immunglobulin G (IVIG) als Negativkontrolle. µg = Mikrogramm. mL = Milliliter. *** = $p \leq 0,001$. n = 4 – 6.

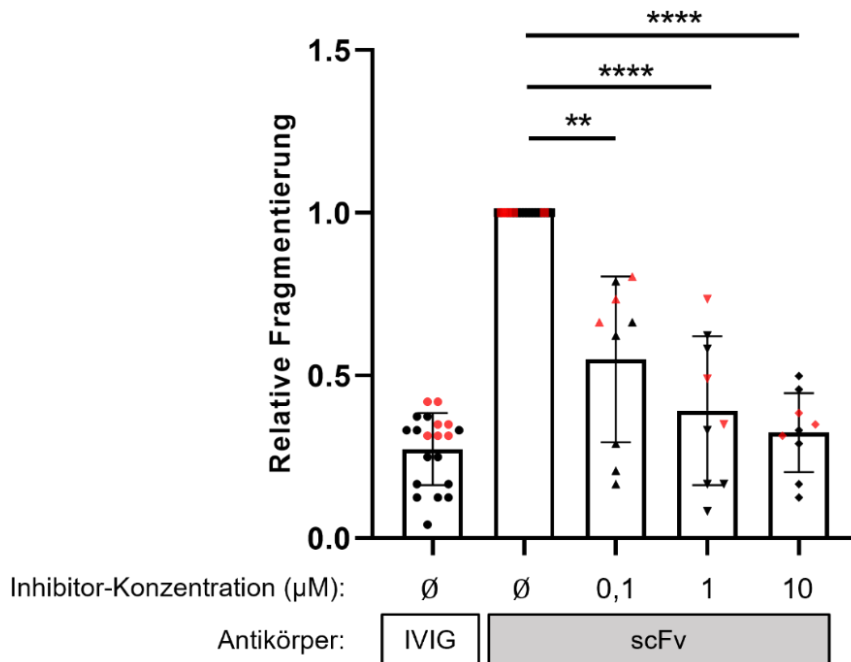
In diesen Vorversuchen zeigte sich eine ähnlich ausgeprägte Fragmentierung des Zell-Monolayers bei äquivalenter Anzahl der Bindungen des scFv und der PV-IgG, wodurch auf eine ähnliche Aktivität der Antikörper im Keratinozyten-Dissoziations-Assay geschlossen werden konnte. Sowohl beim scFv mit einer Konzentration von 45 µg/mL als auch beim PV-IgG mit äquivalenter Bindungsanzahl, konnte eine signifikant stärkere Fragmentierung im Vergleich zur mit IVIG behandelten NC gezeigt werden. Der scFv in der Konzentration von 45 µg/mL wurde im Folgenden zur Evaluierung der Kinase-Inhibitoren verwendet.

6.9 PP2, Saracatinib und SU 6656 hemmen signifikant die Fragmentierung in allen drei Konzentration mit steigender Effektstärke

Die drei Kinase-Inhibitoren PP2, Saracatinib und SU 6656 zeigten in allen Konzentrationen (0,1 μM / 1 μM / 10 μM) eine signifikante Reduktion der Fragmentierung im Keratinozyten-Dissoziations-Assay (**Abb. 32**). Dabei konnte mit aufsteigender Inhibitor-Konzentration eine stetige Reduktion der Keratinozyten-Dissoziation gesehen werden. Bei dem Inhibitor PP2 konnten bei der 10 μM Konzentration lediglich bei einem von drei Durchgängen Werte erhoben werden, da sich bei den anderen beiden ein toxischer Effekt auf das Keratinozyten-Monolayer gezeigt hat und die Experimente nicht auswertbar waren. Ein Durchgang der Experimente mit je drei Replikaten wurde von mir persönlich durchgeführt (rote Werte), zwei weitere Durchgänge mit insgesamt 6 Replikaten wurden von der Bachelor-Studentin Bejtije Naumann durchgeführt (schwarze Werte), die die Kinase-Inhibitoren im Anschluss an meine Arbeit intensiviert im Keratinozyten-Dissoziations-Assay getestet hat. Nach Durchführung des Ausreißer-Tests nach Grubbs entfiel ein Wert in der PC als auch in der NC.



Saracatinib



SU 6656

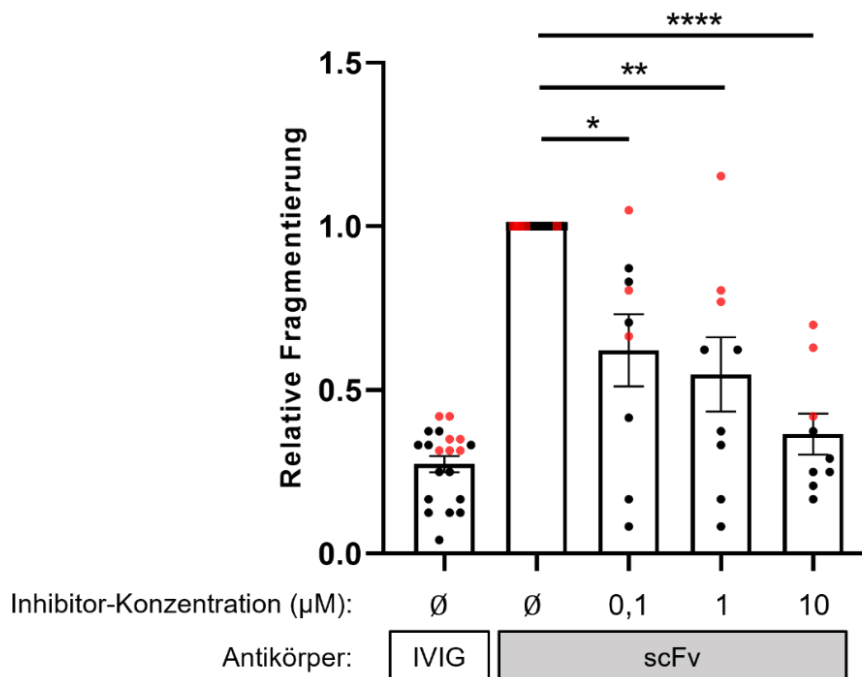
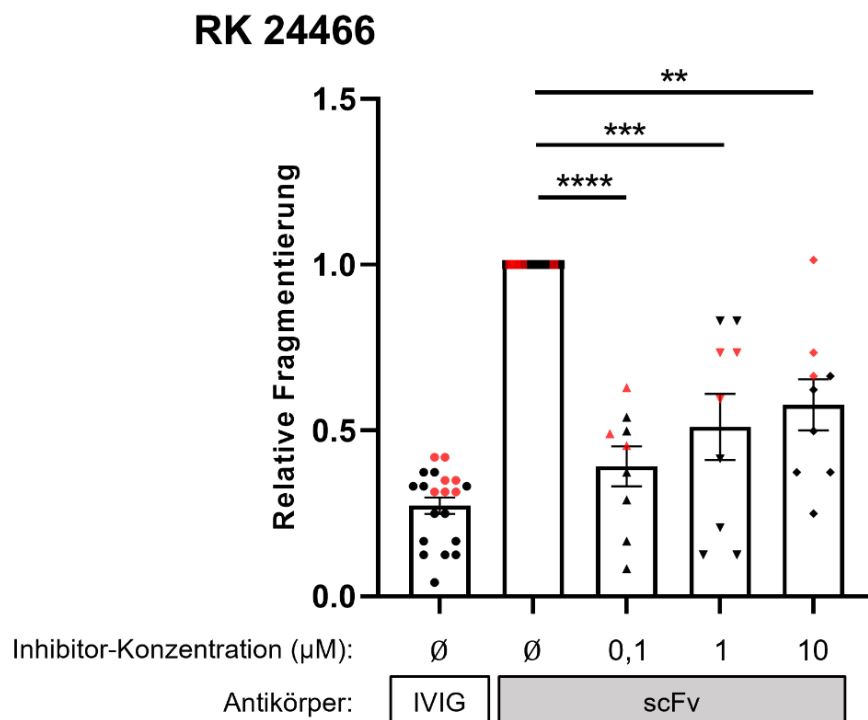


Abbildung 32: Die Kinase-Inhibitoren PP2, Saracatinib und SU 6656 hemmen die Fragmentierung des Zell-Monolayers im Keratinozyten-Dissoziations-Assay in allen Konzentrationen. Die Werte wurde eigens (rot) und von Bejtije Naumann (schwarz) erhoben. $n_{\text{IVIG}} = 20$. $n_{\text{scFv}} = 20$. $n_{\text{Inhibitor}} = 9$. Es wurde der Kruskal-Wallis-Test, Dunns' Posthoc-Test, sowie der Ausreißer-Test nach Grubbs durchgeführt. * = $p \leq 0,05$. ** = $p \leq 0,01$. *** = $p \leq 0,001$. **** = $p \leq 0,0001$. IVIG = Intravenöses Immunglobulin G. scFv = Variables Einzelkettenfragment.

6.10 RK 24466, KX2-391 und PF-573228 hemmen signifikant die Fragmentierung in allen drei Konzentrationen

Die Kinase-Inhibitoren RK 24466, KX2-391 und PF-573228 zeigten eine signifikante Reduktion der Fragmentierung des Zell-Monolayers in allen drei Konzentrationen (0,1 μM / 1 μM / 10 μM) (**Abb. 33**). Bei RK 24466 fragmentierte interessanterweise der Zell-Monolayer verstärkt mit steigender Inhibitor-Konzentration. Bei KX2-391 konnte bis zu einer Konzentration von 1 μM eine kontinuierliche Reduktion der Dissoziation gesehen werden, bevor die Fragmentierung bei 10 μM wieder anstieg. Bei der 0,1 μM Konzentration konnten drei Werte eines Durchgangs aus technischen Gründen nicht verwertet werden. Nach Durchführung des Ausreißer-Tests nach Grubbs entfiel ein Wert in der 1 μM Konzentration. Bei PF-573228 blieb die Fragmentierung des Monolayer über die drei Konzentrationen auf ähnlichem Niveau. Bei der 10 μM Konzentration gibt es lediglich 6 Replikate, da der Inhibitor zu Beginn der Experimente nicht in ausreichender Menge verfügbar war.



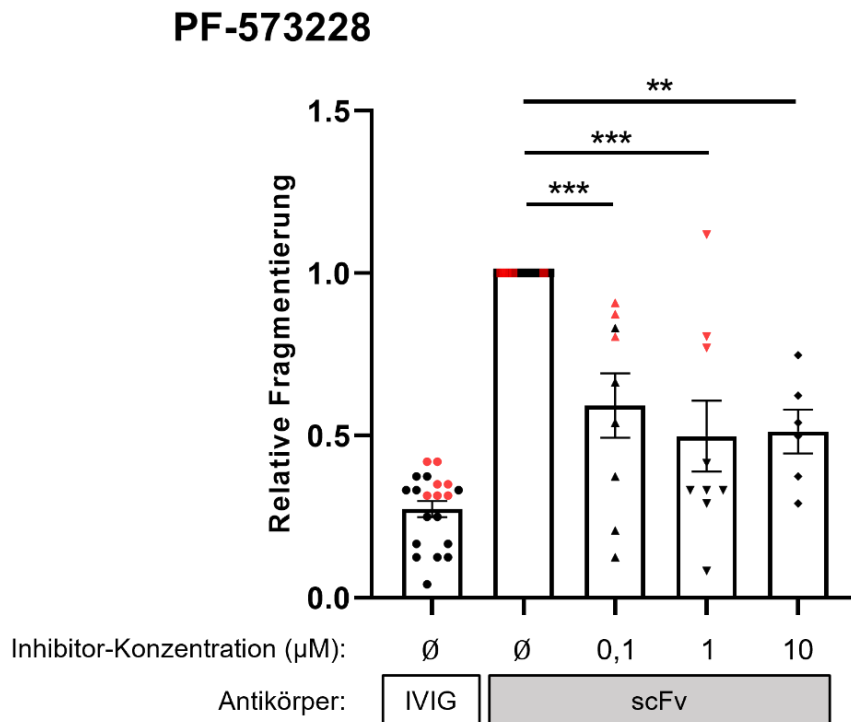
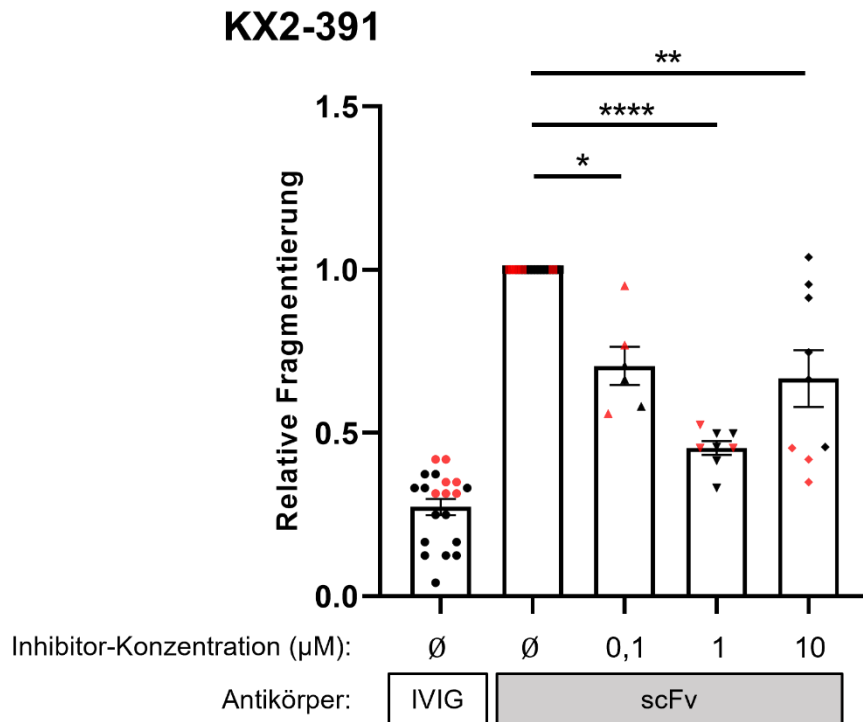


Abbildung 33: Die Kinase-Inhibitoren RK 24466, KX2-391 und PF-573228 hemmen die Fragmentierung des Zell-Monolayers im Keratinozyten-Dissoziations-Assay in allen Konzentrationen. Die Werte wurde eigens (rot) und von Bejtije Naumann (schwarz) erhoben. $n_{\text{IVIG}} = 20$. $n_{\text{scFv}} = 20$. $n_{\text{Inhibitor}} = 9$. Es wurde der Kruskal-Wallis-Test, Dunns' Posthoc-Test, sowie der Ausreißer-Test nach Grubbs durchgeführt. * = $p \leq 0,05$. ** = $p \leq 0,01$. *** = $p \leq 0,001$. **** = $p \leq 0,0001$. IVIG = Intravenöses Immunglobulin G. scFv = Variables Einzelkettenfragment.

6.11 PRT062607 zeigt eine signifikante Reduktion der Keratinozyten-Dissoziation in der höchsten, nicht aber in den beiden niedrigeren Konzentrationen.

Der Kinase-Inhibitor PRT062607 zeigte in der höchsten Konzentration (10 μM) eine signifikante Reduktion der Fragmentierung des Zell-Monolayers im Keratinozyten-Dissoziations-Assay. Die beiden niedrigeren Konzentrationen (0,1 μM / 1 μM) zeigten keine signifikante Reduktion der Keratinozyten-Dissoziation.

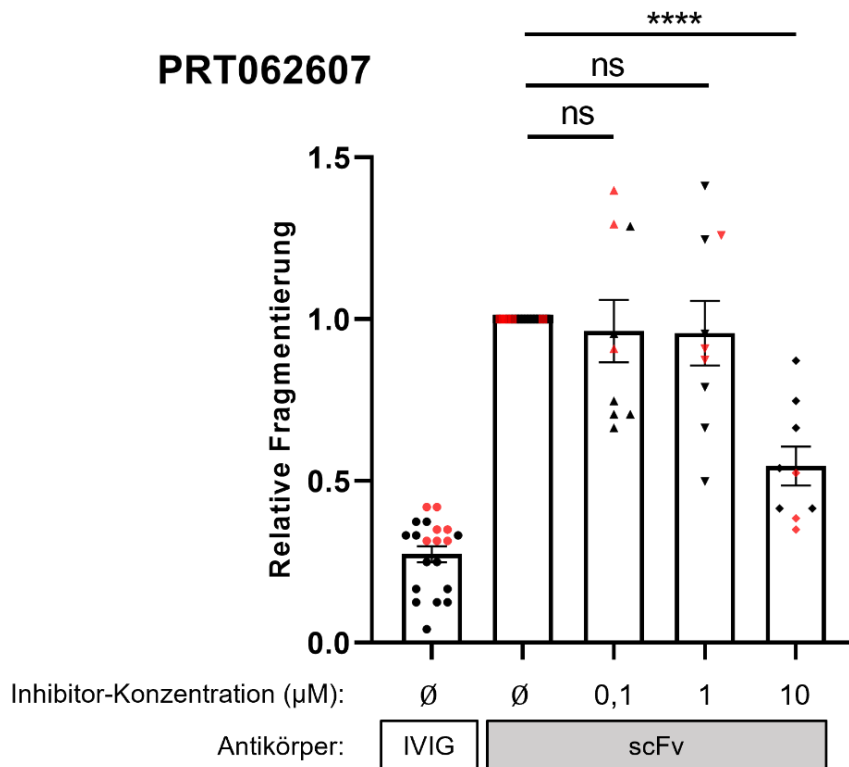


Abbildung 34: PRT062607 zeigt in der höchsten Konzentration eine signifikante Reduktion der Fragmentierung des Zell-Monolayers im Keratinozyten-Dissoziations-Assay, nicht jedoch in den beiden niedrigeren. Die Werte wurde eigens (rot) und von Bejtije Naumann (schwarz) erhoben. $n_{\text{IVIG}} = 20$. $n_{\text{scFv}} = 20$. $n_{\text{Inhibitor}} = 9$. Es wurde der Kruskal-Wallis-Test, Dunns' Posthoc-Test, sowie der Ausreißer-Test nach Grubbs durchgeführt. **** = $p \leq 0,0001$. ns = Nicht signifikant. IVIG = Intravenöses Immunglobulin G. scFv = Variables Einzelkettenfragment.

7 Diskussion

7.1 Kritische Bewertung des Hautorgan-Kulturmodells

In dieser Arbeit wurde unter anderem das Hautorgan-Kulturmodell verwendet, eine in unserem Labor bereits etablierte Methodik. Dieses *ex vivo* Modell eignet sich sehr gut, die Wirkung pharmakologischer Substanzen auf humane Haut zu evaluieren. Dabei wird die Haut unter Erhalt aller drei Schichten (Epidermis, Dermis, Subkutis) verwendet. Die Architektur der Haut bleibt erhalten. Somit sind alle natürlich vorkommenden Zellen in der Haut in ihrer physiologischen Nische vertreten, sowie alle Zell-Kontakte wie z.B. Desmosomen erhalten. Dies stellt einen entscheidenden Vorteil gegenüber klassischen Zellkultur-Experimenten dar, bei welchen die untersuchten Zellen als isolierter Zelltyp in einem einschichtigen Monolayer wachsen. Auch ist das Hautorgan-Kulturmodell weniger anfällig gegenüber Infektionen, da die Haut lediglich für 24 h inkubiert und anschließend geerntet wird. Mit dieser Methode kann eine Blasenbildung der Haut leicht mittels DIF und HE-Färbung beurteilt werden (Lotti et al., 2022).

Die Tatsache, dass die Haut aus elektiven Operationen stammt, hat sowohl Vor- als auch Nachteile. Generell ist sie nur durch das Zusammenarbeiten mit einer entsprechenden klinischen Abteilung zu bekommen. Das Verwenden der humanen Haut ist aus ethischer Sicht unbedenklich, da die verwendete Haut ansonsten anderweitig entsorgt werden würde und jeder Patient vor der Operation seine schriftliche Zustimmung zur weiteren Verwendung der Haut zu Forschungszwecken gibt. Ein Nachteil ist die eingeschränkte Planbarkeit der Experimente, da in recht unregelmäßigen Abständen Hautlieferungen eintreffen, abhängig von der Häufigkeit entsprechender Operationen. Dies ist gerade in den Sommermonaten problematisch, da die Operationen eher in der kühleren Jahreszeit stattfinden. Auch stammt die verwendete Haut von einem recht heterogenen Patientenkontext. So bestehen zwischen den verschiedenen Patienten teilweise große Altersunterschiede, was wiederum einen Einfluss auf die Dicke und Konsistenz der Haut hat. Das könnte Auswirkungen auf die Ergebnisse der Experimente haben und einen direkten Vergleich zweier Patienten erschweren. Allerdings werden durch diese Tatsache auch weiter gefächerte Daten generiert und alle Altersschichten mit in die Analyse einbezogen, was durchaus sinnvoll ist, da PV eine Erkrankung ist, die sich über alle Altersschichten erstreckt (Joly and Litrowski, 2011; Porro et al., 2019).

Bei den Experimenten wurde ein bi-spezifischer Anti-Dsg1/3 scFv mit einer Spritze direkt in die Dermis injiziert. Dies spiegelt die physiologischen Verteilungsverhältnisse beim PV-Patienten sehr gut wider, da die PV-IgG über die Blutversorgung der Dermis in die Haut gelangen und sich von dort über Diffusion in die Epidermis ausbreiten, wo sie an Dsg1 und Dsg3 binden. Die Verwendung eines scFv anstelle von PV-IgG bietet einige Vorteile. So lässt es sich über ein Antikörper-Phagen-

Display sehr kostengünstig herstellen. Für die Verwendung von PV-IgG müssen diese aus dem Blut eines Patienten mit akutem aktiven mukokutanem PV mit Anti-Dsg1 und 3 Antikörpern isoliert werden. Das ist teuer und zeitaufwendig. Außerdem ist die Patientenverfügbarkeit nicht planbar. Bei der Herstellung des scFv liegt immer eine genau definierte Konzentration und Spezifität des Antikörpers vor, was bei isolierten PV-IgG nicht der Fall ist. Bei PV-IgG müssen diese zusätzlich bestimmt werden. Durch die Verwendung des scFv kann der Versuchsaufbau standardisiert werden und die Ergebnisse sind reproduzierbarer. Auch beträgt die Masse eines scFv-Moleküls mit etwa 30 kDa im Vergleich zu einem IgG-Molekül mit etwa 150 kDa nur etwa ein Fünftel, wodurch es sich deutlich schneller und gleichmäßiger im Gewebe verteilt (Huston et al., 1991; Ahmad et al., 2012). Zudem liegen bei mukösem PV hauptsächlich Anti-Dsg3-IgG vor, sodass zur Untersuchung von mukokutanem PV häufig Dsg1-spaltendes *Exfoliative Toxin A* (ETA) empfohlen und verwendet wird (Amagai et al., 2000; Iwata et al., 2015). Dies stellt jedoch einen unphysiologischen Faktor dar, der die Ergebnisse beeinflussen könnte, welchen man sich durch den Einsatz des scFv ersparen kann.

Die Verwendung des scFv im Hautorgan-Kulturmodell anstelle von isolierten PV-IgG bzw. PV-Patienten-Serum bringt allerdings auch Limitationen mit sich. So werden lediglich durch Bindung des Anti-Dsg1/3 scFv vermittelte Effekte in dem Modell abgebildet, allerdings eine mögliche Interaktion mit anderen sich im Patienten-Serum befindenden IgG nicht mit beachtet. Studien haben zahlreiche extradesmosomale Autoantikörper bei Patienten mit PV identifiziert, welche eine bestätigte Rolle bei der Pathophysiologie von PV spielen. Deren Antigene sind unter anderen Dsc (Mao et al., 2010; Amber et al., 2018). So wird beispielweise ein zusätzliches Vorliegen von Anti-Dsc-IgG nicht mit untersucht.

Der scFv besteht lediglich aus den beiden Antigen-bindenden V-Domänen der H- und L-Kette eines Ig und besitzt somit kein Fc-Fragment, welcher für die Aktivierung von Effektorzellen wie z.B. neutrophile Granulozyten benötigt wird. Das wiederum führt zur Aktivierung des Komplementsystems (Schroeder and Cavacini, 2010). Ein möglicher Fc-Fragment vermittelter, weiterführender Effekt kann also mit dem verwendeten scFv nicht abgebildet werden. Allerdings ist in der Literatur schon lange bekannt, dass es auch nach Inaktivierung des Komplementsystems weiterhin zur Akantholyse durch PV-IgG kommt (Michel and Ko, 1977). Auch gehören PV-IgG überwiegend der IgG4-Unterklasse an, welche ohnehin nicht das Komplementsystem aktivieren und deren Fc-Fragment nur unzureichend Effektorzellen aktiviert. Somit scheint der akantholytische Effekt des scFv auf der Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden und dem Prinzip der sterischen Hinderung zu beruhen (vgl. Kap. 2.3.1). Dabei bestünde allerdings die Möglichkeit, dass der scFv aufgrund seiner deutlich geringeren Masse im Vergleich zum IgG (30 vs. 150 kDa) die Akantholyse nicht im gleichen Umfang auslöst wie PV-IgG.

7.2 Der Effekt von Glucocorticoiden auf die Akantholyse im Hautorgan-Kulturmodell

In den Experimenten im Hautorgan-Kulturmodell konnte die durch das scFv ausgelöste Akantholyse durch zusätzliche Behandlung mit GC nicht signifikant reduziert werden, wobei eine Tendenz zur Reduktion gesehen werden konnte. Das gilt sowohl für die systemische Injektion von Prednisolon als auch für die topische Applikation von Clobetasol-haltiger Creme (vgl. Kap. 5.4 und 5.5). Dabei wurden die Hautproben entweder zeitgleich mit scFv und Prednisolon bzw. Clobetasol behandelt oder mit Prednisolon 2 h, bzw. 4 h präinkubiert, bevor das scFv hinzugefügt wurde (vgl. Tab. 8 und 9). Dabei entsprach die Konzentration des injizierten Prednisolon in etwa der einer Cortison-Pulstherapie im PV-Patienten.

Die Wirkung von Corticosteroiden auf die Akantholyse im Hautorgan-Kulturmodell für PV wurde schon vorher von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. So haben erste Experimente von Schiltz *et al.* 1979 gezeigt, dass es durch die gleichzeitige Inkubation von Hydrocortison mit PV-IgG zu keiner Verringerung der Akantholyse im Hautorgan-Kulturmodell kommt. Dieser Versuchsansatz wurde von Swanson and Dahl 1983 erweitert. Sie ließen die Hautproben in Methylprednisolon-haltigem Medium (0,25 mM) für 0 h, 1 h, 4 h oder 24 h präinkubieren, bevor sie die Haut Pemphigus-Plasma aussetzten. Die Auswertung erfolgte über DIF- und HE-Färbungen der Proben. Interessanterweise konnten sie durch eine 24-stündige Inkubation der Haut in Methylprednisolon die Akantholyse komplett hemmen, während keine, 1- und 4-stündige Präinkubation wenig bis keinen Effekt auf die Akantholyse zeigten. Jedoch konnte bei keiner der Proben eine reduzierte Bindung der Antikörper in der Epidermis festgestellt werden. Diese Erkenntnisse decken sich komplett mit den eigenen Ergebnissen. So konnte möglicherweise durch eine unzureichende Präinkubation von Prednisolon von max. 4 h nur eine unzureichende Reduktion der Akantholyse erreicht werden, da das Prednisolon möglicherweise mehr Zeit braucht in die Zellen zu diffundieren und metabolisch wirksam zu werden. Auch konnte durch die Behandlung keine Änderung im Bindeverhalten des scFv in der Epidermis festgestellt werden.

Jeffes *et al.* konnte 1984 einen konzentrationsabhängigen Effekt von Hydrocortison auf die Akantholyse bei gleichzeitiger Inkubation mit Pemphigus-Plasma feststellen. So konnte ab einer Konzentration von 0,5 mM die Akantholyse bei gleichzeitiger Inkubation gehemmt werden, nicht jedoch bei 0,25 mM, welche Konzentration für die eigenen Experimente verwendet wurde. So bräuhete es nach Jeffes *et al.* eine Dosis von 120-500 mg von Cortison täglich, um die akute Krankheitsaktivität zu unterdrücken.

Ähnliche Ergebnisse hat eine andere Studie gezeigt, welche die Akantholyse in Hautexplantaten von PV-Patienten durch die Behandlung mit Betamethason aufhalten konnten (Ikeda and Ogawa, 1991).

Im Widerspruch dazu stand eine Studie, welche die Wirkung von Dexamethason auf die durch PV-IgG ausgelöste Akantholyse bei neonatalen Mäusen untersucht hat (Anhalt et al., 1986). Der klinische Phänotyp wurde durch Dexamethason nicht beeinflusst, obwohl die verwendete Dosis weit über der beim Menschen verwendeten lag. Ursache könnten Schwächen des neonatalen Mausmodells sein (vgl. Kap. 6.3), da Nguyen *et al.* 2004 zeigen konnte, dass es durch die Behandlung mit Methylprednisolon zu einer reduzierten Akantholyse in 3-5 Tage alten, nicht aber in neonatalen 1 Tag alten Mäusen kam. So scheint der Effekt von PV-IgG bei neonatalen Mäusen aufgrund der unzureichend entwickelten Haut und Immunsystems stärker zu sein oder sie sind unempfindlich gegenüber der anti-akantholytischen Wirkung des Methylprednisolons aufgrund von möglicherweise noch unzureichend entwickelten Hautbestandteilen wie z.B. Proteinen.

Eine Limitation des Modells, warum bei den Experimenten eine unzureichende Wirkung des Prednisolons auf die Akantholyse festgestellt werden konnte, könnte die Tatsache des fehlenden Blutflusses verbunden mit kurzer Experiment-Dauer sein. Im lebenden Organismus nimmt Cortison Einfluss auf die Anzahl zirkulierender Lymphozyten und führt so zu einer Verringerung des Antikörper-Titers im Blut, was wiederum die klinische Symptomatik bessert (Puckett et al., 2022). Allerdings liegen in diesem Modell keine Lymphozyten vor und die kurze Dauer des Experiments wäre ohnehin nicht ausreichend, um entsprechende Effekte zu erzielen. Auch wird die Haut bereits präformierten Antikörpern ausgesetzt, was diesen Mechanismus ohnehin umgehen würde. Allerdings deutet vor dem Hintergrund, dass die Akantholyse durch eine Cortison-Pulstherapie nach 24-48 h gestoppt werden kann darauf hin, dass der Effekt der Lymphozyten-Suppression nicht alleinig für eine Reduktion der Akantholyse verantwortlich sein kann, da innerhalb dieser Zeitspanne keine Änderungen des Antikörpertiters zu erwarten sind (Nguyen et al., 2004).

Möglicherweise hat Cortison auch einen anderen Effekt auf scFv als auf vollständige Antikörper. So könnte Cortison beispielsweise durch eine Interaktion mit dem Fc-Fragment eines IgG Einfluss auf dessen Aktivität nehmen, welcher beim scFv fehlt. Allerdings konnten keine Studien gefunden werden, welche eine solche Interaktion beschreiben. Mögliche Mechanismen könnten eine durch Cortison verringerte Bindung von PV-IgG in der Epidermis als auch eine Belagerung des Fc-Fragments sein. Allerdings konnte wie bereits beschrieben keine reduzierte Bindung von PV-IgG in mit Cortison-behandelter Haut festgestellt werden und auch das Fc-Fragment ist nicht notwendig für das Auslösen der Akantholyse.

Zusammengefasst fügen sich die eigenen Ergebnisse gut in die bereits bestehende Forschung ein. Der ausgebliebene erwartete Effekt der Reduktion der Akantholyse durch Prednisolon ist möglicherweise auf eine zu kurz gewählte Inkubationszeit des Prednisolons vor Hinzufügen des scFv zurückzuführen, was bereits bestehende Studien gezeigt haben. Vor diesem Hintergrund würden sich weitere Experimente mit einer Verlängerung der Inkubationszeit von Prednisolon auf 24 h anbieten, um dieser Frage nachzugehen. Auch möglich wäre eine Erhöhung der Prednisolon-Konzentration bei gleichzeitigem Beibehalten der bisher gewählten Präinkubationszeiten.

7.3 Mögliche Fehlerquellen bei der Durchführung des Hautorgan-Kulturmodells

Bei der Durchführung des Hautorgan-Kulturmodells kann es an verschiedenen Stellen der Methodik zu Fehlern kommen, welche das Ergebnis beeinflussen können. Die Haut muss spätestens 24 h nach der Operation in den Experimenten verwendet werden. Bei der Verarbeitung der Haut kann es passieren, dass die Injektion der Substanzen in die Haut nicht ganz mittig oder zu tief erfolgt, was im Falle von dünner Haut zu einem Herauslaufen der Lösung führen kann. In diesem Falle kann es schwierig sein, beim Schneiden der Proben im Mikrotom die Blasenbildung im vollen Umfang darzustellen. Beim Schneiden gibt es keine standardisierte Schnitttiefe und so muss generell darauf geachtet werden, die Schnitte zum Zeitpunkt der maximalen Blasengröße aufzufangen, damit der volle Umfang der Akantholyse abgebildet wird. Besteht der Verdacht, dass die Blase noch größer werden könnte, sollten Schnitte aufgefangen werden, bevor tiefer geschnitten wird. Beim Teilen der Proben vor der Einbettung in Paraffin bzw. Cryomatrix muss vorsichtig agiert werden, da dabei Scherkräfte auf die Epidermis ausgeübt werden, was das Ausmaß der Ablösung der Epidermis künstlich vergrößern kann. Um solche Schneideartefakte auszuklammern, wird bei der Ausmessung der Blasenbildungen in den Schnitten 200 µm von den Rändern abgezogen. Beim Einbetten der Proben muss darauf geachtet werden die Probe mit der richtigen Orientierung einzubetten, damit man die Blase auch gut findet. In diesem Punkt kommt es regelmäßig zu Fehlern, da die Markierung der Probe beim Einbetten nicht immer gut zu erkennen ist. Beim Ansetzen der Lösungen vor der Injektion in die Haut muss ordentlich pipettiert werden, da nur sehr kleine Mengen von 50 µL injiziert werden. Werden mehrere Hautproben gleichzeitig beimpft, kann auch schnell eine Injektion übergangen werden. So konnte ich in einer PC keine Blasen auffinden, bevor sich in der DIF herausstellte, dass gar kein scFv injiziert wurde.

7.4 Das *in vivo* Mausmodell für die Untersuchung von *Pemphigus vulgaris* im Vergleich

Neben der Zellkultur als *in vitro*-Modell und dem menschlichen Hautorgan-Kulturmodell als *ex vivo* Ansatz werden in der *Pemphigus*-Forschung auch häufig *in vivo* Mausmodelle verwendet. Diese bieten die Möglichkeit, das Fortschreiten der Erkrankung zu beobachten und die Wirkung möglicher Medikamente im lebenden Organismus zu erforschen (Lotti et al., 2022).

Dabei wird zwischen passiven und aktiven Mausmodellen unterschieden. Beim passiven Modell werden zuvor generierte Autoantikörper in Mäuse übertragen, um *in vivo* eine Blasenbildung auszulösen. Beim aktiven Modell wird eine Autoimmunreaktion durch das Immunisieren von Wildtyp- oder genetisch veränderten Mäusen auf das Autoantigen induziert, wodurch die Mäuse selbst Autoantikörper produzieren (Pollmann and Eming, 2017).

Passive Mausmodelle werden verwendet, um den Pathomechanismus und Zell-Signalgebung in PV zu erforschen. Mit diesem Ansatz konnte gezeigt werden, dass neonatale Mäuse, welchen PV-IgG injiziert wurden, Blasen bilden (Anhalt et al., 1982). Die gleiche Arbeitsgruppe fand auch heraus, dass ein ähnlicher Phänotyp durch die Injektion von bivalenten Fab-Fragmenten ausgelöst wird, was bestätigt, dass auch im *in vivo* Modell der Fc-vermittelte Mechanismus bei der PV-Pathogenese zu vernachlässigen ist (Anhalt et al., 1986). Interessanterweise konnte dieser Phänotyp durch monovalente Fab-Fragmente nicht ausgelöst werden, was im Widerspruch zu meinen eigenen und anderen Forschungsergebnissen steht (vgl. Kap. 2.3.1 Antikörper als sterisches Hindernis). Mahoney *et al.* haben mit dem passiven Transfer von PV-IgG in neonatale Dsg3 Knockout ($^{-/-}$) Mäuse gezeigt, dass es bei gleichzeitiger Expression von Dsg1 und Dsg3 nicht ausreicht, wenn lediglich Antikörper gegen eine der beiden Isoformen vorliegen, um eine Blasenbildung auszulösen (vgl. Kap. 2.3.1 Desmoglein Kompensationstheorie). Allerdings ist die Entwicklung der Haut und des Immunsystems bei neonatalen Mäusen noch nicht abgeschlossen, wodurch es fraglich ist, ob dieses Modell vergleichbar mit der humanen, adulten Haut ist, bei der die Erkrankung vorkommt. Auch können bei adulten Mäusen durch Verwendung von humanen Anti-Dsg3-Antikörpern keine Blasen induziert werden (Culton et al., 2015), was wahrscheinlich auf die Aminosäuresequenz-Homologie zwischen Maus- und Human-Dsg3 zurückzuführen ist, die lediglich 85,6 % beträgt (Ishikawa et al., 2000). Aus diesem Grund wurden humanisierte Dsg3-transgene Mäuse gezüchtet, indem humanes Dsg3 in Dsg3 $^{-/-}$ Mäuse überführt wurde. Dadurch kommt es zur Bindung von PV-IgG an Schleimhäuten von humanisierten Dsg3-Mäusen, jedoch nicht an Schleimhautgewebe von Wildtyp-Mäusen (Culton et al., 2015).

Ein anderer Ansatz ist es, den monospezifischen Anti-Dsg3-Antikörper AK23 in adulte, 8 Wochen alte C57Bl/6J-Mäuse zu injizieren (Tsunoda et al., 2003). Dadurch kommt es zu Läsionen der

Mundschleimhaut, was es für die Untersuchung Anti-Dsg3-Antikörper-vermittelter Signalübertragung in erwachsener Haut geeignet macht. Allerdings zeigte eine zusätzliche Behandlung mit Anti-Dsg1-IgG von PF-Patienten lediglich in neonatalen, nicht in adulten Mäusen, kutane Läsionen (Schulze et al., 2012). In einem weiteren passiven Modell wurde Mäusen mit schwerer kombinierter Immunschwäche gesunde menschliche Vollhaut als Xenograft transplantiert (Zillikens et al., 2001). Dadurch sollten die Bedingungen noch mehr denen im Menschen angepasst werden. Allerdings wurde der Versuchsansatz aufgrund seiner Komplexität und der Tatsache, dass er wenig zu den klassischen passiven Modellen hinzufügt, nicht weiterverfolgt.

Da es nicht möglich ist, passive Transfermodelle über einen längeren Zeitraum aufrechtzuerhalten, was Beurteilung der Langzeiteffekte von Autoantikörpern auf die Krankheitsentwicklung oder medikamentöse Therapie unmöglich macht (Bieber et al., 2010), wurden aktive Mausmodelle entwickelt, bei denen die Mäuse selbst Antikörper produzieren. Bei einem davon werden zunächst Dsg3^{-/-} Mäuse durch Injektion von rekombinantem murinem Dsg3 immunisiert. Anschließend werden Lymphozyten aus deren Milz intravenös oder intraperitoneal in immundefiziente Rag2^{-/-} Mäuse übertragen, welche Dsg3 exprimieren. Die Rag2^{-/-} Empfänger-Mäuse produzieren daraufhin stabile Anti-Dsg3-Antikörper, welche an Dsg3 binden und so zur ausgeprägten Entwicklung eines klinischen Phänotyps führen (Amagai et al., 2000). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass ein Priming der Lymphozyten in Dsg3^{-/-} Mäusen vor Übertragung in die Rag2^{-/-} Maus nicht notwendig ist, um einen klinischen Phänotyp zu entwickeln. Allerdings zeigten diese Mäuse eine geringere Anti-Dsg3-IgG Konzentration im Serum mit geringerer Pathogenität als die Rag2^{-/-} Mäuse welche aktiv immunisierte Lymphozyten zugeführt bekamen (Aoki-Ota et al., 2004).

Beim humanisierten HLA-transgenen Modell werden Maus-MHC-II Knockout Mäusen PV-assoziierte humane HLA-Klasse-II-Allele, sowie humanes CD4 eingesetzt, woraufhin sie mit humanem Dsg3 immunisiert wurden. Sie bildeten daraufhin Anti-Dsg3-IgG, welche interessanterweise zu Blasen in den Mäusen führten, was wiederum auf eine Kreuzreaktivität von humanen Anti-Dsg3-IgG mit murinem Dsg3 hindeutet (Eming et al., 2014).

Generell sind aktive Mausmodelle geeignet, alle Aspekte der Blasenbildung und therapeutischen Interventionen zu untersuchen. Dabei handelt es sich jedoch um murine Systeme, sodass möglicherweise nicht alle Aspekte auf die menschliche Erkrankung übertragen werden können. Darüber hinaus sind die Auswirkungen der Adjuvantien, welche für die Immunisierung verwendet werden, noch weitestgehend unbekannt (Bieber et al., 2010).

7.5 Kritische Bewertung des Messvorgangs der Kinase-Aktivität im Hautorgan-Kulturmodell mittels der PamGene-Technologie

Mit der PamGene-Technologie wurden die Aktivität der in den Hautproben enthaltenen Kinasen untersucht. Dafür wurde die Haut zunächst mechanisch zerkleinert, bevor daraus mittels eines Lyse-Puffers die Proteine inklusive Kinasen extrahiert wurden. Um eine zuverlässige Messung in der PamStation durchführen zu können, musste eine Mindestkonzentration an Protein in dem Lysat enthalten sein. Bei den Vorversuchen stellten sich bereits einige Probleme dar, diese benötigte Konzentration zu erreichen. So musste im Endeffekt mehr als die fünffache Menge an Gewebe verwendet werden, als es in dem Protokoll zur Herstellung des Lysats durch die Firma PamGene empfohlen wurde. Das lag höchstwahrscheinlich an der Tatsache, dass die Haut im Vergleich zu anderen Gewebetypen eine relativ niedrige Proteinkonzentration aufweist. Gleichzeitig ist sie sehr kollagenhaltig, was das Zerkleinern und vor allem das anschließende Lysieren des Gewebes erschwert hat. So ist nur bedingt ein homogenes Lysat entstanden, weshalb möglicherweise nicht alle Proteine vollständig extrahiert werden konnten. Auch war die Konzentration des Protein-Lysats aus verschiedenen Proben recht heterogen, was wahrscheinlich auf teilweise deutlichen Altersunterschieden im Patientenkollektiv zurückzuführen ist, was wiederum Dicke und Proteingehalt der Haut beeinflusst. Dennoch konnte aus allen Hautproben ausreichende Protein-Menge für die Messung in der PamStation gewonnen werden.

Generell ist die PamGene-Technologie eine elegante und vielversprechende Methodik, um die Aktivität vieler verschiedener Kinasen in einem Gewebe auf einmal zu bestimmen. Dabei muss allerdings beachtet werden, dass diese Messung lediglich eine Momentaufnahme der metabolischen Vorgänge in der Zelle ist. So wurden die Hautproben nach der Behandlung für 24 h inkubiert, bevor sie weiterverarbeitet wurden. Das bedeutet, dass man nur Kinasen, welche genau zu diesem Zeitpunkt aktiv waren, als signifikant gesteigert detektieren kann. Sämtliche zellulären Aktivitäten, welche während der 24-stündigen Inkubationszeit abgelaufen sind, werden nicht erfasst. Es wurde also bei der Messung nicht das komplette, dynamische, sich während des Pathomechanismus ständig ändernde Aktivitätsprofil der Kinasen abgebildet. So ist es hochwahrscheinlich, dass wir mit unserer Messung nicht alle Kinasen identifiziert haben, welche an der Signalkaskade als Reaktion auf die Behandlung mit dem scFv beteiligt waren. Dies ist eine wichtige Limitation der Methodik, was bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden muss. Um die Datenlage zu verdichten, müssten Proben nach Behandlung in mehreren, möglichst engen Zeitabständen genommen werden, um die zu dem jeweiligen Zeitpunkt aktiven Kinasen zu detektieren und so ein dynamisches Aktivitätsprofil über einen Zeitraum zu bekommen. Es wurden auch nur die Kinase-Aktivität bei der Verwendung des gegen Dsg1 und Dsg3 gerichteten

scFv untersucht. Möglicherweise könnte sich diese Signalkaskade im Gegensatz zu der bei Antikörpern nur gegen Dsg3 unterscheiden.

Auch bedacht werden muss, dass es keine 100-prozentige Sicherheit gibt, dass die Kinasen den Phosphorylierungen der Peptidreste auf dem PamChip korrekt zugeordnet wurden. Die Bestimmung der Aktivität einer Kinase beruht auf einer Kalkulation der von PamGene entwickelten BioNavigator-Software und ist keine direkte Messung der Aktivität einer bestimmten Kinase. Die in dem Protein-Lysat enthaltenen Kinasen phosphorylieren die auf dem PamChip immobilisierten Peptidreste, woraufhin auf der Basis bekannter Kinase-Substrat-Zugehörigkeit aus Protein-Datenbanken die Wahrscheinlichkeit der Beteiligung einer bestimmten Kinase bei einer bestimmten Phosphorylierung errechnet wird. Diesen Zusammenhang beschreibt der *Mean specificity score* (vgl. Kap. 5.6). Wurde eine Kinase in ihrer Aktivität als signifikant verändert angegeben, betrug die Wahrscheinlichkeit <10 %, dass die Zuordnung einer Kinase zu einer bestimmten Phosphorylierung falsch war. Dieses Risiko ist recht klein, sollte aber bei der Interpretation der Ergebnisse mitbedacht werden.

7.6 Messergebnisse der Kinase-Aktivität mittels PamGene-Technologie

Es wurden alle drei Bedingungen im direkten Vergleich zueinander sowohl für PTKs als auch für STKs gemessen. PTKs und STKs werden separat analysiert, da sie auf PamChips mit verschiedenen Mustern von Peptidsequenzen untersucht werden. Aus diesem Grund werden sie auf separaten Datenblättern geführt. Insgesamt wurden 65 PTKs und 101 STKs gemessen. In den Experimenten wurde in mit scFv behandelte Haut hauptsächlich nach aktivitätsgesteigerten Kinasen gesucht, da diese möglicherweise spezifisch inhibiert werden und somit potenziell als Angriffsziele neuer Medikamente fungieren können.

Interessanterweise waren in den mit scFv behandelten PC im Vergleich zu den mit IVIG behandelten NC alle 65 untersuchten PTKs tendenziell hochreguliert und gleichzeitig alle 101 STKs nach unten, auch wenn nur einige Änderungen signifikant waren. Ursache dafür könnte wie bereits beschriebenen in Ungenauigkeiten der Kalkulation der Beteiligung bestimmter Kinasen bei bestimmten Peptid-Phosphorylierungen sein. Viele Kinasen haben mehrere verschiedene Substrate, wodurch viele Kreuzreaktionen in dem komplexen Kinasen-Netzwerk ablaufen. Sind viele Kinasen innerhalb einer Klasse hoch- oder runterreguliert, besteht aufgrund des Kalkulationsalgorithmus der BioNavigator-Software eine Tendenz zur Angleichung von Ausreißern an das Aktivitätsprofil der übrigen Kinasen. Da das Kinom ein komplexes, eng verzahntes System ist, ist ein exaktes kalkulieren der Aktivität jeder einzelnen Kinasen kaum möglich. Jedoch wird die Sicherheit einer akkuraten Messung für jede Kinase in entsprechenden *Scores* angegeben, sodass

nur einige Kinasen mit hoher Messsicherheit mit signifikanter Aktivitätsänderung gelistet werden (vgl. Kap. 5.6).

Zu diesen mit signifikanter Aktivitätssteigerung gelisteten Kinasen zählten in der PC insgesamt acht PTKs. Fünf davon gehören der Src-Kinasen-Familie an, mit den Vertretern Fyn, HCK, Src, Lck und Yes. Des Weiteren wurden FAK1 und FAK2 aus der FAK-Familie, sowie Syk identifiziert.

Kinasen der Src-Familie gehören zu den NRTKs, die an der Regulation zahlreicher essenzieller Zellfunktionen wie Proliferation, Migration, Differenzierung und Stoffwechsel beteiligt sind. Alle Src-Kinasen teilen einen ähnlichen Aufbau: Eine enzymatisch aktive C-terminale Domäne (SH1), zwei regulatorische Src 2- und 3-Homologie-Domänen (SH2 u. SH3) und eine membranverankernde N-terminale Domäne (SH4). Dabei unterscheiden sie sich nur durch eine 50-90 Aminosäurereste lange Sequenz zwischen SH3- und SH4-Domäne, welche Unique-Domäne genannt wird. Dabei werden die Kinasen in ihrer Aktivität selbst durch Phosphorylierung reguliert (Boggon and Eck, 2004; Amata et al., 2014; Roskoski, 2015). Aufgrund dieser großen Ähnlichkeit zwischen den verschiedenen Mitgliedern der Src-Familie könnte es bei der PamGene-Messung zu Problemen der genauen Zuordnung einer Phosphorylierung zu einer dieser Kinasen gekommen sein. Somit wurde möglicherweise die Aktivität einer oder mehrerer Kinasen der Src-Familie als zu hoch kalkuliert, da sie aufgrund ihres Aufbaus nur erschwert exakt voneinander zu trennen sind.

Src als Mitglied der gleichnamigen PTK-Familie ist bereits recht gut erforscht. Src wird ubiquitär in Wirbeltieren exprimiert und befindet sich als NRTK an die zytoplasmatische Seite der Plasmamembran gebunden. Dort findet ein bidirektionaler Informationsaustausch mit Rezeptoren wie dem EGFR statt, welcher im Falle eine Überexpression mit dem Auftreten von Krebs assoziiert ist (Roskoski, 2015). Src ist dementsprechend ein Proto-Onkogen und bedarf daher einer genauen Regulation. Auch spielt Src eine Rolle bei der Zelladhäsion und -beweglichkeit. Eine Src-Aktivierung wurde mit der Phosphorylierung von E-Cadherin und β -Catenin in Verbindung gebracht, was den Verlust von Zell-Zell-Kontakten bewirkt. β -Catenin verbindet E-Cadherin über α -Catenin mit dem Zytoskelett und ist verwandt mit Plakoglobin (Behrens et al., 1993), was zu einer Stabilisierung der Adhärens-Verbindungen führt. Eine weitere Catenin-Isoform, p120, ist mit dem zytoplasmatischen Schwanz von E-Cadherin assoziiert (Aghib and McCrea, 1995). Eine Phosphorylierung dieser Proteine durch Src bewirkt eine Destabilisierung des Komplexes und eine Endozytose von E-Cadherin (Ortiz et al., 2021). Dies konnte in einer anderen Studie bestätigt werden, bei der eine Src-vermittelte Phosphorylierung von E-Cadherin eine verringerte Bindungsaffinität zu β -Catenin und somit eine Dissoziation der Adhärens-Verbindung bewirkte (Chen et al., 2016). Interessanterweise ist p120-Catenin mit der Aktivierung der Rho-A-GTPase assoziiert, welche mit der Pathogenese von PV in Verbindung gebracht wurde (vgl. Kap. 2.3.1).

Über eine Phosphorylierung von p120-Catenin durch Src wird Rho-A aktiviert, während sie durch Phosphorylierung von Fyn an einem anderen Tyrosin-Rest gehemmt wird (Castaño et al., 2007).

FAK ist auch eine NRTK und stellt ebenso ein Substrat von Src dar. Sie ist sehr wichtig für die Vermittlung von Zell-Zell-Adhäsion und konzentriert sich vor allem an fokalen Adhäsionen, welche über transmembrane Integrine das Aktin-Zytoskelett mit der extrazellulären Matrix verbinden (Roskoski, 2004). Durch eine Src-abhängige Phosphorylierung von FAK kommt es zur Destabilisierung von E-Cadherin, was mit einer Schwächung der Zell-Zell-Adhäsion einhergeht. Gleichzeitig kommt es zu einem Wechsel des vorliegenden Adhäsionstyps von Cadherin-dominiert zu Integrin-dominiert, wodurch wiederum ein beweglicher Phänotyp und somit Zell-Migration gefördert wird (Avizienyte et al., 2002; Avizienyte and Frame, 2005; Todorović et al., 2010). Eine andere Quelle beschreibt hingegen einen durch den Src-FAK-Komplex induzierten Abbau von Integrinen, was den Kontakt zur extrazellulären Matrix unterbricht und auf diese Weise Zell-Migration fördert (Ortiz et al., 2021). Das fehlende Vorliegen von FAK in Knockout-Zellen bewirkt beider Theorien entsprechend ein langsamerem migrieren der Zellen als normalerweise (Hanks and Polte, 1997).

Syk ist ebenfalls eine NRTK, welche zahlreiche Zell-Funktionen vermittelt. Zunächst wurde sie hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen untersucht, doch mittlerweile ist sie auch in zahlreichen nicht-hämatopoetischen Zellen nachgewiesen worden (Mócsai et al., 2010). Zahlreiche Proteine als Teil vieler verschiedener biologischer Stoffwechselwege sind von ihrer katalytischen Aktivität abhängig. Unter anderem ist sie an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert, wo sie Cadherine und andere Proteine phosphorylieren kann, was wiederum die Zell-Zell-Adhäsionen stärkt (Larive et al., 2009). Diese Tatsache würde ihrer Beteiligung bei der Akantholyse durch ihre Aktivierung allerdings eher widersprechen.

7.7 Der Effekt der Kinase-Inhibition im Keratinozyten-Dissoziations-Assay auf die Keratinozyten Fragmentierung

Das Keratinozyten-Dissoziations-Modell ist für die Quantifizierung des akantholytischen Effekts von PV-Antikörpern auf einen Keratinozyten-Monolayer geeignet (van der Wier et al., 2010). Darüber hinaus lassen sich in diesem Modell die Wirksamkeit von Substanzen auf die Reduktion der Akantholyse untersuchen (Burmester et al., 2020). Dafür können sowohl normale humane epitheliale Keratinozyten (NHEK) als auch HaCaT-Zellen verwendet werden. Primäre Keratinozyten wie NHEK bieten die Möglichkeit, die Variabilität der *in vivo* Situation möglichst genau widerzuspiegeln, jedoch sind HaCaT-Zelllinien günstiger, einfacher zu handhaben und die

Ergebnisse sind reproduzierbarer (Lotti et al., 2022). NHEK weisen Einschränkungen als experimentelles Modell für mukokutanen PV auf, da sie auch unter hohem Calciumspiegel keine signifikanten Mengen an Dsg1 exprimieren (van der Wier et al., 2010). Aus diesen Gründen wurden bei den Experimenten HaCaT-Zellen den NHEK bevorzugt. Dabei sollte aber beachtet werden, dass HaCaT-Zellen eine immortalisierte Zelllinie sind, weshalb Abweichungen in den Signalkaskaden der Zellen zu primären Keratinozyten möglich sind. Ein Problem bei diesem Modell stellt die Vergleichbarkeit der Experimente da, da sich die Methodik in verschiedenen Forschungsgruppen leicht voneinander unterscheiden kann (Schmidt et al., 2022). Auch werden die Zellen verwendet, wenn sie annähernd 100 % konfluent gewachsen sind, jedoch kann es immer zu kleinen Abweichungen in der Wachstumsgeschwindigkeit zwischen den Wells kommen, was einen Einfluss auf die Ergebnisse haben kann.

Auf der Basis der PamGene-Ergebnisse sollten die Rolle der detektierten Kinasen im Pathomechanismus von PV im Keratinozyten-Dissoziations-Modell validiert werden. Dafür wurden Kinase-Inhibitoren der Firma Selleck Chemicals verwendet, welche möglichst spezifisch einzelne Kinasen hemmen sollten. Im Falle eines erfolgreichen Ergebnisses würde es durch diese Behandlung zur Reduktion der Fragmentierung des Zell-Monolayers im Keratinozyten-Dissoziations-Assays kommen, woraus eine Beteiligung dieser Kinasen im Pathomechanismus von PV bestätigt werden würde. Aufgrund des sehr ähnlichen Aufbaus der aus der gleichen Familie stammenden Kinasen (vgl. Kap. 6.7), war es nicht möglich jede Kinase separat zu hemmen, sodass einige verwendete Inhibitoren mehrere Kinasen gleichzeitig inhibieren. Die genauen verwendeten Inhibitoren mit den dazugehörigen gehemmten Kinasen können der **Tabelle 14** (Kap. 5.7) entnommen werden. Alle Inhibitoren wurden in den Konzentrationen 0,1 μM , 1 μM und 10 μM getestet.

Es wurden insgesamt fünf Inhibitoren getestet, welche einen oder mehrere Mitglieder der Src-Familie inhibiert haben. Dabei konnte für die Inhibitoren PP2 (Lck / Fyn), SU 6656 (Fyn / Lck / Yes) und Saracatinib (ganze Src-Familie) in allen drei Konzentrationen eine signifikante Reduktion der Fragmentierung des Zell-Monolayers mit weitestgehend linearer Effektstärke zur Inhibitor-Konzentration beobachtet werden. Die Inhibitoren KX2-391 (Src) und RK 2446 (Lck) zeigten ebenfalls eine reduzierte Fragmentierung in alle drei Konzentrationen, jedoch zeigte RK 2446 mit steigender Inhibitor-Konzentration eine Zunahme der Fragmentierung, während KX2-391 bis 1 μM eine reduzierte Fragmentierung bewirkt, bevor diese bei 10 μM wieder anstieg. Das könnte auf einen toxischen Effekt dieser Inhibitoren auf die Zellen in höheren Konzentrationen hinweisen.

Diese Ergebnisse decken sich weitestgehend mit der bekannten Beteiligung der Src-Familie bei der Regulation der Zell-Adhäsion (vgl. Kap. 6.7). Des Weiteren haben bereits einige Studien die

Rolle von Src-Kinasen in der Pathogenese von PV untersucht. So haben Kugelmann *et al.* den Effekt einer Inhibition von Src durch PP2 auf die Akantholyse durch PV-IgG in Zellkultur-, Maus- und Hautorgan-Kulturmodell untersucht. In der Zellkultur zeigte sich bei einer 15- und 60-minütigen Inkubation von PV-IgG mit PP2 eine signifikante Reduktion der Akantholyse, nicht jedoch nach 24-stündiger. Eine parallel durchgeführte Western-Blot-Analyse zeigte eine Aktivierung von Src in den ersten 2 h der Inkubation, nicht jedoch nach 24 h, was darauf hindeutet, dass eine Src-Hemmung nur in der Zeit der Src-Aktivierung vor der Akantholyse schützend ist. Dieses Ergebnis wurde von weiteren Gruppen gestützt. Die Forschungsgruppe Walter *et al.* hat den zeitlichen Aktivitätsverlauf von Src bestimmt, welcher bei 30 min nach PV-IgG Kontakt sein Peak erreicht, bevor es wieder abfiel. Ebenso Marchenko *et al.*, die den Src-Peak nach 1 h erreichten. Bestätigt wird dies in einer anderen Studie, welche die Src-Aktivität nur in periläsionaler Haut erhöht vorfand, nicht jedoch in läsionaler (Tsang *et al.*, 2012). Daher scheint die Src-Aktivierung vor Eintreten der Akantholyse relevant zu sein (Schmitt and Waschke, 2021). Dies widerspricht den eigenen Ergebnissen, bei denen die Src-Aktivität nach 24-stündiger Inkubation signifikant erhöht war. Möglicherweise waren gewisse Mengen an periläsionalem Gewebe in den Proben enthalten und somit eine erhöhte Src-Aktivität detektierbar.

Im Mausmodell wurde in Experimenten von Kugelmann *et al.* die Akantholyse zu allen Zeitpunkten reduziert, was die Ergebnisse in einer weiteren Studie bestätigen, die durch eine Inhibition von Src im Mausmodellen eine durch PV-IgG ausgelöste Akantholyse hemmte (Pretel *et al.*, 2009). Zum gleichen Ergebnis kamen zwei andere Studien, welche die durch PP2 ausgelöste Akantholyse durch PV-IgG in Zellkultur-Experimenten komplett verhindern, bzw. reduzieren konnten (Chernyavsky *et al.*, 2007; Walter *et al.*, 2017). Im menschlichen Hautorgan-Kulturmodell konnte jedoch durch diese Behandlung kein vorteilhafter Effekt auf die Akantholyse gezeigt werden (Kugelmann *et al.*, 2019). Zusätzlich konnte auch eine Beteiligung von Src bei der Phosphorylierung von Plakophilin-3 beobachtet werden, was zu dessen Dissoziation von Dsg3 führt und somit Desmosomen destabilisiert. Eine Inhibition von Src in HaCaT-Zellen brachte diesen Prozess zum Erliegen und stärkte die Zell-Adhäsion (Cirillo *et al.*, 2014).

Insgesamt gibt es starke Evidenz, dass die Akantholyse in PV durch eine Inhibition von Src reduziert, bzw. verhindert werden kann. In den bestehenden Studien ist generell von „Src“ oder „Src-Familie“ die Rede und es wurde in keiner Studie zwischen den einzelnen Mitgliedern bei der Beteiligung an der Pathogenese von PV differenziert. Wie bereits beschrieben muss allerdings hervorgehoben werden, dass die einzelnen Mitglieder einen sehr ähnlichen Aufbau haben und somit nicht sehr spezifisch einzeln inhibiert werden können, was eine genauere Untersuchung erschwert. So ist davon auszugehen, dass bei Verwendung eines Src-Inhibitors in hoher Konzentration von bis zu 10 μ M, welche in vielen Studien verwendet wird, zwangsläufig eine

Hemmung der anderen Src-Kinasen stattfinden wird. In den meisten Studien wurde auch nur diese eine Konzentration getestet (Brescacin et al., 2022). Vor diesem Hintergrund können unsere Experimente tiefere Einblicke in die Beteiligung der verschiedenen Src-Kinasen in PV geben, da verschiedene Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen getestet wurden.

Über die Beteiligung von FAK und Syk bei der Pathogenese von PV wurde in der Literatur bisher nur sehr wenig berichtet. In den durchgeführten Experimenten konnte der FAK-Inhibitor PF-573228 die Fragmentierung der Keratinozyten in allen drei Konzentrationen signifikant reduzieren, jedoch blieb das Ausmaß der Reduktion über die drei Konzentrationen konstant. Das wird durch die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Gil *et al.* in einem Mausmodell bestätigt, wo es durch PV-IgG zur Phosphorylierung und Aktivierung von FAK kommt, was mit Akantholyse verbunden ist. Durch eine direkte Hemmung von FAK mit PF-573228 konnte dies verhindert werden. Ebenso nahm durch eine Inhibition von Src die FAK-Phosphorylierung und die Akantholyse in der Epidermis ab, was die Wechselwirkung von Src und FAK nochmal verdeutlicht.

Syk wurde bisher noch nicht mit der Pathogenese von PV in Verbindung gebracht. Sie wurde lediglich als beteiligte Kinase bei der Pathogenese einer anderen blasenbildenden Autoimmundermatose, der Epidermolysis bullosa aquisata, identifiziert. Dabei hatte eine Inhibition von Syk sich als schützend für Mäuse herausgestellt (Samavedam et al., 2018). In den eigenen Experimenten konnte durch den Syk-Inhibitor PRT062607 lediglich in der höchsten Konzentration von 10 μ M eine Reduktion der Fragmentierung beobachtet werden, bei welcher Konzentration bereits mit Kreuzhemmungen von anderen Kinasen gerechnet werden muss. Somit scheint diese Behandlung keinen Vorteil zu bewirken.

7.8 Andere beteiligte Kinasen bei der Pathogenese von Pemphigus vulgaris

Neben den mit der PamGene-Technologie detektierten Kinasen werden in der Literatur einige weitere Kinasen mit der Pathogenese von PV in Verbindung gebracht. Die mit am häufigsten und intensivsten untersuchte davon ist die PTK p38MAPK (vgl. Kap. 2.3.1). Nach dem Kontakt mit PV-IgG kommt es zur Phosphorylierung von p38MAPK, was wiederum zum Verlust der Zell-Zell-Adhäsion führt. Zahlreiche Studien haben die Wirksamkeit der Inhibition der p38MAPK in allen drei gängigen PV-Modellen untersucht und kamen zu dem Ergebnis, dass modellübergreifend die Akantholyse durch eine Inhibition unterbunden werden kann (Brescacin et al., 2022). Ebenfalls wurde eine Beteiligung des EGFR und dessen nachgeschalteter *extracellular-signal regulated kinase* (ERK) nachgewiesen. Diese werden über Src aktiviert und eine Hemmung des EGFR oder ERK zeigte schützende Wirkung in Zellkultur-, Maus- und humanen Haut-Experimenten (Bektas et al., 2013; Egu et al., 2019; Walter et al., 2019). Auch ist die PKC von mehreren Studien bei der

Blasenbildung in PV nachgewiesen worden. So führte eine Hemmung der PKC zu einer reduzierten Depletion von Dsg3 durch PV-IgG in Maus- und Zellkultur-Experimenten (Sánchez-Carpintero et al., 2004; Spindler et al., 2011), nicht jedoch in humaner *ex vivo* Haut (Egu et al., 2019). Zahlreichen weiteren Kinasen wird eine Beteiligung nachgesagt (Brescacin et al., 2022).

Ein Grund, warum diese Kinasen nicht in der PamGene-Analyse entdeckt wurden, könnte der Zeitpunkt der Probennahme sein. Die Hautproben wurden nach 24 h geerntet, jedoch zeigen Studien, dass viele Kinasen schon früher ihre Aktivitätsspitze erreichen, bevor sie wieder abfallen. So wurde für die p38MAPK eine maximale Aktivität bei 30-240 min nach Kontakt mit PV-IgG beschrieben (Berkowitz et al., 2005; Chernyavsky et al., 2007), für die PKC nach 1-30 min (Osada et al., 1997), sowie für den EGFR und ERK nach ca. 30 min (Walter et al., 2019). Deshalb würde es sich anbieten, in einem weiteren Forschungsprojekt Proben zu einem früheren und wenn möglich mehreren Zeitpunkten zu nehmen, um die Datenlage zu verdichten.

7.9 Ausblick

In den Experimenten wurde die Beteiligung der Src- und FAK-Kinasen bei der Pathogenese von PV bestätigt und weiter evaluiert. Momentan untersucht meine Arbeitsgruppe die verwendeten Kinase-Inhibitoren auf deren Wirkung im Hautorgan-Kulturmodell. Im Folgenden wären auch Testungen im Mausmodell interessant, um eine modellübergreifende, dichte Datenlage zu generieren. Auch wäre es sinnvoll, noch einmal Hautproben zu früheren Zeitpunkten nach Antikörperkontakt mit der PamGene-Technologie zu untersuchen, um auch Kinasen zu detektieren, welche zu einem früheren Zeitpunkt der Pathogenese aktiv sind und so ein dynamisches Aktivitätsprofil der beteiligten Kinasen zu bekommen.

Zusätzlich könnte noch einmal die Untersuchung der Wirkung von Prednisolon im Hautorgan-Kulturmodell aufgegriffen werden. Da mehrere Studien gezeigt haben, dass durch eine längere Inkubation der Haut mit Prednisolon vor Hinzufügen von PV-Antikörpern eine Akantholyse verhindert werden kann, könnten die eigenen Ergebnisse noch einmal hinterfragt werden. Besonders interessant wäre dabei aus meiner Sicht die Wirkung der topischen, lokalen Auftragung von GC-haltiger Creme auf die Akantholyse, welche bereits eine deutliche Tendenz zur Reduktion gezeigt hat und eine topische Anwendung generell mit weniger Nebenwirkungen verbunden ist als eine systemische Applikation (Joly et al., 2002).

8 Zusammenfassung

Bei der Autoimmunerkrankung Pemphigus vulgaris (PV) werden Antikörper gegen die epidermalen Proteine Desmoglein (Dsg) 1 und 3 gebildet, was zu Blasenbildung auf Haut und Schleimhäuten führt. In dieser Arbeit wurde der Effekt der Injektion bzw. topischen Applikation von Glucocorticoiden auf die Blasenbildung im Hautorgan-Kulturmodell für PV untersucht. Dabei wurde die Haut mit einem bi-spezifischen Anti-Dsg1/3 variablen Einzelkettenfragment (scFv) behandelt, was zur epidermalen Blasenbildung führt. Dabei konnte durch eine zusätzliche Behandlung der Haut mit Glucocorticoiden keine signifikante Reduktion der Blasenbildung beobachtet werden. Jedoch konnten andere Studien bereits einen Effekt durch längere Inkubationszeit des Cortisons vor Hinzufügen des Antikörpers feststellen, sodass weitere Experimente folgen sollten. Zusätzlich wurden Immunfluoreszenz-Färbungen auf das scFv, sowie dessen Antigene Dsg1 und Dsg3 durchgeführt, welche ein deckungsgleiches Bindeverhalten zeigten.

Außerdem wurden Hautproben des Hautorgan-Kulturmodells mit der PamGene-Technologie auf deren Kinase-Aktivität hin untersucht. Dabei zeigten sich in der mit scFv behandelten Positivkontrolle im Vergleich zur mit intravenösem Immunglobulin G behandelten Negativkontrolle eine signifikante Aktivitätssteigerung für insgesamt acht Protein-Tyrosin-Kinasen. Darunter befanden sich unter anderem fünf Vertreter der Src-Kinasen-Familie, zwei Vertreter der FAK-Familie, sowie Syk.

Auf Basis dieser Ergebnisse wurde ein Keratinozyten-Dissoziations-Assay durchgeführt. Dafür wurden HaCaT-Zellen angezüchtet, welche mit dem scFv behandelt wurde, was aufgrund des Verlusts der Zell-Adhäsion zu einer Fragmentierung des Zell-Monolayers geführt hat. Es wurden für diese Versuchsreihe bestimmte Inhibitoren ausgewählt, welche möglichst spezifisch die in ihrer Aktivität gesteigerten Kinasen inhibieren sollten. Dadurch sollte sich zeigen, ob durch die Inhibition der Kinasen die Zell-Adhäsion der mit scFv behandelten Keratinozyten gestärkt werden kann, was sich in einer Verringerung der Fragmentierung des Zell-Monolayers zeigen würde. Dies würde eine Beteiligung dieser Kinasen im Pathomechanismus von PV bestätigen. Tatsächlich konnten bei sechs von sieben getesteten Kinase-Inhibitoren in allen drei verwendeten Konzentrationen von 0,1 μ M, 1 μ M und 10 μ M eine signifikante Reduktion der Fragmentierung des Zell-Monolayers festgestellt werden. Für den letzten Inhibitor konnte lediglich in der höchsten Konzentration eine relevante Reduktion der Fragmentierung beobachtet werden.

Diese Ergebnisse schaffen eine hervorragende Basis für weitere Forschungsprojekte, um in Zukunft weitere zielgerichtete Therapien für PV zu entwickeln.

9 Quellenverzeichnis

Aalberse, R.C., Schuurman, J., 2002. IgG4 breaking the rules. *Immunology* 105, 9–19. <https://doi.org/10.1046/j.0019-2805.2001.01341.x>.

Abraham, S.M., Lawrence, T., Kleiman, A., Warden, P., Medghalchi, M., Tuckermann, J., Saklatvala, J., Clark, A.R., 2006. Antiinflammatory effects of dexamethasone are partly dependent on induction of dual specificity phosphatase 1. *J. Exp. Med.* 203, 1883–1889. <https://doi.org/10.1084/jem.20060336>.

Aghib, D.F., McCrea, P.D., 1995. The E-cadherin complex contains the src substrate p120. *Exp. Cell Res.* 218, 359–369. <https://doi.org/10.1006/excr.1995.1167>.

Ahmad, Z.A., Yeap, S.K., Ali, A.M., Ho, W.Y., Alitheen, N.B.M., Hamid, M., 2012a. scFv Antibody: Principles and Clinical Application. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, e980250. <https://doi.org/10.1155/2012/980250>.

Ahmed, A.R., Shetty, S., 2015. A comprehensive analysis of treatment outcomes in patients with pemphigus vulgaris treated with rituximab. *Autoimmun. Rev.* 14, 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.12.002>.

Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O., 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>.

Alpsoy, E., Akman-Karakas, A., Uzun, S., 2015. Geographic variations in epidemiology of two autoimmune bullous diseases: pemphigus and bullous pemphigoid. *Arch. Dermatol. Res.* 307, 291–298. <https://doi.org/10.1007/s00403-014-1531-1>.

Amagai, M., 1999. Autoimmunity against desmosomal cadherins in pemphigus. *J. Dermatol. Sci.* 20, 92–102. [https://doi.org/10.1016/S0923-1811\(99\)00016-X](https://doi.org/10.1016/S0923-1811(99)00016-X).

Amagai, M., Koch, P.J., Nishikawa, T., Stanley, J.R., 1996. Pemphigus Vulgaris Antigen (Desmoglein 3) Is Localized in the Lower Epidermis, the Site of Blister Formation in Patients. *J. Invest. Dermatol.* 106, 351–355. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12343081>.

Amagai, M., Matsuyoshi, N., Wang, Z.H., Andl, C., Stanley, J.R., 2000. Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1. *Nat. Med.* 6, 1275–1277. <https://doi.org/10.1038/81385>.

Amagai, Masayuki, Tsunoda, K., Suzuki, H., Nishifuji, K., Koyasu, S., Nishikawa, T., 2000. Use of autoantigen-knockout mice in developing an active autoimmune disease model for pemphigus. *J. Clin. Invest.* 105, 625–631.

- Amagai, M., Tsunoda, K., Zillikens, D., Nagai, T., Nishikawa, T., 1999. The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile. *J. Am. Acad. Dermatol.* 40, 167–170. [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(99\)70183-0](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(99)70183-0).
- Amata, I., Maffei, M., Pons, M., 2014. Phosphorylation of unique domains of Src family kinases. *Front. Genet.* 5.
- Amber, K.T., Valdebran, M., Grando, S.A., 2018. Non-Desmoglein Antibodies in Patients With Pemphigus Vulgaris. *Front. Immunol.* 9, 1190. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01190>.
- Anhalt, G.J., Labib, R.S., Voorhees, J.J., Beals, T.F., Diaz, L.A., 1982. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. *N. Engl. J. Med.* 306, 1189–1196. <https://doi.org/10.1056/NEJM198205203062001>.
- Anhalt, G.J., Patel, H.P., Labib, R.S., Diaz, L.A., Proud, D., 1986a. Dexamethasone inhibits plasminogen activator activity in experimental pemphigus in vivo but does not block acantholysis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 136, 113–117.
- Anhalt, G.J., Till, G.O., Diaz, L.A., Labib, R.S., Patel, H.P., Eaglstein, N.F., 1986b. Defining the role of complement in experimental pemphigus vulgaris in mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 137, 2835–2840.
- Aoki-Ota, M., Tsunoda, K., Ota, T., Iwasaki, T., Koyasu, S., Amagai, M., Nishikawa, T., 2004. A mouse model of pemphigus vulgaris by adoptive transfer of naive splenocytes from desmoglein 3 knockout mice. *Br. J. Dermatol.* 151, 346–354. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2004.06056.x>.
- Aubert-Wastiaux, H., Moret, L., Le Rhun, A., Fontenoy, A. m., Nguyen, J. m., Leux, C., Misery, L., Young, P., Chastaing, M., Danou, N., Lombrail, P., Boralevi, F., Lacour, J. p., Mazereeuw-Hautier, J., Stalder, J.-F., Barbarot, S., 2011. Topical corticosteroid phobia in atopic dermatitis: a study of its nature, origins and frequency. *Br. J. Dermatol.* 165, 808–814. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2011.10449.x>.
- Avizienyte, E., Frame, M.C., 2005. Src and FAK signalling controls adhesion fate and the epithelial-to-mesenchymal transition. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 542–547. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.08.007>.
- Avizienyte, E., Wyke, A.W., Jones, R.J., McLean, G.W., Westhoff, M.A., Brunton, V.G., Frame, M.C., 2002. Src-induced de-regulation of E-cadherin in colon cancer cells requires integrin signalling. *Nat. Cell Biol.* 4, 632–638. <https://doi.org/10.1038/ncb829>.

- Ayroldi, E., Riccardi, C., 2009. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 23, 3649–3658. <https://doi.org/10.1096/fj.09-134684>.
- Banerjee, S., Biehl, A., Gadina, M., Hasni, S., Schwartz, D.M., 2017. JAK–STAT Signaling as a Target for Inflammatory and Autoimmune Diseases: Current and Future Prospects. *Drugs* 77, 521–546. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0701-9>.
- Bazzi, H., Getz, A., Mahoney, M.G., Ishida-Yamamoto, A., Langbein, L., Wahl, J.K., Christiano, A.M., 2006. Desmoglein 4 is expressed in highly differentiated keratinocytes and trichocytes in human epidermis and hair follicle. *Differentiation* 74, 129–140. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2006.00061.x>.
- 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. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 3113. <https://doi.org/10.3390/ijms20133113>.
- Behrens, B., L, V., R, F., E, W., F, V.R., Mm, M., W, B., 1993. Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene. *J. Cell Biol.* 120. <https://doi.org/10.1083/jcb.120.3.757>.
- Bektas, M., Jolly, P.S., Berkowitz, P., Amagai, M., Rubenstein, D.S., 2013a. A Pathophysiologic Role for Epidermal Growth Factor Receptor in Pemphigus Acantholysis *. *J. Biol. Chem.* 288, 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: INHIBITION OF p38MAPK PREVENTS PEMPHIGUS VULGARIS IgG-INDUCED CYTOSKELETON REORGANIZATION *. *J. Biol. Chem.* 280, 23778–23784. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501365200>.
- Berridge, M.J., 2004. Calcium signal transduction and cellular control mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.*, 8th European Symposium on Calcium 1742, 3–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.08.012>.
- Bertolotti, A., 2018. The split protein phosphatase system. *Biochem. J.* 475, 3707–3723. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170726>.

- Bertram, F., Bröcker, E.-B., Zillikens, D., Schmidt, E., 2009. Prospective analysis of the incidence of autoimmune bullous disorders in Lower Franconia, Germany. *JDDG J. Dtsch. Dermatol. Ges.* 7, 434–439. <https://doi.org/10.1111/j.1610-0387.2008.06976.x>.
- Bieber, K., Sun, S., Ishii, N., Kasperkiewicz, M., Schmidt, E., Hirose, M., Westermann, J., Yu, X., Zillikens, D., Ludwig, R.J., 2010. Animal models for autoimmune bullous dermatoses. *Exp. Dermatol.* 19, 2–11. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2009.00948.x>.
- Blume-Jensen, P., Hunter, T., 2001. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411, 355–365. <https://doi.org/10.1038/35077225>.
- Boggon, T.J., Eck, M.J., 2004. Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* 23, 7918–7927. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208081>.
- 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. *J. Cell Biol.* 106, 761–771. <https://doi.org/10.1083/jcb.106.3.761>.
- Brescacin, A., Baig, Z., Bhinder, J., Lin, S., Brar, L., Cirillo, N., 2022. What protein kinases are crucial for acantholysis and blister formation in pemphigus vulgaris? A systematic review. *J. Cell. Physiol.* 237, 2825–2837. <https://doi.org/10.1002/jcp.30784>.
- Burmester, I.A.K., Emtenani, S., Johns, J.-G., Ludwig, R.J., Hammers, C.M., Hundt, J.E., 2019. Translational Use of a Standardized Full Human Skin Organ Culture Model in Autoimmune Blistering Diseases. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 85, e56. <https://doi.org/10.1002/cpph.56>.
- Burmester, I.A.K., Flaswinkel, S., Thies, C., Kasprick, A., Kamaguchi, M., Bumiller-Bini, V., Emtenani, S., Feldmann, N., Kridin, K., Schmidt, E., Beek, N., Zillikens, D., Hammers, C.M., Hundt, J.E., Ludwig, R.J., 2020a. Identification of novel therapeutic targets for blocking acantholysis in pemphigus. *Br. J. Pharmacol.* 177, 5114–5130. <https://doi.org/10.1111/bph.15233>.
- Calkins, C.C., Setzer, S.V., Jennings, J.M., Summers, S., Tsunoda, K., Amagai, M., Kowalczyk, A.P., 2006. Desmoglein Endocytosis and Desmosome Disassembly Are Coordinated Responses to Pemphigus Autoantibodies *. *J. Biol. Chem.* 281, 7623–7634. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512447200>.
- Castaño, J., Solanas, G., Casagolda, D., Raurell, I., Villagrasa, P., Bustelo, X.R., García de Herreros, A., Duñach, M., 2007. Specific phosphorylation of p120-catenin regulatory domain differently modulates its binding to RhoA. *Mol. Cell. Biol.* 27, 1745–1757. <https://doi.org/10.1128/MCB.01974-06>.

Chen, C.-L., Wang, S.-H., Chan, P.-C., Shen, M.-R., Chen, H.-C., 2016. Phosphorylation of E-cadherin at threonine 790 by protein kinase C δ reduces β -catenin binding and suppresses the function of E-cadherin. *Oncotarget* 7, 37260–37276. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9403>.

Chen, P., Li, J., Barnes, J., Kokkonen, G.C., Lee, J.C., Liu, Y., 2002. Restraint of proinflammatory cytokine biosynthesis by mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 169, 6408–6416. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.11.6408>.

Chen, Y., Chernyavsky, A., Webber, R.J., Grando, S.A., Wang, P.H., 2015. Critical Role of the Neonatal Fc Receptor (FcRn) in the Pathogenic Action of Antimitochondrial Autoantibodies Synergizing with Anti-desmoglein Autoantibodies in Pemphigus Vulgaris. *J. Biol. Chem.* 290, 23826–23837. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.668061>.

Chernyavsky, A.I., Arredondo, J., Kitajima, Y., Sato-Nagai, M., Grando, S.A., 2007. Desmoglein Versus Non-desmoglein Signaling in Pemphigus Acantholysis: CHARACTERIZATION OF NOVEL SIGNALING PATHWAYS DOWNSTREAM OF PEMPHIGUS VULGARIS ANTIGENS *. *J. Biol. Chem.* 282, 13804–13812. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611365200>.

Chi, H., Barry, S.P., Roth, R.J., Wu, J.J., Jones, E.A., Bennett, A.M., Flavell, R.A., 2006. Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2274–2279. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510965103>.

Cirillo, N., AlShwaimi, E., McCullough, M., Prime, S.S., 2014. Pemphigus vulgaris autoimmune globulin induces Src-dependent tyrosine-phosphorylation of plakophilin 3 and its detachment from desmoglein 3. *Autoimmunity* 47, 134–140. <https://doi.org/10.3109/08916934.2013.866100>.

Cirillo, N., Campisi, G., Gombos, F., Perillo, L., Femiano, F., Lanza, A., 2008. Cleavage of desmoglein 3 can explain its depletion from keratinocytes in pemphigus vulgaris. *Exp. Dermatol.* 17, 858–863. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00719.x>.

Clark, A.R., 2007. Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 275, 79–97. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.04.013>.

Coutinho, A.E., Chapman, K.E., 2011. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Mol. Cell. Endocrinol.* 335, 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.04.005>.

Culton, D.A., McCray, S.K., Park, M., Roberts, J.C., Li, N., Zedek, D.C., Anhalt, G.J., Cowley, D.O., Liu, Z., Diaz, L.A., 2015. Mucosal Pemphigus Vulgaris Anti-Dsg3 IgG Is Pathogenic to the Oral Mucosa

of Humanized Dsg3 Mice. *J. Invest. Dermatol.* 135, 1590–1597. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.54>.

Curtis, J.R., Westfall, A.O., Allison, J., Bijlsma, J.W., Freeman, A., George, V., Kovac, S.H., Spettell, C.M., Saag, K.G., 2006. Population-based assessment of adverse events associated with long-term glucocorticoid use. *Arthritis Rheum.* 55, 420–426. <https://doi.org/10.1002/art.21984>.

Czock, D., Keller, F., Rasche, F.M., Häussler, U., 2005. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. *Clin. Pharmacokinet.* 44, 61–98. <https://doi.org/10.2165/00003088-200544010-00003>.

Denning, M.F., Guy, S.G., Ellerbroek, S.M., Norvell, S.M., Kowalczyk, A.P., Green, K.J., 1998. The Expression of Desmoglein Isoforms in Cultured Human Keratinocytes Is Regulated by Calcium, Serum, and Protein Kinase C. *Exp. Cell Res.* 239, 50–59. <https://doi.org/10.1006/excr.1997.3890>.

Edelman, A.M., Blumenthal, D.K., Krebs, E.G., 1987. PROTEIN SERINE/THREONINE KINASES. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 567–613. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.56.070187.003031>.

Egu, D.T., Kugelmann, D., Waschke, J., 2019. Role of PKC and ERK Signaling in Epidermal Blistering and Desmosome Regulation in Pemphigus. *Front. Immunol.* 10, 2883. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02883>.

Eming, R., Hennerici, T., Bäcklund, J., Feliciani, C., Visconti, K.C., Willenborg, S., Wohde, J., Holmdahl, R., Sønderstrup, G., Hertl, M., 2014. Pathogenic IgG Antibodies against Desmoglein 3 in Pemphigus Vulgaris Are Regulated by HLA-DRB1*04:02–Restricted T Cells. *J. Immunol.* 193, 4391–4399. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401081>.

Franklin, C.C., Kraft, A.S., 1997. Conditional Expression of the Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) Phosphatase MKP-1 Preferentially Inhibits p38 MAPK and Stress-activated Protein Kinase in U937 Cells *. *J. Biol. Chem.* 272, 16917–16923. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.27.16917>.

Frijters, R., Fleuren, W., Toonen, E.J., Tuckermann, J.P., Reichardt, H.M., van der Maaden, H., van Elsas, A., van Lierop, M.-J., Dokter, W., de Vlieg, J., Alkema, W., 2010. Prednisolone-induced differential gene expression in mouse liver carrying wild type or a dimerization-defective glucocorticoid receptor. *BMC Genomics* 11, 359. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-359>.

Garrod, D., Chidgey, M., 2008. Desmosome structure, composition and function. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr., Apical Junctional Complexes Part I* 1778, 572–587. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.014>.

- Gaud, G., Lesourne, R., Love, P.E., 2018. Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 18, 485–497. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0020-8>.
- Gil, M.P., Modol, T., España, A., López-Zabalza, M.J., 2012. Inhibition of FAK prevents blister formation in the neonatal mouse model of pemphigus vulgaris. *Exp. Dermatol.* 21, 254–259. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2012.01441.x>.
- Hammers, C.M., Stanley, J.R., 2016. Mechanisms of Disease: Pemphigus and Bullous Pemphigoid. *Annu. Rev. Pathol.* 11, 175–197. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044313>.
- Hammers, C.M., Stanley, J.R., 2014. Antibody Phage Display: Technique and Applications. *J. Invest. Dermatol.* 134, 1–5. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.521>.
- Hanks, S.K., Polte, T.R., 1997. Signaling through focal adhesion kinase. *BioEssays* 19, 137–145. <https://doi.org/10.1002/bies.950190208>.
- Hannon, R., Croxtall, J.D., Getting, S.J., Roviezzo, F., Yona, S., Paul-Clark, M.J., Gavins, F.N.E., Perretti, M., Morris, J.F., Buckingham, J.C., Flower, R.J., 2003. Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in annexin 1-/- mouse. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 17, 253–255. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0239fje>.
- Hawrylowicz, C.M., 2005. Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation. *J. Exp. Med.* 202, 1459–1463. <https://doi.org/10.1084/jem.20052211>.
- Hennings, H., Holbrook, K., 1983. Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture *1An ultrastructural study. *Exp. Cell Res.* 143, 127–142. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(83\)90115-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(83)90115-5).
- Heupel, W.-M., Zillikens, D., Drenckhahn, D., Waschke, J., 2008. Pemphigus Vulgaris IgG Directly Inhibit Desmoglein 3-Mediated Transinteraction. *J. Immunol.* 181, 1825–1834. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.3.1825>.
- Hubbard, S.R., Till, J.H., 2000. Protein Tyrosine Kinase Structure and Function. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 373–398. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.373>.
- Hunter, T., 1991. [1] Protein kinase classification, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 3–37. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)00125-G](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)00125-G).
- Huston, J.S., Mudgett-Hunter, M., Tai, M.-S., McCartney, J., Warren, F., Haber, E., Oppermann, H., 1991. [3] Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 46–88. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)03005-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)03005-2).

Ikedo, Shigaku., Ogawa, Hideoki., 1991. Effects of Steroid, Retinoid, and Protease Inhibitors on the Formation of Acantholysis Induced in Organ Culture of Skins from Patients with Benign Familial Chronic Pemphigus. *J. Invest. Dermatol.* 97, 644–648. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12483596>.

Ishii, K., Lin, C., Siegel, D.L., Stanley, J.R., 2008. Isolation of Pathogenic Monoclonal Anti-Desmoglein 1 Human Antibodies by Phage Display of Pemphigus Foliaceus Autoantibodies. *J. Invest. Dermatol.* 128, 939–948. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5701132>.

Ishikawa, H., Li, K., Tamai, K., Sawamura, D., Uitto, J., 2000. Cloning of the mouse desmoglein 3 gene (Dsg3): interspecies conservation within the cadherin superfamily. *Exp. Dermatol.* 9, 229–239. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0625.2000.009004229.x>.

Iwata, H., Bieber, K., Hirose, M., Ludwig, R.J., 2015. Animal models to investigate pathomechanisms and evaluate novel treatments for autoimmune bullous dermatoses. *Curr. Pharm. Des.* 21, 2422–2439. <https://doi.org/10.2174/1381612821666150316122502>.

Janeway, Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J., 2001. B-cell activation by armed helper T cells. *Immunobiol. Immune Syst. Health Dis.* 5th Ed.

Jeffes, E.W., Kaplan, R.P., Ahmed, A.R., 1984. Acantholysis produced in vitro with pemphigus serum: hydrocortisone inhibits acantholysis, while dapsone and 6-mercaptopurine do not inhibit acantholysis. *J. Clin. Immunol.* 4, 359–363. <https://doi.org/10.1007/BF00917138>.

Joly, P., Litrowski, N., 2011. Pemphigus group (vulgaris, vegetans, foliaceus, herpetiformis, brasiliensis). *Clin. Dermatol.* 29, 432–436. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2011.01.013>.

Joly, P., Maho-Vaillant, M., Prost-Squarcioni, C., Hebert, V., Houivet, E., Calbo, S., Caillot, F., Golinski, M.L., Labeille, B., Picard-Dahan, C., Paul, C., Richard, M.-A., Bouaziz, J.D., Duvert-Lehembre, S., Bernard, P., Caux, F., Alexandre, M., Ingen-Housz-Oro, S., Vabres, P., Delaporte, E., Quereux, G., Dupuy, A., Debarbieux, S., Avenel-Audran, M., D’Incan, M., Bedane, C., Bénétou, N., Jullien, D., Dupin, N., Misery, L., Machet, L., Beylot-Barry, M., Dereure, O., Sassolas, B., Vermeulin, T., Benichou, J., Musette, P., French study group on autoimmune bullous skin diseases, 2017. First-line rituximab combined with short-term prednisone versus prednisone alone for the treatment of pemphigus (Ritux 3): a prospective, multicentre, parallel-group, open-label randomised trial. *Lancet Lond. Engl.* 389, 2031–2040. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30070-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30070-3).

Joly, P., Roujeau, J.-C., Benichou, J., Picard, C., Dreno, B., Delaporte, E., Vaillant, L., D’Incan, M., Plantin, P., Bedane, C., Young, P., Bernard, P., Bullous Diseases French Study Group, 2002. A

comparison of oral and topical corticosteroids in patients with bullous pemphigoid. *N. Engl. J. Med.* 346, 321–327. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa011592>.

Kasperkiewicz, M., Ellebrecht, C.T., Takahashi, H., Yamagami, J., Zillikens, D., Payne, A.S., Amagai, M., 2017. Pemphigus. *Nat. Rev. Dis. Primer* 3, 17026. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.26>.

Kim, S.A., Tai, C.-Y., Mok, L.-P., Mosser, E.A., Schuman, E.M., 2011. Calcium-dependent dynamics of cadherin interactions at cell–cell junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 9857–9862. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019003108>.

Kugelmann, D., Rötzer, V., Walter, E., Egu, D.T., Fuchs, M.T., Vielmuth, F., Vargas-Robles, H., Schnoor, M., Hertl, M., Eming, R., Rottner, K., Schmidt, A., Spindler, V., Waschke, J., 2019. Role of Src and Cortactin in Pemphigus Skin Blistering. *Front. Immunol.* 10, 626. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00626>.

Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., Müller, W., 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75, 263–274. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)80068-p](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)80068-p).

Lanzillotta, M., Della-Torre, E., Milani, R., Bozzolo, E., Bozzalla-Cassione, E., Rovati, L., Arcidiacono, P.G., Partelli, S., Falconi, M., Ciceri, F., Dagna, L., 2019. Effects of glucocorticoids on B-cell subpopulations in patients with IgG4-related disease. *Clin. Exp. Rheumatol.* 37 Suppl 118, 159–166.

Larive, R.M., Urbach, S., Poncet, J., Jouin, P., Mascré, G., Sahuquet, A., Mangeat, P.H., Coopman, P.J., Bettache, N., 2009. Phosphoproteomic analysis of Syk kinase signaling in human cancer cells reveals its role in cell-cell adhesion. *Oncogene* 28, 2337–2347. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.99>.

Ledsgaard, L., Kilstrup, M., Karatt-Vellatt, A., McCafferty, J., Laustsen, A.H., 2018. Basics of Antibody Phage Display Technology. *Toxins* 10, 236. <https://doi.org/10.3390/toxins10060236>.

Lemmon, M.A., Schlessinger, J., 2010. Cell signaling by receptor-tyrosine kinases. *Cell* 141, 1117–1134. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.011>.

Lennard, S., 2001. Standard Protocols for the Construction of scFv Libraries, in: *Antibody Phage Display*. Humana Press, New Jersey, pp. 059–071. <https://doi.org/10.1385/1-59259-240-6:059>.

Leussink, V.I., Jung, S., Merschdorf, U., Toyka, K.V., Gold, R., 2001. High-dose methylprednisolone therapy in multiple sclerosis induces apoptosis in peripheral blood leukocytes. *Arch. Neurol.* 58, 91–97. <https://doi.org/10.1001/archneur.58.1.91>.

- Li, N., Zhao, M., Wang, J., Liu, Z., Diaz, L.A., 2009. Involvement of the apoptotic mechanism in pemphigus foliaceus autoimmune injury of the skin. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 711–717. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.1.711>.
- Lotti, R., Atene, C.G., Zanfi, E.D., Bertesi, M., Zanocco-Marani, T., 2022. In Vitro, Ex Vivo, and In Vivo Models for the Study of Pemphigus. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 7044. <https://doi.org/10.3390/ijms23137044>.
- Mahoney, M.G., Wang, Z., Rothenberger, K., Koch, P.J., Amagai, M., Stanley, J.R., 1999a. Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. *J. Clin. Invest.* 103, 461–468. <https://doi.org/10.1172/JCI5252>.
- Manning, Cantley, 2007. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* 129, 1261. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.009>.
- Manning, G., 2005. Genomic overview of protein kinases. *WormBook*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.60.1>.
- Mao, X., Choi, E.J., Payne, A.S., 2009. Disruption of Desmosome Assembly by Monovalent Human Pemphigus Vulgaris Monoclonal Antibodies. *J. Invest. Dermatol.* 129, 908–918. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.339>.
- Mao, X., Li, H., Sano, Y., Gaestel, M., Park, J.M., Payne, A.S., 2014. MAPKAP Kinase 2 (MK2)-Dependent and -Independent Models of Blister Formation in Pemphigus Vulgaris. *J. Invest. Dermatol.* 134, 68–76. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.224>.
- Mao, X., Nagler, A.R., Farber, S.A., Choi, E.J., Jackson, L.H., Leiferman, K.M., Ishii, N., Hashimoto, T., Amagai, M., Zone, J.J., Payne, A.S., 2010. Autoimmunity to desmocollin 3 in pemphigus vulgaris. *Am. J. Pathol.* 177, 2724–2730. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.100483>.
- Mao, X., Sano, Y., Park, J.M., Payne, A.S., 2011. p38 MAPK Activation Is Downstream of the Loss of Intercellular Adhesion in Pemphigus Vulgaris *. *J. Biol. Chem.* 286, 1283–1291. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.172874>.
- Marchenko, S., Chernyavsky, A.I., Arredondo, J., Gindi, V., Grando, S.A., 2010. Antimitochondrial Autoantibodies in Pemphigus Vulgaris. *J. Biol. Chem.* 285, 3695–3704. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.081570>.
- Michel, B., Ko, C.S., 1977. An organ culture model for the study of pemphigus acantholysis. *Br. J. Dermatol.* 96, 295–302. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1977.tb06141.x>.

- Miller, W.L., 2013. Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Mol. Cell. Endocrinol.* 379, 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.04.014>.
- Mócsai, A., Ruland, J., Tybulewicz, V.L.J., 2010. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 387–402. <https://doi.org/10.1038/nri2765>.
- Newton, A.C., Bootman, M.D., Scott, J.D., 2016. Second Messengers. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8, a005926. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005926>.
- Nguyen, V.T., Arredondo, J., Chernyavsky, A.I., Kitajima, Y., Pittelkow, M., Grando, S.A., 2004. Pemphigus Vulgaris IgG and Methylprednisolone Exhibit Reciprocal Effects on Keratinocytes*. *J. Biol. Chem.* 279, 2135–2146. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309000200>.
- Oda, H., Takeichi, M., 2011. Structural and functional diversity of cadherin at the adherens junction. *J. Cell Biol.* 193, 1137–1146. <https://doi.org/10.1083/jcb.201008173>.
- Oktarina, D.A.M., van der Wier, G., Diercks, G.F.H., Jonkman, M.F., Pas, H.H., 2011. IgG-induced clustering of desmogleins 1 and 3 in skin of patients with pemphigus fits with the desmoglein nonassembly depletion hypothesis: Pemphigus deposition patterns. *Br. J. Dermatol.* 165, 552–562. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2011.10463.x>.
- Oray, M., Abu Samra, K., Ebrahimiadib, N., Meese, H., Foster, C.S., 2016. Long-term side effects of glucocorticoids. *Expert Opin. Drug Saf.* 15, 457–465. <https://doi.org/10.1517/14740338.2016.1140743>.
- Ortiz, M.A., Mikhailova, T., Li, X., Porter, B.A., Bah, A., Kotula, L., 2021. Src family kinases, adaptor proteins and the actin cytoskeleton in epithelial-to-mesenchymal transition. *Cell Commun. Signal.* 19, 67. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00750-x>.
- Osada, K., Seishima, M., Kitajima, Y., 1997. Pemphigus IgG activates and translocates protein kinase C from the cytosol to the particulate/cytoskeleton fractions in human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 108, 482–487. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12289726>.
- Pan, M., Liu, X., Zheng, J., 2011. The pathogenic role of autoantibodies in pemphigus vulgaris. *Clin. Exp. Dermatol.* 36, 703–707. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2011.04092.x>.
- Payne, A.S., Ishii, K., Kacir, S., Lin, C., Li, H., Hanakawa, Y., Tsunoda, K., Amagai, M., Stanley, J.R., Siegel, D.L., 2005. Genetic and functional characterization of human pemphigus vulgaris monoclonal autoantibodies isolated by phage display. *J. Clin. Invest.* 115, 888–899. <https://doi.org/10.1172/JCI200524185>.

- Perretti, M., D'Acquisto, F., 2009. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 62–70. <https://doi.org/10.1038/nri2470>.
- Philippeos, C., Hughes, R.D., Dhawan, A., Mitry, R.R., 2012. Introduction to Cell Culture, in: Mitry, R.R., Hughes, R.D. (Eds.), *Human Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 1–13. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-367-7_1.
- Pisanti, S., Sharav, Y., Kaufman, E., Posner, L.N., 1974. Pemphigus vulgaris: Incidence in Jews of different ethnic groups, according to age, sex, and initial lesion. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 38, 382–387. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(74\)90365-X](https://doi.org/10.1016/0030-4220(74)90365-X).
- Pollmann, R., Eming, R., 2017. Research Techniques Made Simple: Mouse Models of Autoimmune Blistering Diseases. *J. Invest. Dermatol.* 137, e1–e6. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.003>.
- Porro, A.M., Seque, C.A., Ferreira, M.C.C., Enokihara, M.M.S. e S., 2019. Pemphigus vulgaris. *An. Bras. Dermatol.* 94, 264–278. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20199011>.
- Pretel, M., España, A., Marquina, M., Pelacho, B., López-Picazo, J.M., López-Zabalza, M.J., 2009. An imbalance in Akt/mTOR is involved in the apoptotic and acantholytic processes in a mouse model of pemphigus vulgaris. *Exp. Dermatol.* 18, 771–780. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2009.00893.x>.
- Puckett, Y., Gabbar, A., Bokhari, A.A., 2022. Prednisone, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Rauch, A., Seitz, S., Baschant, U., Schilling, A.F., Illing, A., Stride, B., Kirilov, M., Mandic, V., Takacz, A., Schmidt-Ullrich, R., Ostermay, S., Schinke, T., Spanbroek, R., Zaiss, M.M., Angel, P.E., Lerner, U.H., David, J.-P., Reichardt, H.M., Amling, M., Schütz, G., Tuckermann, J.P., 2010. Glucocorticoids suppress bone formation by attenuating osteoblast differentiation via the monomeric glucocorticoid receptor. *Cell Metab.* 11, 517–531. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.05.005>.
- Rea, D., van Kooten, C., van Meijgaarden, K.E., Ottenhoff, T.H.M., Melief, C.J.M., Offringa, R., 2000. Glucocorticoids transform CD40-triggering of dendritic cells into an alternative activation pathway resulting in antigen-presenting cells that secrete IL-10. *Blood* 95, 3162–3167. <https://doi.org/10.1182/blood.V95.10.3162>.
- Reichardt, H.M., Kaestner, K.H., Tuckermann, J., Kretz, O., Wessely, O., Bock, R., Gass, P., Schmid, W., Herrlich, P., Angel, P., Schütz, G., 1998. DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* 93, 531–541. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81183-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81183-6).

- Reichardt, H.M., Tuckermann, J.P., Göttlicher, M., Vujic, M., Weih, F., Angel, P., Herrlich, P., Schütz, G., 2001. Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 20, 7168–7173. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.24.7168>.
- Rennick, D., Davidson, N., Berg, D., 1995. Interleukin-10 gene knock-out mice: a model of chronic inflammation. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 76, S174-178. [https://doi.org/10.1016/s0090-1229\(95\)90144-2](https://doi.org/10.1016/s0090-1229(95)90144-2).
- Rock, B., Labib, R.S., Diaz, L.A., 1990. Monovalent Fab' immunoglobulin fragments from endemic pemphigus foliaceus autoantibodies reproduce the human disease in neonatal Balb/c mice. *J. Clin. Invest.* 85, 296–299.
- Rogatsky, I., Wang, J.-C., Derynck, M.K., Nonaka, D.F., Khodabakhsh, D.B., Haqq, C.M., Darimont, B.D., Garabedian, M.J., Yamamoto, K.R., 2003. Target-specific utilization of transcriptional regulatory surfaces by the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 13845–13850. <https://doi.org/10.1073/pnas.2336092100>.
- Roskoski, R., 2015a. A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacol. Res.* 100, 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.07.010>.
- Roskoski, R., 2015b. Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacol. Res.* 94, 9–25. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.01.003>.
- Roskoski, R., 2004a. Src protein–tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324, 1155–1164. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.09.171>.
- Rutella, S., Lemoli, R.M., 2004. Regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells: from basic biology to clinical applications. *Immunol. Lett.* 94, 11–26. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2004.04.015>.
- Saito, M., Stahley, S.N., Caughman, C.Y., Mao, X., Tucker, D.K., Payne, A.S., Amagai, M., Kowalczyk, A.P., 2012. Signaling Dependent and Independent Mechanisms in Pemphigus Vulgaris Blister Formation. *PLoS ONE* 7, e50696. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050696>.
- Samavedam, U.K., Mitschker, N., Kasprick, A., Bieber, K., Schmidt, E., Laskay, T., Recke, A., Goletz, S., Vidarsson, G., Schulze, F.S., Armbrust, M., Schulze Dieckhoff, K., Pas, H.H., Jonkman, M.F., Kalies, K., Zillikens, D., Gupta, Y., Ibrahim, S.M., Ludwig, R.J., 2018. Whole-Genome Expression Profiling in Skin Reveals SYK As a Key Regulator of Inflammation in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita. *Front. Immunol.* 9.

- Sánchez-Carpintero, I., España, A., Pelacho, B., López Moratalla, N., Rubenstein, D.S., Diaz, L.A., López-Zabalza, M.J., 2004. In vivo blockade of pemphigus vulgaris acantholysis by inhibition of intracellular signal transduction cascades. *Br. J. Dermatol.* 151, 565–570. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2004.06147.x>.
- Schiltz, J.R., Hu, C.-H., Michel, B., 1979. Corticosteroids, aurothioglucose and soybean trypsin inhibitor do not prevent pemphigus antibody-induced acantholysis in vitro. *Br. J. Dermatol.* 101, 279–284. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1979.tb05620.x>.
- 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, 208. <https://doi.org/10.3390/vaccines10020208>.
- Schmitt, T., Waschke, J., 2021. Autoantibody-Specific Signalling in Pemphigus. *Front. Med.* 8, 701809. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.701809>.
- Schneider, M.R., Werner, S., Paus, R., Wolf, E., 2008. Beyond Wavy Hairs: The Epidermal Growth Factor Receptor and Its Ligands in Skin Biology and Pathology. *Am. J. Pathol.* 173, 14–24. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070942>.
- Schroeder, H.W., Cavacini, L., 2010. Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S41–S52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>.
- Schulze, K., Galichet, A., Sayar, B.S., Scothern, A., Howald, D., Zymann, H., Siffert, M., Zenhäusern, D., Bolli, R., Koch, P.J., Garrod, D., Suter, M.M., Müller, E.J., 2012. An adult passive transfer mouse model to study desmoglein 3 signaling in pemphigus vulgaris. *J. Invest. Dermatol.* 132, 346–355. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.299>.
- Sekiguchi, M., Futei, Y., Fujii, Y., Iwasaki, T., Nishikawa, T., Amagai, M., 2001. Dominant Autoimmune Epitopes Recognized by Pemphigus Antibodies Map to the N-Terminal Adhesive Region of Desmogleins. *J. Immunol.* 167, 5439–5448. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.9.5439>.
- Sharma, P., Mao, X., Payne, A.S., 2007. Beyond steric hindrance: The role of adhesion signaling pathways in the pathogenesis of pemphigus. *J. Dermatol. Sci.* 48, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2007.05.005>.
- Shen, K., Hines, A.C., Schwarzer, D., Pickin, K.A., Cole, P.A., 2005. Protein kinase structure and function analysis with chemical tools. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* 1754, 65–78. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.08.020>.

- Sorrells, S.F., Sapolsky, R.M., 2007. An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain. Behav. Immun.* 21, 259–272. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.11.006>.
- Spies, C.M., Strehl, C., van der Goes, M.C., Bijlsma, J.W.J., Buttgereit, F., 2011. Glucocorticoids. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 25, 891–900. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2011.11.002>.
- 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 Ca(2+)-induced differentiation: a role in suprabasal epidermal skin splitting? *Am. J. Pathol.* 179, 1905–1916. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.06.043>.
- Stanley, J.R., Amagai, M., 2006. Pemphigus, Bullous Impetigo, and the Staphylococcal Scalded-Skin Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 355, 1800–1810. <https://doi.org/10.1056/NEJMra061111>.
- Strehl, C., Ehlers, L., Gaber, T., Buttgereit, F., 2019. Glucocorticoids—All-Rounders Tackling the Versatile Players of the Immune System. *Front. Immunol.* 10, 1744. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01744>.
- Swanson, D.L., Dahl, M.V., 1983. Methylprednisolone Inhibits Pemphigus Acantholysis in Skin Cultures. *J. Invest. Dermatol.* 81, 258–260. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12518278>.
- Taylor, S.S., Radzio-Andzelm, E., Hunter, T., 1995. How do protein kinases discriminate between serine/threonine and tyrosine? Structural insights from the insulin receptor protein-tyrosine kinase. *FASEB J.* 9, 1255–1266. <https://doi.org/10.1096/fasebj.9.13.7557015>.
- Thiessen, Bernardo, Seitz, William, 1976. Prednisolone. *J. Am. Pharm. Assoc.* 1961 16, 143–146. [https://doi.org/10.1016/S0003-0465\(16\)33514-5](https://doi.org/10.1016/S0003-0465(16)33514-5).
- Todorović, V., Desai, B.V., Patterson, M.J.S., Amargo, E.V., Dubash, A.D., Yin, T., Jones, J.C.R., Green, K.J., 2010. Plakoglobin regulates cell motility through Rho- and fibronectin-dependent Src signaling. *J. Cell Sci.* 123, 3576–3586. <https://doi.org/10.1242/jcs.070391>.
- Tsang, S.M., Brown, L., Gadmor, H., Gammon, L., Fortune, F., Wheeler, A., Wan, H., 2012. Desmoglein 3 acting as an upstream regulator of Rho GTPases, Rac-1/Cdc42 in the regulation of actin organisation and dynamics. *Exp. Cell Res.* 318, 2269–2283. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.07.002>.
- Tsunoda, K., Ota, T., Aoki, M., Yamada, T., Nagai, T., Nakagawa, T., Koyasu, S., Nishikawa, T., Amagai, M., 2003a. Induction of Pemphigus Phenotype by a Mouse Monoclonal Antibody Against the Amino-Terminal Adhesive Interface of Desmoglein 3. *J. Immunol.* 170, 2170–2178. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.4.2170>.

- van Beek, N., Dähnrich, C., Johannsen, N., Lemcke, S., Goletz, S., Hübner, F., Di Zenzo, G., Dmochowski, M., Drenovska, K., Geller, S., Horn, M., Kowalewski, C., Medenica, L., Murrell, D.F., Patsatsi, A., Uzun, S., Vassileva, S., Zillikens, D., Schlumberger, W., Schmidt, E., 2017. Prospective studies on the routine use of a novel multivariant enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of autoimmune bullous diseases. *J. Am. Acad. Dermatol.* 76, 889-894.e5. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2016.11.002>.
- van der Goes, M.C., Jacobs, J.W., Bijlsma, J.W., 2014. The value of glucocorticoid co-therapy in different rheumatic diseases - positive and adverse effects. *Arthritis Res. Ther.* 16, S2. <https://doi.org/10.1186/ar4686>.
- van der Wier, G., Pas, H.H., Jonkman, M.F., 2010a. Experimental Human Cell and Tissue Models of Pemphigus. *Dermatol. Res. Pract.* 2010, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2010/143871>.
- Vandewalle, J., Luybaert, A., De Bosscher, K., Libert, C., 2018. Therapeutic Mechanisms of Glucocorticoids. *Trends Endocrinol. Metab.* 29, 42–54. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.10.010>.
- Vettorazzi, S., Bode, C., Dejager, L., Frappart, L., Shelest, E., Kläßen, C., Tasdogan, A., Reichardt, H.M., Libert, C., Schneider, M., Weih, F., Henriette Uhlenhaut, N., David, J.-P., Gräler, M., Kleiman, A., Tuckermann, J.P., 2015. Glucocorticoids limit acute lung inflammation in concert with inflammatory stimuli by induction of SphK1. *Nat. Commun.* 6, 7796. <https://doi.org/10.1038/ncomms8796>.
- Walter, E., Vielmuth, F., Rotkopf, L., Sárdy, M., Horváth, O.N., Goebeler, M., Schmidt, E., Eming, R., Hertl, M., Spindler, V., Waschke, J., 2017. Different signaling patterns contribute to loss of keratinocyte cohesion dependent on autoantibody profile in pemphigus. *Sci. Rep.* 7, 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. *Front. Immunol.* 10, 1128. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01128>.
- Waschke, J., Spindler, V., Bruggeman, P., Zillikens, D., Schmidt, G., Drenckhahn, D., 2006. Inhibition of Rho A activity causes pemphigus skin blistering. *J. Cell Biol.* 175, 721–727. <https://doi.org/10.1083/jcb.200605125>.
- Williamson, L., Raess, N.A., Caldelari, R., Zakher, A., de Bruin, A., Posthaus, H., Bolli, R., Hunziker, T., Suter, M.M., Müller, E.J., 2006. Pemphigus vulgaris identifies plakoglobin as key suppressor of c-Myc in the skin. *EMBO J.* 25, 3298–3309. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601224>.

Zillikens, D., Schmidt, E., Reimer, S., Chimanovitch, I., Hardt-Weinelt, K., Rose, C., Bröcker, E.B., Kock, M., Boehncke, W.H., 2001. Antibodies to desmogleins 1 and 3, but not to BP180, induce blisters in human skin grafted onto SCID mice. *J. Pathol.* 193, 117–124. [https://doi.org/10.1002/1096-9896\(2000\)9999:9999::AID-PATH742>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1096-9896(2000)9999:9999::AID-PATH742>3.0.CO;2-W).

Quellen aus Büchern

Moll, I. (2016). *Duale Reihe Dermatologie*. 8. Auflage. Thieme-Verlag, Stuttgart.
https://eref.thieme.de/ebooks/1278819?context=search&fromSearch=true#/ebook_1278819_SL54808686 (Letzter Zugriff am 24.09.21).

Sterry, W. (2018). *Kurzlehrbuch Dermatologie*. 2. Auflage. Thieme-Verlag, Stuttgart.
https://eref.thieme.de/ebooks/2251711?context=search&fromSearch=true#/ebook_2251711_SL84814956 (Letzter Zugriff am 24.09.21).

Sterry, W. (2014). *Checkliste Dermatologie*. 7. Auflage. Thieme-Verlag, Stuttgart.
https://eref.thieme.de/ebooks/932963#/ebook_932963_SL35929798 (Letzter Zugriff am 24.09.21).

Internetquellen

AWMF-S2k-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Pemphigus vulgaris / foliaceus und des bullösen Pemphigoids“. AWMF-Register-Nr.: 013-071, 2019. Stand 21.06.2019.

<https://register.awmf.org/de/leitlinien/detail/013-071> (Letzter Zugriff am 09.10.21).

https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf (Letzter Zugriff am 28.09.21).

<https://next.amboss.com/de/article/A40RNT?q=topische+glucocorticoide+bei+atopischer+dermatitis#Zf06c9193b5e979c7c04f08abc7617554> (Letzter Zugriff am 28.10.21).

https://viamedici.thieme.de/lernmodul/549651/subject/biochemie/immunsystem/adaptive+immunantwort/antikörper#_5A777480_71B3_40D9_AE18_1715324EB7E6 (Letzter Zugriff am 28.09.21).

https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Clobetasol_21720 (Letzter Zugriff am 28.10.21).

https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Prednisolon_76 (Letzter Zugriff am 28.10.21).

<https://www.selleckchem.com/products/AZD0530.html> (Letzter Zugriff am 10.10.22).

<https://www.selleckchem.com/products/kx2-391.html> (Letzter Zugriff am 10.10.22).

<https://www.selleckchem.com/products/pf-573228.html> (Letzter Zugriff am 10.10.22).

<https://www.selleckchem.com/products/pp2.html> (Letzter Zugriff am 10.10.22).

<https://www.selleckchem.com/products/prt062607-p505-15-hcl.html> (Letzter Zugriff am 10.10.22).

<https://www.selleckchem.com/products/rk-24466.html> (Letzter Zugriff am 10.10.22).

<https://www.selleckchem.com/products/su6656.html> (Letzter Zugriff am 10.10.22).

10 Anhang

10.1 Ethikantrag



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Herrn
PD Dr. med. Tobias Fischer
Klinik für Dermatologie und Venerologie

im Hause

Ethik-Kommission

Vorsitzender:

Herr Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe

Stellv. Vorsitzender:

Herr Prof. Dr. med. F. Gieseler

Universität zu Lübeck

Ratzeburger Allee 160

23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann

Tel.: +49 451 500 4639

Fax: +49 451 500 3026

janine.erdmann@medizin.uni-luebeck.de

Aktenzeichen: 06-109

Datum: 15. März 2012

In-vitro-Untersuchung der Biologie des humanen Haarfollikels in bezug auf Wachstumseigenschaften, Apoptose, Wachstumsregulation, Pigmentierung und Immunprivileg im Haarorgankulturmodell

Hier: Amendment 2 –Ihr Schreiben vom 13. März 2012

Sehr geehrter Herr Dr. Fischer,

das Amendment bezüglich der Nutzung von Haut aus anderen behaarten Arealen mit den folgenden Unterlagen habe ich zustimmend zur Kenntnis genommen:

- Aufklärung und Einwilligung sowie
- Studienprotokoll.

Es bedarf keiner weiteren Begutachtung durch die Kommission.

Bitte beachten Sie folgenden Hinweis: Die Haarproben können nur vernichtet werden, wenn diese in pseudonymisierter Form vorliegen.


Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Prüfung und der an der Prüfung teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß und besten Wünschen
für den weiteren Verlauf Ihrer Forschung bin ich
Ihr


A handwritten signature in black ink, appearing to read 'H. Raspe'.

Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Vorsitzender


10.2 Poster



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK



Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie



Center for Research on Inflammation of the Skin

Investigation of intracellular kinase activity in pemphigus vulgaris using a human skin organ culture and cell culture model

F. Frischmann¹, B. Naumann¹, C. Osterloh¹, C. Hammers^{1,2}, R. J. Ludwig^{1,2}, J. E. Hundt¹

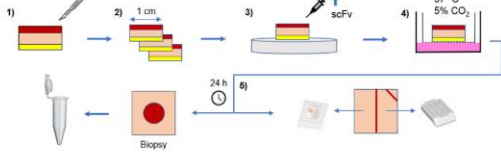
¹ University of Lübeck, Lübeck Institute of Experimental Dermatology (LIED), 23564 Lübeck, Germany
² University hospital of Lübeck, Department of Dermatology, 23564 Lübeck, Germany

Introduction

Pemphigus vulgaris (PV) is an autoimmune skin blistering disease. Autoantibodies against desmoglein (Dsg)1 and Dsg3 are formed, leading to acantholysis in the skin and mucous membranes. This is very painful and potentially life-threatening for patients and has a huge impact on their quality of life. Treatment options are mainly limited to systemic cortisone therapy and a few others, mostly immune suppression therapy. For more extensive and specific treatment, new therapeutic targets need to be identified. In this work, the activity of kinases in PV was investigated in an ex vivo human skin organ culture (HSOC) model by using the PamGene technology. Eight kinases with significantly increased activity were detected. The results were validated by inhibiting these kinases in a keratinocyte dissociation assay (KDA) to determine, if this strengthens cell adhesion.³

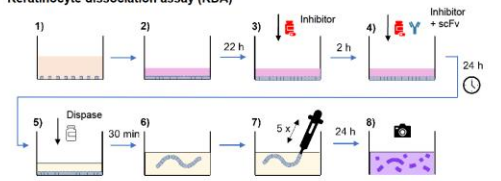
Methods

Human skin organ culture (HSOC) model

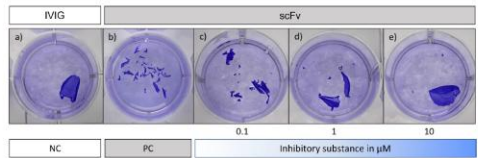


- 1) For the HSOC, healthy skin from elective surgeries was used.
- 2) It was cut in squares of 1 x 1 cm with all three skin layers remaining.
- 3) 45 µg of an anti-dsg1/3 single chain variable fragment (scFv) was injected into the skin samples, which leads to intraepidermal split formation. As a negative control, non-pathogenic intravenous immune globulin G (IVIg) was injected.
- 4) The skin was incubated on a 6-well-plate for 24 h at 37 °C and 5 % CO₂.
- 5) After incubation the skin was used for the measurement of the kinase activity (biopsy) or for histological and immunohistological stainings (cut in half).

Keratinocyte dissociation assay (KDA)



- 1) For the KDA, keratinocytes were grown on the bottom of a 12-well-plate.
- 2) When the cells were close to 100 % confluency, the low calcium (Ca²⁺) keratinocyte growth medium was changed to high Ca²⁺ medium, which induces the formation of desmosomes between the cells.
- 3) After 22 h of incubation (37 °C / 5 % CO₂) the kinase inhibitors were added to the cells.
- 4) After 2 h of incubation the scFv was added to the inhibitor on the cells.
- 5) After 24 h of incubation disperse was added to the cells for 30 min.
- 6) The disperse detached the cells from the bottom of the well as a monolayer.
- 7) Mechanical stress was applied to the monolayer by pipetting it up and down for 5 times.
- 8) The monolayer fell apart into fragments, which were stained and photographed from above.

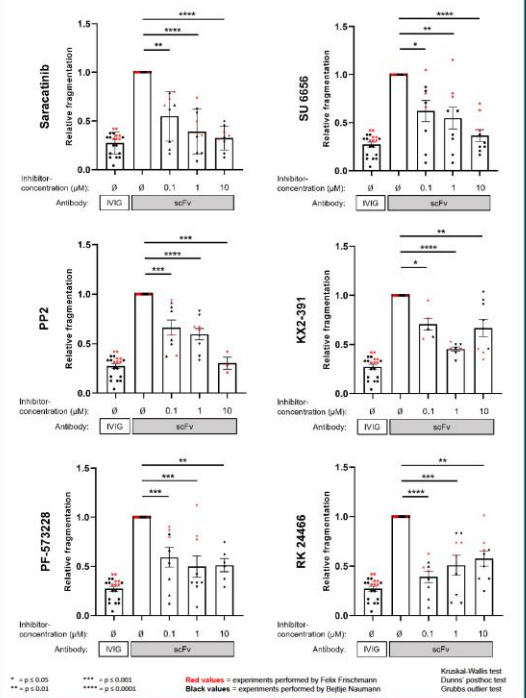


With normal cell adhesion, the monolayer remains largely as one single piece after applying the mechanical stress, shown in negative control (NC). If cell adhesion is disturbed by scFv, the monolayer falls apart into many fragments, shown in positive control (PC). The next step was to find out, if the inhibition of the kinases that were detected, prevent the keratinocytes from dissociation in the assay. Therefore, each inhibitor was tested in a concentration of 0.1, 1 and 10 µM. For the evaluation of the experiment, every fragment in the wells was counted as 1, independent from its size.

Results

Name of kinase	Name of inhibited kinase(s)	Name of kinase-inhibitor
Src	Src	KX2-391
Fyn	Lck	RK 24466
Lck	Lck / Fyn	PP2
Yes	Fyn / Lck / Yes	SU 6656
HCK	Src Pan (whole Src – family)	Saracatinib
Syk	FAK1 / FAK2	PF-573228
FAK1	Syk	PRT062607 *
FAK2		

a) Names of kinases with significantly increased activity in the scFv treated skin.
b) Name of kinase inhibitor and which kinases are inhibited by it (Compounds selected individually from the company Selleckchem). * = Inhibitor not shown in graphs below.



Relative fragmentation vs. Inhibitor concentration (µM). Antibody: IVIG, scFv. Legend: Red values = experiments performed by Felix Frischmann; Black values = experiments performed by Nadja Naumann; Kuskal-Wallis test; Durbin posthoc test; Dunnett posthoc test.

Conclusion

- The measurement of the kinase activity in the HSOC identified 8 kinases with significantly increased activity in the scFv treated skin
- All kinase inhibitors that were tested in the KDA, except one, reduced the fragmentation of the keratinocyte monolayer significantly in different concentrations.
- These promising inhibitors will be further validated and their effect more closely studied.

References:

1. Kasperkiewicz et al. (2017). Pemphigus. DOI: 10.1038/np.2017.26
2. Poma et al. (2019). Pemphigus vulgaris. DOI: 10.1093/bio/abz044.20190911
3. Brumsted et al. (2020). Identification of novel therapeutic targets for treating acantholysis in pemphigus. DOI: 10.1111/hps.13233
4. Selleckchem – Bioactive Compound Expert (Selleckchem.com, last used 2nd February 2022)



UNIVERSITÄTSKLINIKUM
Sollberg-Hausen



gates universität lübeck



CLINICAL RESEARCH UNIT 303
Translational Research in Chronic Inflammation
and Auto-inflammatory Diseases



Precision Medicine
in Chronic Inflammation

IM FOCUS DAS LEBEN

10.3 Rohdaten der Ergebnisse der PamGene-Messung

In den folgenden Tabellen und Grafiken werden die PamGene-Rohdaten aller im direkten Vergleich gemessenen Hautproben gelistet. Dabei werden Protein-Tyrosin-Kinasen und Serin-Threonin-Kinasen auf verschiedenen Datenblättern geführt.

10.3.1 Protein-Tyrosin-Kinasen

Tabellarische Darstellung der Rohdaten für alle Protein-Tyrosin-Kinasen im direkten Vergleich zwei verschiedener Proben.

Negativkontrolle vs. Positivkontrolle

Kinase Uniprot ID	Kinase Name	Mean Specificity Score	Mean Significance Score	Mean Final Score	Mean Kinase Statistic	Mean Peptide Set Size
H0Y8A4	RYK	0,144072984	0,388063234	0,532136218	0,266697691	6,444444444
O60674	JAK2	0,094535872	0,34471128	0,439247153	0,293684758	14,44444444
P00519	Abl	0,254603587	0,458731074	0,713334661	0,372190783	42,77777778
P00533	EGFR	0,016647669	0,353072279	0,369719948	0,268086731	36,44444444
P04626	HER2	0,169435902	0,427771603	0,597207505	0,341096494	24,44444444
P04629	TRKA	0,624053234	0,539745878	1,163799112	0,46022016	10,88888889
P06213	InSR	0,837818867	0,617803809	1,455622676	0,456185989	19,55555556
P06239	Lck	1,442262818	0,536281565	1,978544384	0,486399281	26,88888889
P06241	Fyn	1,78932275	0,598553261	2,387876011	0,564537877	13,44444444
P07332	Fes	0,01296543	0,193404461	0,206369891	0,153015346	11,88888889
P07333	FmS/CSFR	0,191102671	0,483210355	0,674313026	0,320873913	7,888888889
P07947	Yes	1,06981727	0,547024419	1,616841689	0,484843219	20,88888889
P07948	Lyn	0,794965083	0,541704342	1,336669426	0,454859119	18
P07949	Ret	0,280480066	0,446175598	0,726655664	0,359107152	14,11111111
P08069	IGF1R	0,151535872	0,433952851	0,585488724	0,317404543	13,44444444
P08581	Met	0,103571588	0,381270553	0,484842141	0,32385308	24,11111111
P08631	HCK	1,561238678	0,575891583	2,13713026	0,508781177	21,66666667
P09619	PDGFR[beta]	0,106670871	0,387565842	0,494236713	0,293142925	11,11111111
P09769	Fgr	0,619153817	0,60110674	1,220260557	0,492916286	6,66666667
P10721	Kit	0,584793843	0,596011406	1,18080525	0,453052933	11,88888889
P11362	FGFR1	0,24355666	0,347821178	0,591377838	0,346319103	11
P12931	Src	1,675606526	0,525677954	2,20128448	0,489494415	32,11111111
P14616	IRR	0,113083831	0,288501927	0,401585758	0,220751376	4,2
P16234	PDGFR[alpha]	0,327387433	0,565310428	0,89269786	0,414612999	5
P16591	Fer	0,093133223	0,285890628	0,379023851	0,255608826	9,55555556
P17948	FLT1	0,006314395	0,259869625	0,266184019	0,104032992	13,66666667
P21709	EphA1	0,418158001	0,464956313	0,883114315	0,398494694	4,2
P21802	FGFR2	0,807621027	0,518731702	1,326352729	0,512087848	7,857142857
P21860	HER3	0,507115261	0,486117157	0,993232418	0,405523911	35,77777778
P22455	FGFR4	0,441390527	0,48249436	0,923884887	0,431415609	13,33333333
P22607	FGFR3	0,763197225	0,513049195	1,27624642	0,50825698	7,16666667
P23458	JAK1~b	0,063551144	0,162689155	0,226240299	0,177595623	4

Anhang

P29317	EphA2	0,083273391	0,252782891	0,336056283	0,215117887	5,125
P29322	EphA8	0,308038486	0,410166666	0,718205151	0,428330419	3
P29376	LTK	0,435260493	0,486795369	0,922055863	0,398586319	13
P30530	Axl	0,837934187	0,510403107	1,348337293	0,424000676	46,77777778
P35916	FLT4	0,023878656	0,26175246	0,285631116	0,149583195	12,22222222
P35968	KDR	0,005456329	0,332884398	0,338340727	0,158283939	16,11111111
P36888	FLT3	0,048194731	0,280982487	0,329177217	0,202116631	9,375
P41240	CSK	0,216962625	0,437528359	0,654490984	0,36413208	32
P42679	CTK	0,811663656	0,509699018	1,321362675	0,446185136	24,22222222
P42680	TEC	0,110615426	0,353816919	0,464432345	0,327960107	30,66666667
P42681	TXK	0,1431515	0,405700598	0,548852097	0,334937451	24
P42684	Arg	0,249479779	0,453440094	0,702919873	0,368151753	41,44444444
P42685	FRK	0,425612047	0,427940317	0,853552364	0,394016931	43,22222222
P43403	ZAP70	0,880952991	0,487760299	1,36871329	0,423544099	48,33333333
P43405	Syk	1,439878374	0,503352565	1,943230939	0,438838428	58,11111111
P51451	BLK	0,911070754	0,529484069	1,440554823	0,474402235	20,11111111
P51813	Etk/BMX	0,120551536	0,351550793	0,472102329	0,324268572	22,55555556
P54756	EphA5	0,420216403	0,455931956	0,876148359	0,480520906	3
P54764	EphA4	0,317781442	0,493010202	0,810791645	0,438267189	3
Q04912	Ron	0,255441758	0,368561605	0,624003363	0,360276743	6,44444444
Q05397	FAK1	1,04179346	0,527063769	1,568857229	0,455429563	31,77777778
Q06187	BTK	0,08278824	0,326922412	0,409710652	0,278090011	16,22222222
Q06418	Tyro3/Sky	0,335923218	0,459764342	0,79568756	0,381605709	34,22222222
Q08345	DDR1	0,182320927	0,334581008	0,516901936	0,344042854	3
Q08881	ITK	0,03172235	0,313205357	0,344927707	0,269491198	26,77777778
Q12866	Mer	0,132917836	0,418786903	0,55170474	0,34581451	39,88888889
Q13882	Brk	0,098966716	0,395022826	0,493989542	0,343439613	49,66666667
Q14289	FAK2	1,510733686	0,625249903	2,135983589	0,497158151	23,66666667
Q15303	HER4	0,164149799	0,382851982	0,547001781	0,315183826	23,11111111
Q16288	TRKC	0,493152344	0,527873462	1,021025806	0,42775015	14,11111111
Q16620	TRKB	0,469433547	0,505873089	0,975306636	0,419239984	16,55555556
Q9H3Y6	Srm	0,073084785	0,339755358	0,412840143	0,322140398	34,33333333
Q9UM73	ALK	0,679409577	0,50113511	1,180544687	0,424474118	33,44444444

Positivkontrolle vs. Prednisolon-Behandlung

Kinase Uniprot ID	Kinase Name	Mean Specificity Score	Mean Significance Score	Mean Final Score	Mean Kinase Statistic	Mean Peptide Set Size
H0Y8A4	RYK	0,115093488	0,050893766	0,165987254	-0,028865603	6,44444444
O60674	JAK2	0,227094483	0,065626862	0,292721345	-0,082946617	14,44444444
P00519	Abl	0,585278068	0,135599781	0,720877849	-0,120507495	42,77777778
P00533	EGFR	0,065146814	0,055867992	0,121014806	0,041289071	36,44444444
P04626	HER2	0,104153849	0,05418762	0,158341469	0,006523339	24,44444444
P04629	TRKA	0,247463373	0,12641191	0,373875284	-0,095207053	10,88888889
P06213	InSR	0,390171179	0,114942464	0,505113642	-0,113711372	19,55555556
P06239	Lck	1,306914986	0,164471332	1,471386318	-0,179561895	26,88888889

Anhang

P06241	Fyn	1,195577405	0,209321824	1,404899229	-0,214814051	13,44444444
P07332	Fes	0,22825027	0,093980379	0,322230649	0,086724351	11,88888889
P07333	FmS/CSFR	0,075377978	0,037017112	0,11239509	-0,037905179	7,88888889
P07947	Yes	0,451698509	0,128744902	0,580443411	-0,126121266	20,88888889
P07948	Lyn	0,520984893	0,12400128	0,644986172	-0,132080081	18
P07949	Ret	0,170431755	0,066456496	0,236888251	0,017511109	14,11111111
P08069	IGF1R	0,115022614	0,045242969	0,160265583	-0,036040954	13,44444444
P08581	Met	0,029573242	0,021035976	0,050609219	0,002999115	24,11111111
P08631	HCK	0,628139054	0,137821473	0,765960527	-0,129824619	21,66666667
P09619	PDGFR[beta]	0,385029867	0,127046863	0,512076729	-0,121134644	11,11111111
P09769	Fgr	0,355513025	0,127235976	0,482749002	-0,144310695	6,66666667
P10721	Kit	0,168511807	0,069337681	0,237849487	-0,074563091	11,88888889
P11362	FGFR1	0,18090322	0,074618596	0,255521816	0,019799524	11
P12931	Src	1,488148697	0,167040168	1,655188866	-0,177795038	32,11111111
P14616	IRR	0,159976424	0,125676657	0,28565308	-0,085829642	4,2
P16234	PDGFR[alpha]	0,044503247	0,0207752	0,065278448	-0,028261516	5
P16591	Fer	0,241676226	0,079805673	0,321481899	0,066886702	9,55555556
P17948	FLT1	1,10957043	0,283952172	1,393522601	0,202122742	13,66666667
P21709	EphA1	0,321098049	0,157321507	0,478419556	-0,0744405686	4,2
P21802	FGFR2	0,676361708	0,174146725	0,850508433	-0,188535848	7,857142857
P21860	HER3	0,13767717	0,07862018	0,21629735	-0,0676659	35,77777778
P22455	FGFR4	0,321918547	0,114233166	0,436151713	-0,118730839	13,33333333
P22607	FGFR3	0,587279791	0,166294513	0,753574304	-0,183775756	7,16666667
P23458	JAK1~b	0,683455879	0,243185642	0,926641521	0,245467626	4
P29317	EphA2	0,239717434	0,148022187	0,387739621	-0,084656052	5,125
P29322	EphA8	0,63707684	0,273291901	0,910368741	-0,264992618	3
P29376	LTK	0,248694438	0,087268414	0,335962852	-0,064988954	13
P30530	Axl	0,19284944	0,080768481	0,273617921	-0,085814256	46,77777778
P35916	FLT4	0,062614431	0,026049518	0,08866395	0,030200962	12,22222222
P35968	KDR	0,107788994	0,035911023	0,143700017	-0,048017401	16,11111111
P36888	FLT3	0,18473823	0,064054879	0,248793109	0,06689091	9,375
P41240	CSK	0,367046989	0,118458222	0,48550521	-0,10832141	32
P42679	CTK	0,28130223	0,099556008	0,380858238	-0,098231246	24,22222222
P42680	TEC	0,254948007	0,088339937	0,343287944	-0,086970825	30,66666667
P42681	TXK	0,033875738	0,02744943	0,061325168	-0,027978349	24
P42684	Arg	0,190107043	0,095846897	0,28595394	-0,082347559	41,44444444
P42685	FRK	0,217364705	0,086813176	0,304177881	-0,087438368	43,22222222
P43403	ZAP70	0,179627215	0,082498738	0,262125953	-0,082279033	48,33333333
P43405	Syk	0,297629113	0,097246766	0,394875878	-0,095935351	58,11111111
P51451	BLK	0,790671483	0,154123618	0,944795101	-0,160420945	20,11111111
P51813	Etk/BMX	0,210938087	0,07974705	0,290685137	-0,077161082	22,55555556
P54756	EphA5	0,420216403	0,236572006	0,65678841	-0,21598298	3
P54764	EphA4	0,176550785	0,102714026	0,279264811	-0,10770438	3
Q04912	Ron	0,297460406	0,115933162	0,413393568	-0,117462193	6,44444444
Q05397	FAK1	0,175949996	0,083999873	0,259949869	-0,078329699	31,77777778
Q06187	BTK	0,059774816	0,022133169	0,081907985	0,007792975	16,22222222
Q06418	Tyro3/Sky	0,226464092	0,081855573	0,308319665	-0,082579397	34,22222222
Q08345	DDR1	0,40559671	0,19980286	0,60539957	-0,208140421	3

Anhang

Q08881	ITK	0,02454463	0,023460628	0,048005259	-0,011027288	26,77777778
Q12866	Mer	0,081682046	0,062146189	0,143828235	-0,05796369	39,88888889
Q13882	Brk	0,002917765	0,012126751	0,015044516	-0,019912245	49,66666667
Q14289	FAK2	0,178939282	0,069372765	0,248312047	-0,071047211	23,66666667
Q15303	HER4	0,243013398	0,093733691	0,336747089	0,029367483	23,11111111
Q16288	TRKC	0,242447667	0,097030992	0,339478659	-0,083061994	14,11111111
Q16620	TRKB	0,312885721	0,108605676	0,421491398	-0,10029489	16,55555556
Q9H3Y6	Srm	0,040081465	0,031548514	0,071629979	-0,033859548	34,33333333
Q9UM73	ALK	0,067452924	0,047872281	0,115325205	-0,048866805	33,44444444

Negativkontrolle vs. Prednisolon-Behandlung

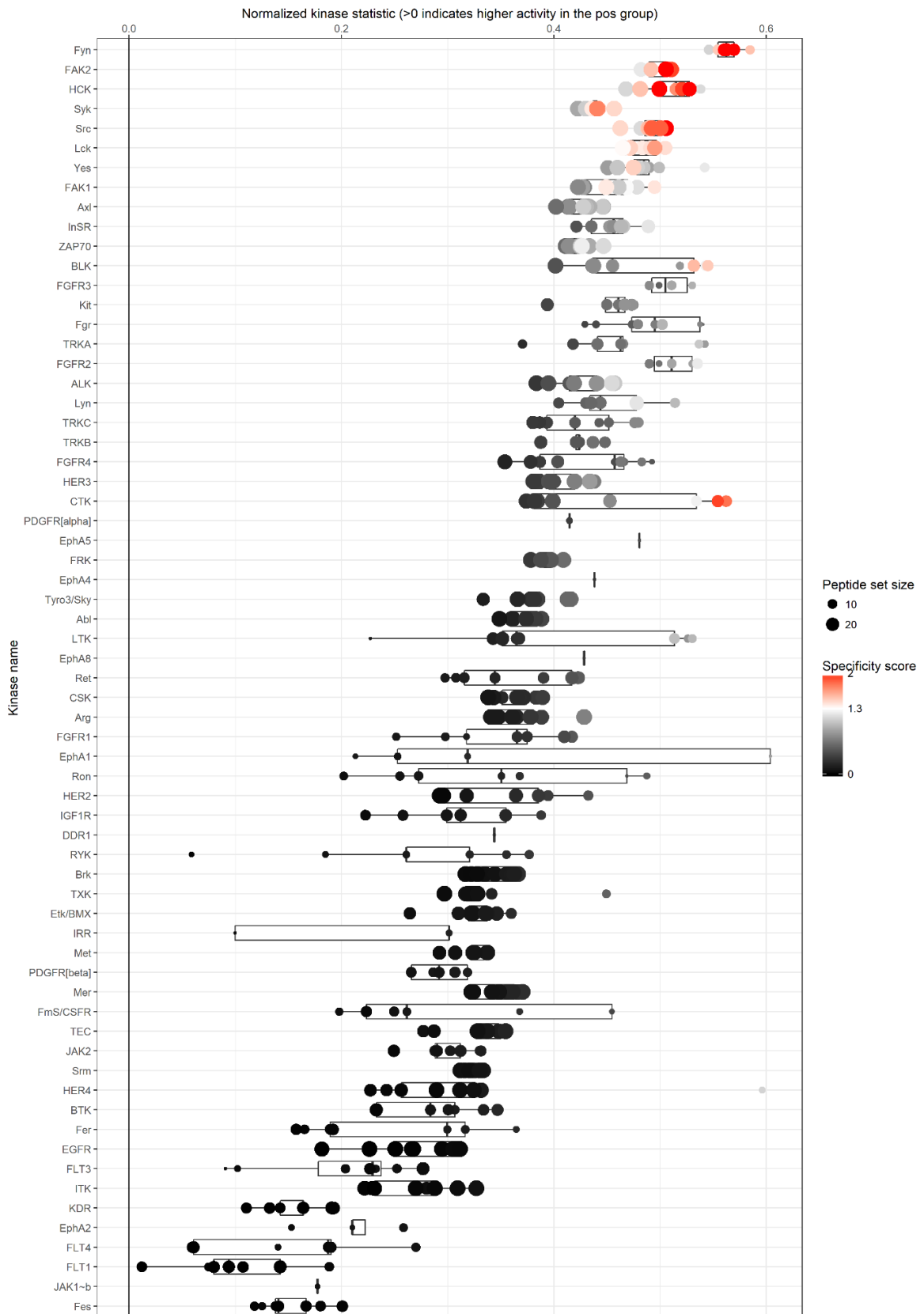
Kinase Uniprot ID	Kinase Name	Mean Specificity Score	Mean Significance Score	Mean Final Score	Mean Kinase Statistic	Mean Peptide Set Size
HOY8A4	RYK	0,079733607	0,140229114	0,219962721	0,110540284	6,444444444
O60674	JAK2	0,073110811	0,143265242	0,216376052	0,144036424	14,44444444
P00519	Abl	0,073757793	0,197965785	0,271723578	0,184421776	42,77777778
P00533	EGFR	0,490424092	0,30304117	0,793465262	0,234275864	36,44444444
P04626	HER2	0,85741703	0,322056208	1,179473237	0,271665991	24,44444444
P04629	TRKA	0,55096475	0,312502128	0,863466879	0,267191572	10,88888889
P06213	InSR	0,561125022	0,286339938	0,847464959	0,254760302	19,55555556
P06239	Lck	0,410707163	0,226222339	0,636929501	0,234357349	26,88888889
P06241	Fyn	0,556332026	0,241626104	0,79795813	0,257510189	13,44444444
P07332	Fes	0,158739517	0,175056093	0,33379561	0,179559032	11,88888889
P07333	Fms/CSFR	0,172346562	0,200435952	0,372782514	0,1764649	7,888888889
P07947	Yes	0,948804681	0,294253688	1,243058369	0,288096331	20,88888889
P07948	Lyn	0,327745161	0,222417262	0,550162422	0,224174419	18
P07949	Ret	0,671241176	0,308966015	0,98020719	0,279582144	14,11111111
P08069	IGF1R	0,16905344	0,207321135	0,376374575	0,187695064	13,44444444
P08581	Met	0,426811281	0,254282301	0,681093581	0,238024314	24,11111111
P08631	HCK	0,954422576	0,318056454	1,272479029	0,292799561	21,66666667
P09619	PDGFR[beta]	0,08006335	0,150423403	0,230486753	0,131996827	11,11111111
P09769	Fgr	0,424226264	0,270174116	0,69440038	0,251339155	6,666666667
P10721	Kit	0,712390205	0,302880334	1,01527054	0,285762459	11,88888889
P11362	FGFR1	0,769979678	0,301359784	1,071339462	0,304029878	11
P12931	Src	0,460169967	0,22244302	0,682612988	0,236442545	32,11111111
P14616	IRR	0,063396501	0,120529374	0,183925875	-0,00138863	4,2
P16234	PDGFR[alpha]	0,643179697	0,332351269	0,975530965	0,313712189	5
P16591	Fer	0,467791742	0,274200894	0,741992636	0,262891325	9,555555556
P17948	FLT1	0,398367116	0,35030764	0,748674757	0,231672296	13,66666667
P21709	EphA1	0,24816631	0,210457403	0,458623713	0,183045335	4,2
P21802	FGFR2	0,390973351	0,215197576	0,606170927	0,249184678	7,857142857
P21860	HER3	0,848487822	0,286973424	1,135461246	0,262458896	35,77777778
P22455	FGFR4	0,369744993	0,234923965	0,604668957	0,239030179	13,33333333

Anhang

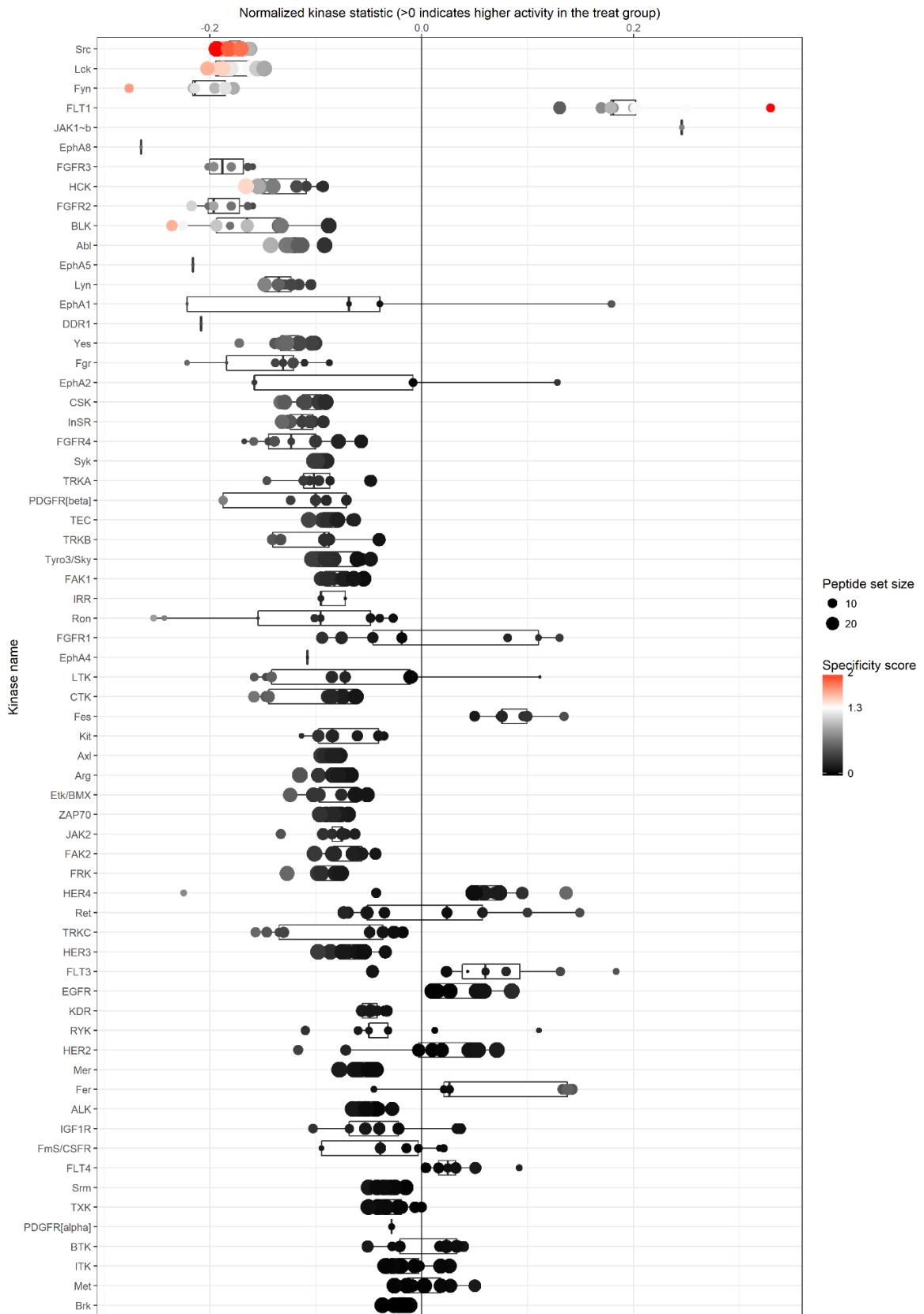
P22607	FGFR3	0,38310817	0,219316264	0,602424434	0,249819465	7,166666667
P23458	JAK1~b	0,768584304	0,367585878	1,136170182	0,351918163	4
P29317	EphA2	0,048371887	0,081052209	0,129424096	0,021591489	5,125
P29322	EphA8	0,044803071	0,053832466	0,098635537	0,070649895	3
P29376	LTK	0,509294529	0,2610566	0,770351129	0,259450907	13
P30530	Axl	1,293219886	0,277998918	1,571218805	0,27086207	46,77777778
P35916	FLT4	0,090581697	0,148530727	0,239112425	0,127691866	12,22222222
P35968	KDR	0,005454323	0,081445409	0,086899732	0,065919859	16,11111111
P36888	FLT3	0,277403905	0,247354727	0,524758632	0,209239742	9,375
P41240	CSK	0,237567638	0,224582437	0,462150075	0,209765031	32
P42679	CTK	0,909500985	0,281923273	1,191424258	0,281558833	24,22222222
P42680	TEC	0,124617799	0,18800537	0,312623169	0,189482676	30,66666667
P42681	TXK	0,462768735	0,262766289	0,725535024	0,246993916	24
P42684	Arg	0,235092561	0,227874712	0,462967273	0,212362767	41,44444444
P42685	FRK	0,6090588	0,237606126	0,846664926	0,240579584	43,22222222
P43403	ZAP70	1,26744188	0,279489801	1,546931681	0,268499343	48,33333333
P43405	Syk	2,074775007	0,281320631	2,356095638	0,273427213	58,11111111
P51451	BLK	0,406068974	0,232040717	0,638109691	0,237765355	20,11111111
P51813	Etk/BMX	0,120240374	0,183476352	0,303716726	0,17756366	22,55555556
P54756	EphA5	0,226213555	0,173925197	0,400138752	0,205010255	3
P54764	EphA4	0,394615713	0,276229073	0,670844786	0,268814189	3
Q04912	Ron	0,140910458	0,143883325	0,284793784	0,155589199	6,44444444
Q05397	FAK1	1,490526758	0,309354569	1,799881327	0,292638263	31,77777778
Q06187	BTK	0,248344432	0,228954897	0,477299329	0,209730615	16,22222222
Q06418	Tyro3/Sky	0,512825014	0,242105065	0,754930079	0,238778216	34,22222222
Q08345	DDR1	0,066617124	0,08311583	0,149732954	0,099642423	3
Q08881	ITK	0,16453653	0,196578871	0,361115401	0,193813111	26,77777778
Q12866	Mer	0,352160054	0,246351707	0,59851176	0,225957186	39,88888889
Q13882	Brk	1,161266537	0,280907894	1,442174431	0,258227899	49,66666667
Q14289	FAK2	2,277035999	0,392508487	2,669544486	0,353001173	23,66666667
Q15303	HER4	0,890641451	0,303639116	1,194280567	0,250622349	23,11111111
Q16288	TRKC	0,437136581	0,27222714	0,709363721	0,238542609	14,11111111
Q16620	TRKB	0,423453661	0,251002606	0,674456267	0,235950188	16,55555556
Q9H3Y6	Srm	0,329007669	0,225452895	0,554460564	0,224739433	34,33333333
Q9UM73	ALK	1,489585899	0,317375926	1,806961825	0,294127332	33,44444444

Grafische Darstellung aller Protein-Tyrosin-Kinasen zwei verschiedener Proben im Vergleich.

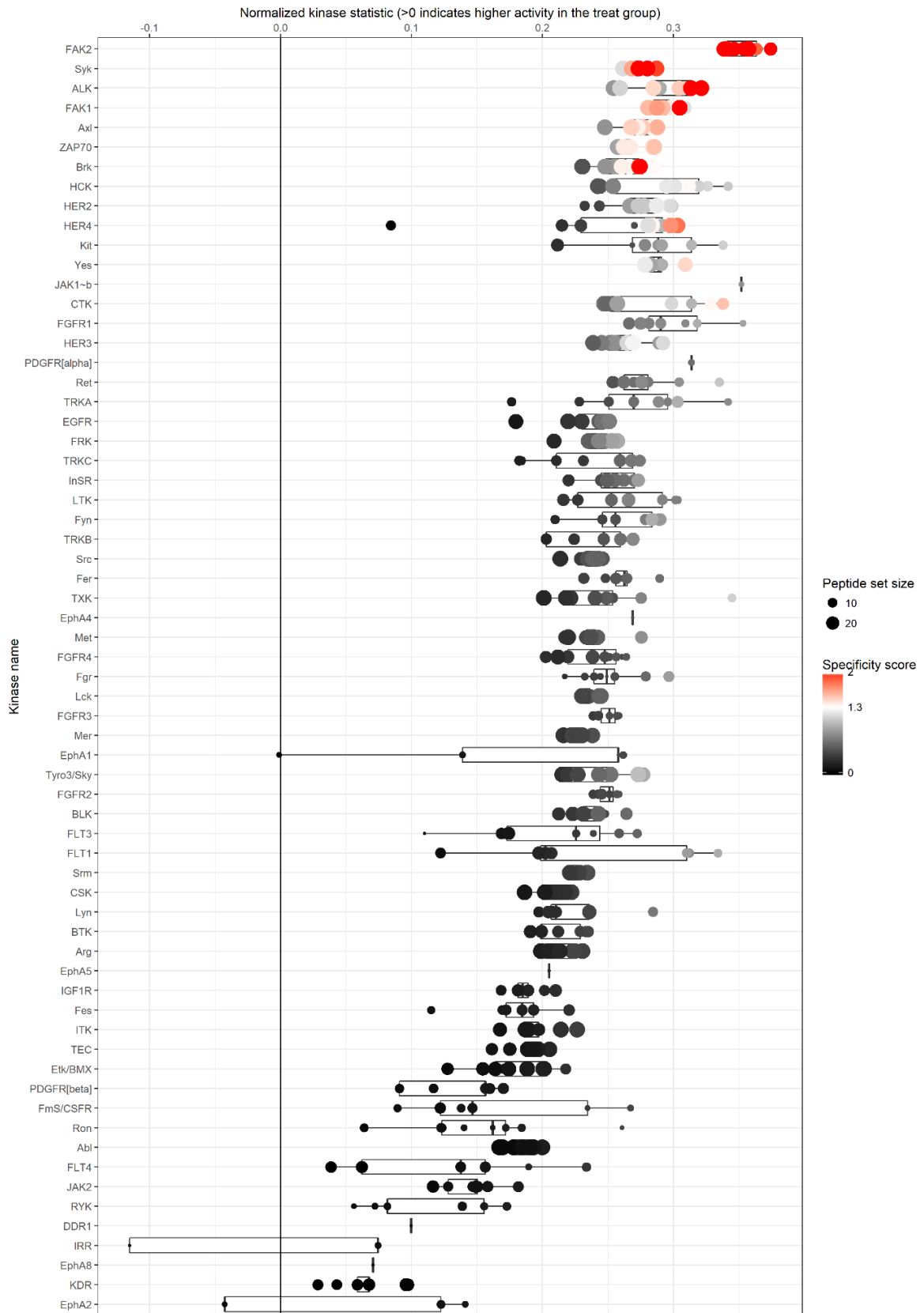
Negativkontrolle vs. Positivkontrolle



Positivkontrolle vs. Prednisolon-Behandlung



Negativkontrolle vs. Prednisolon-Behandlung



10.3.2 Serin-Threonin-Kinasen

Tabellarische Darstellung der Rohdaten für alle Serin-Threonin-Kinasen im direkten Vergleich zwei verschiedener Proben.

Negativkontrolle vs. Positivkontrolle

Kinase Uniprot ID	Kinase Name	Mean Specificity Score	Mean Significance Score	Mean Final Score	Mean Kinase Statistic	Mean Peptide Set Size
O00141	SGK1	0,71607156	0,61893836	1,33500992	-0,3707022	3
O14757	CHK1	1,58118771	0,76403822	2,34522593	-0,3990131	10
O14920	IKK[beta]	0,49643677	0,53998524	1,03642201	-0,2805204	3,2
O14965	AurA/Aur2	0,34315648	0,25683789	0,59999437	-0,2056717	5,11111111
O15075	DCAMKL1	0,9500091	0,49187591	1,44188501	-0,3835087	4,5
O15111	IKK[alpha]	0,10532601	0,11080408	0,21613009	-0,0792313	3
O15264	p38[delta]	1,38309951	0,47941043	1,86250993	-0,3232209	17,2222222
O15530	PDK1	0,03009243	0,03418498	0,06427741	-0,0244558	3
O43293	DAPK3	0,906189	0,63996626	1,54615526	-0,4150971	3,11111111
O43930	PRKY	0,72704765	0,35382464	1,08087228	-0,2663973	10,6666667
O60285	NuaK1	1,43919068	0,79269969	2,23189037	-0,4313874	5,16666667
O75116	ROCK2	0,13865304	0,1339049	0,27255794	-0,1036638	4,2
O75582	MSK1	0,12461183	0,13782684	0,26243867	-0,1053034	8
O75676	MSK2	0,09561905	0,09907353	0,19469258	-0,0698553	3
O76039	CDKL5	1,13185274	0,58308837	1,7149411	-0,3861575	5,625
O94921	PFTAIRE1	0,35076371	0,36092724	0,71169095	-0,2165443	3
O95819	HGK/ZC1	1,42710007	0,75965634	2,18675641	-0,4482083	5,71428571
O96017	CHK2	0,82532514	0,43065578	1,25598092	-0,2593003	20,1111111
P04049	RAF1	0,84888782	0,46139522	1,31028304	-0,3358667	6,33333333
P05129	PKC[gamma]	0,31031332	0,23824258	0,5485559	-0,1854904	13,6666667
P05771	PKC[beta]	0,44697391	0,29027829	0,7372522	-0,2235414	10
P06493	CDC2/CDK1	1,97685973	0,66170306	2,63856278	-0,3666838	16,6666667
P10398	ARAF	0,57728378	0,35978093	0,93706471	-0,3239068	3
P11309	Pim1	0,3717468	0,25025711	0,62200391	-0,1892758	61,7777778
P11802	CDK4	1,20369416	0,79557853	1,99927269	-0,3850002	7,11111111
P15056	BRAF	0,68949917	0,46235956	1,15185873	-0,3483924	3,33333333
P16066	ANP[alpha]	1,70609615	0,53679026	2,24288641	-0,3112313	24,2222222
P17252	PKC[alpha]	0,01757478	0,104272	0,12184677	-0,0900338	29,2222222
P17612	PKA[alpha]	0,02173164	0,16147561	0,18320725	-0,131013	52,4444444
P23443	p70S6K	1,38228716	0,45352489	1,83581205	-0,3095739	17,4444444
P24723	PKC[eta]	0,27545546	0,20664447	0,48209994	-0,1749864	13,4444444
P24941	CDK2	2,06536661	0,69422668	2,75959329	-0,3751811	17,5555556
P27361	ERK1	2,55441112	0,71563782	3,27004893	-0,3855768	21,7777778
P28482	ERK2	2,43138779	0,69944475	3,13083254	-0,3702803	21
P31749	Akt1/PKB[alpha]	0,12176196	0,18001628	0,30177824	-0,1368319	27,5555556
P31751	Akt2/PKB[beta]	0,10995886	0,17278074	0,2827396	-0,1328106	25,6666667
P41279	COT	0,54320064	0,42961465	0,97281529	-0,2770362	5
P41743	PKC[iota]	0,34765198	0,24375322	0,5914052	-0,194511	15,2222222

Anhang

P42345	mTOR/FRAP	0,5325893	0,30816825	0,84075754	-0,2710015	4,88888889
P45983	JNK1	2,28114528	0,60346312	2,88460841	-0,3315969	26,4444444
P45984	JNK2	1,32111579	0,53264038	1,85375617	-0,2981612	20,7777778
P48729	CK1[alpha]	1,71746604	0,83547592	2,55294195	-0,3875231	12,2222222
P48730	CK1[delta]	0,49636582	0,70222148	1,19858731	-0,2788262	3,25
P49137	MAPKAPK2	0,83572092	0,43389791	1,26961883	-0,2420482	30,3333333
P49674	CK1[epsilon]	0,50208668	0,61217656	1,11426324	-0,2723958	3,88888889
P49840	GSK3[alpha]	1,5664594	0,93809144	2,50455084	-0,501087	4,66666667
P49841	GSK3[beta]	1,54351996	0,77300093	2,31652089	-0,4589727	5,88888889
P50613	CDK7	0,67678877	0,42988466	1,10667343	-0,2613622	13
P50750	CDK9	1,34741607	1,04984746	2,39726354	-0,3816305	8,66666667
P51812	RSK2	0,30507371	0,27439683	0,57947054	-0,1904259	9
P51817	PRKX	0,12914613	0,19778865	0,32693478	-0,1487652	31,1111111
P53355	DAPK1	0,69723974	0,89492103	1,59216077	-0,3471158	3
P53778	p38[gamma]	1,07943556	0,50121272	1,58064828	-0,3314578	9,7777778
P53779	JNK3	2,17511834	0,58859321	2,76371155	-0,3289655	25,8888889
P68400	CK2[alpha]1	0,07933306	0,09751534	0,1768484	-0,0665852	4,88888889
Q00526	CDK3	1,39099523	0,64995965	2,04095488	-0,3242792	13
Q00532	CDKL1	0,56577247	0,34120515	0,90697762	-0,275597	5,8
Q00534	CDK6	0,71075785	0,56469539	1,27545325	-0,3157524	5,88888889
Q00535	CDK5	2,37072084	1,1614654	3,53218624	-0,4579071	10
Q00537	PCTAIRE2	1,01495873	0,61492413	1,62988286	-0,4484453	3,2
Q02156	PKC[epsilon]	0,21173523	0,20830289	0,42003812	-0,160409	18,5555556
Q04759	PKC[theta]	0,11797994	0,16363607	0,28161601	-0,1357502	21
Q05513	PKC[zeta]	0,35367627	0,24231991	0,59599619	-0,2027584	9,55555556
Q05655	PKC[delta]	0,03216657	0,10307481	0,13524139	-0,0908475	21,7777778
Q13131	AMPK[alpha]1	0,26765157	0,20650504	0,47415661	-0,1675741	10,7777778
Q13153	PAK1	0,76027177	0,40747677	1,16774853	-0,3191212	6
Q13164	ERK5	2,06244442	0,70086922	2,76331364	-0,4234	12
Q13237	PKG2	0,0445391	0,1393574	0,1838965	-0,1195263	36,1111111
Q13464	ROCK1	0,69434919	0,41367031	1,10801949	-0,3115111	4,71428571
Q13535	ATR	0,93660293	0,62269938	1,55930231	-0,3129438	9,88888889
Q13627	DYRK1A	1,11268378	0,62378255	1,73646634	-0,4762331	3
Q13976	PKG1	0,00673468	0,10263201	0,10936669	-0,0856238	39,6666667
Q14164	IKK[epsilon]	0,96966746	0,48517347	1,45484093	-0,3060293	7
Q15118	PDHK1	0,12604179	0,12442056	0,25046235	0,09519282	3
Q15131	CDK10	0,26462952	0,23265843	0,49728795	-0,1685572	6,11111111
Q15139	PKD1	0,11421127	0,12444846	0,23865974	-0,0910587	6
Q15349	RSK1/p90RSK	0,12146004	0,11367554	0,23513558	-0,0970313	6
Q15418	RSK3	0,37033785	0,25423283	0,62457067	-0,205561	10
Q15759	p38[beta]	0,91976288	0,54340867	1,46317155	-0,3663801	5,66666667
Q16512	PKN1/PRK1	0,96092339	0,57482307	1,53574646	-0,354203	6,88888889
Q16539	MAPK14	2,17314848	0,8164278	2,98957628	-0,4160932	13,8888889
Q16566	CaMK4	0,04806921	0,06764449	0,1157137	-0,047097	12,3333333
Q16644	MAPKAPK3	1,10346311	0,43532471	1,53878782	-0,2560674	35,2222222
Q86V86	Pim3	0,39497772	0,25699665	0,65197437	-0,1923973	59,6666667
Q8IWB6	Sgk307	1,26533814	0,70409047	1,9694286	-0,4509358	4,44444444
Q8NI60	ADCK3	0,69654441	0,34885772	1,04540213	-0,2596561	9,55555556

Anhang

Q8TD08	ERK7	1,02687215	1,04575749	2,07262964	-0,4010519	4
Q92772	CDKL2	0,20832618	0,13709483	0,34542101	-0,1390197	3,33333333
Q96GD4	AurB/Aur1	0,28499312	0,22900172	0,51399484	-0,173263	5,11111111
Q96L96	AlphaK1	0,5425075	0,37374842	0,91625592	-0,2869994	3,66666667
Q96Q40	PFTAIRE2	0,4531023	0,44781668	0,90091899	-0,2367726	6,88888889
Q96S38	RSKL1	0,62210539	0,51011472	1,13222011	-0,3347456	3
Q9BWU1	CDK11	0,92004193	1,05800209	1,97804402	-0,4000317	4
Q9HBY8	SGK2	0,94979657	0,44999622	1,39979279	-0,2947191	15,7777778
Q9P1W9	Pim2	0,24821885	0,23389635	0,4821152	-0,1782639	41
Q9UBS0	p70S6K[beta]	0,11506297	0,17063491	0,28569788	-0,1348158	25
Q9UHD2	TBK1	1,20730729	0,76928273	1,97659001	-0,4276284	4,88888889
Q9UIK4	DAPK2	0,95206292	0,52883224	1,48089516	-0,3713859	4,88888889
Q9UKE5	TNIK/ZC2	0,66282825	0,40669536	1,06952361	-0,34427	3
Q9UPZ9	ICK	0,62525223	0,49250732	1,11775955	-0,3394656	3,33333333
Q9Y6S9	RSKL2	0,30674354	0,23498109	0,54172463	-0,191401	3,5

Positivkontrolle vs. Prednisolon-Behandlung

Kinase Uniprot ID	Kinase Name	Mean Specificity Score	Mean Significance Score	Mean Final Score	Mean Kinase Statistic	Mean Peptide Set Size
O00141	SGK1	0,56594817	0,40240953	0,9683577	0,30109133	3
O14757	CHK1	0,44403881	0,26786777	0,71190658	0,15887708	10
O14920	IKK[beta]	0,09670231	0,11665311	0,21335542	-0,0675193	3,2
O14965	AurA/Aur2	0,03373845	0,01736157	0,05110002	0,01532344	5,11111111
O15075	DCAMKL1	0,1895167	0,08830072	0,27781742	0,10869579	4,5
O15111	IKK[alpha]	0,80918067	0,43838012	1,24756079	-0,3847735	3
O15264	p38[delta]	0,85526982	0,29625567	1,15152549	0,2166326	17,2222222
O15530	PDK1	0,00632362	0,00642279	0,01274641	-0,0056296	3
O43293	DAPK3	0,16063264	0,15201893	0,31265157	0,10928632	3,11111111
O43930	PRKY	0,86926031	0,3006548	1,16991511	0,24927373	10,6666667
O60285	NuaK1	0,49286271	0,34070583	0,83356854	0,17988822	5,16666667
O75116	ROCK2	0,06211942	0,05115886	0,11327828	0,00357099	4,2
O75582	MSK1	0,17771938	0,11218774	0,28990713	0,08442933	8
O75676	MSK2	0,11154776	0,09550669	0,20705445	-0,0800406	3
O76039	CDKL5	1,19888295	0,47752296	1,67640592	0,38818747	5,625
O94921	PFTAIRE1	0,44762487	0,35745354	0,8050784	-0,2505139	3
O95819	HGK/ZC1	0,63875901	0,33256117	0,97132018	0,24287732	5,71428571
O96017	CHK2	0,15658922	0,08675223	0,24334145	0,06668446	20,1111111
P04049	RAF1	0,65319535	0,29275773	0,94595309	0,24009591	6,33333333
P05129	PKC[gamma]	0,12930081	0,07772255	0,20702336	0,05652063	13,6666667
P05771	PKC[beta]	0,18262749	0,08812471	0,27075221	0,08125331	10
P06493	CDC2/CDK1	1,84322166	0,4546875	2,29790916	0,31711072	16,6666667
P10398	ARAF	0,41864004	0,25211366	0,67075369	0,2343444	3
P11309	Pim1	0,3830851	0,14815027	0,53123537	0,1146995	61,7777778
P11802	CDK4	0,65422709	0,32702697	0,98125406	0,23211513	7,11111111
P15056	BRAF	0,48682449	0,30183616	0,78866065	0,24933613	3,33333333

Anhang

P16066	ANP[alpha]	1,89812772	0,43474484	2,33287257	0,27216074	24,2222222
P17252	PKC[alpha]	0,01282174	0,01299209	0,02581383	0,00392782	29,2222222
P17612	PKA[alpha]	0,01524379	0,05272358	0,06796738	0,03998931	52,4444444
P23443	p70S6K	1,18599905	0,31906246	1,50506152	0,2263485	17,4444444
P24723	PKC[eta]	0,12119275	0,05330681	0,17449956	0,01877914	13,4444444
P24941	CDK2	1,05241534	0,35051373	1,40292907	0,23804497	17,5555556
P27361	ERK1	1,18093713	0,38129525	1,56223238	0,23260411	21,7777778
P28482	ERK2	1,30305989	0,41029474	1,71335463	0,2453571	21
P31749	Akt1/PKB[alpha]	0,12770588	0,05848838	0,18619426	0,05855824	27,5555556
P31751	Akt2/PKB[beta]	0,26862345	0,11410762	0,38273107	0,10057847	25,6666667
P41279	COT	0,81309963	0,42193003	1,23502966	0,3038313	5
P41743	PKC[iota]	0,20813362	0,09371785	0,30185146	0,08313432	15,2222222
P42345	mTOR/FRAP	0,82726142	0,4872742	1,31453562	0,31878726	4,8888889
P45983	JNK1	1,01917065	0,29264299	1,31181364	0,20347604	26,4444444
P45984	JNK2	0,55419445	0,22519826	0,77939271	0,16118955	20,7777778
P48729	CK1[alpha]	0,77575257	0,4174245	1,19317707	0,2222885	12,2222222
P48730	CK1[delta]	0,10007324	0,07026694	0,17034019	-0,0634378	3,25
P49137	MAPKAPK2	0,39279959	0,16933334	0,56213292	0,12506097	30,3333333
P49674	CK1[epsilon]	0,10321845	0,08788244	0,19110089	-0,0455348	3,8888889
P49840	GSK3[alpha]	0,88332096	0,47874601	1,36206697	0,33335363	4,6666667
P49841	GSK3[beta]	1,05030655	0,49943267	1,54973922	0,34316073	5,8888889
P50613	CDK7	0,98070737	0,35540575	1,33611311	0,25162934	13
P50750	CDK9	0,6068447	0,39069596	0,99754065	0,2117405	8,6666667
P51812	RSK2	0,37622176	0,18297872	0,55920048	0,14703852	9
P51817	PRKX	0,10417029	0,0650641	0,1692344	0,05536973	31,1111111
P53355	DAPK1	0,04059704	0,04003127	0,08062831	-0,027031	3
P53778	p38[gamma]	0,5218288	0,23739959	0,75922839	0,18509565	9,7777778
P53779	JNK3	1,02034078	0,29341127	1,31375205	0,20542594	25,8888889
P68400	CK2[alpha]1	0,56664872	0,38174059	0,94838932	-0,250691	4,8888889
Q00526	CDK3	0,5905205	0,26878481	0,85930531	0,18323395	13
Q00532	CDKL1	0,41208593	0,21476369	0,62684962	0,17171173	5,8
Q00534	CDK6	0,4271229	0,29471738	0,72184028	0,1857979	5,8888889
Q00535	CDK5	0,65908607	0,33485128	0,99393735	0,21110387	10
Q00537	PCTAIRE2	0,74032037	0,42132301	1,16164339	0,35001347	3,2
Q02156	PKC[epsilon]	0,10118752	0,05198028	0,1531678	0,04442206	18,5555556
Q04759	PKC[theta]	0,10293007	0,06194231	0,16487239	0,04754058	21
Q05513	PKC[zeta]	0,10489327	0,06767374	0,17256701	0,05417605	9,5555556
Q05655	PKC[delta]	0,01545138	0,01483382	0,03028519	-0,0056418	21,7777778
Q13131	AMPK[alpha]1	0,12288741	0,07270208	0,1955895	0,03213996	10,7777778
Q13153	PAK1	0,57369609	0,25370472	0,8274008	0,22806355	6
Q13164	ERK5	1,3078858	0,36644313	1,67432892	0,29097797	12
Q13237	PKG2	0,01775777	0,02595547	0,04371323	-0,0103229	36,1111111
Q13464	ROCK1	0,4223404	0,23316775	0,65550815	0,19243362	4,71428571
Q13535	ATR	1,36906775	0,74063026	2,10969801	0,32810686	9,8888889
Q13627	DYRK1A	0,45730002	0,3765178	0,83381782	0,2574338	3
Q13976	PKG1	0,01157808	0,01711546	0,02869353	-0,0121557	39,6666667
Q14164	IKK[epsilon]	0,41472302	0,21763864	0,63236166	0,14845073	7
Q15118	PDHK1	0,8968427	0,57306162	1,46990431	-0,4023026	3

Anhang

Q15131	CDK10	0,21239202	0,13286701	0,34525902	-0,100487	6,11111111
Q15139	PKD1	0,06701458	0,04132542	0,10834	-0,0384438	6
Q15349	RSK1/p90RSK	0,01533326	0,00759957	0,02293282	-0,0090338	6
Q15418	RSK3	0,34565306	0,15326233	0,4989154	0,13624521	10
Q15759	p38[beta]	0,5968049	0,39697559	0,99378049	0,25582821	5,66666667
Q16512	PKN1/PRK1	0,22979041	0,11982481	0,34961523	0,10346028	6,88888889
Q16539	MAPK14	0,47884802	0,26721796	0,74606598	0,16185348	13,8888889
Q16566	CaMK4	0,11196463	0,06340993	0,17537456	-0,0534564	12,33333333
Q16644	MAPKAPK3	0,69542004	0,22029832	0,91571837	0,15861367	35,2222222
Q86V86	Pim3	0,40236045	0,15646841	0,55882886	0,11628473	59,6666667
Q8IWB6	Sgk307	1,28332622	0,67195967	1,9552859	0,42891782	4,44444444
Q8NI60	ADCK3	0,85150243	0,34155759	1,19306002	0,2350435	9,55555556
Q8TD08	ERK7	0,20901152	0,30103	0,51004152	0,13461143	4
Q92772	CDKL2	0,0998758	0,06727395	0,16714975	0,07380986	3,33333333
Q96GD4	AurB/Aur1	0,11993169	0,06921637	0,18914806	0,0599209	5,11111111
Q96L96	AlphaK1	0,26522911	0,201606	0,46683511	0,13998942	3,66666667
Q96Q40	PFTAIRES2	0,15564128	0,13159318	0,28723447	-0,0782638	6,88888889
Q96S38	RSKL1	0,11558441	0,11319995	0,22878436	0,08000253	3
Q9BWU1	CDK11	1,00823998	0,53407314	1,54231313	0,39488918	4
Q9HBY8	SGK2	0,82126676	0,33149949	1,15276625	0,23322327	15,7777778
Q9P1W9	Pim2	0,10347162	0,08249999	0,18597162	0,06678234	41
Q9UBS0	p70S6K[beta]	0,18456208	0,09474348	0,27930555	0,07920087	25
Q9UHD2	TBK1	0,68593506	0,4165209	1,10245597	0,27390136	4,88888889
Q9UIK4	DAPK2	0,41410769	0,26306684	0,67717453	0,18667143	4,88888889
Q9UKE5	TNIK/ZC2	0,43906746	0,24839508	0,68746255	0,24074038	3
Q9UPZ9	ICK	0,42641451	0,32083446	0,74724897	0,2284773	3,33333333
Q9Y6S9	RSKL2	0,32207138	0,24571894	0,56779031	0,18268451	3,5

Negativkontrolle vs. Prednisolon-Behandlung

Kinase Uniprot ID	Kinase Name	Mean Specificity Score	Mean Significance Score	Mean Final Score	Mean Kinase Statistic	Mean Peptide Set Size
O00141	SGK1	0,03507556	0,04026804	0,07534361	-0,0193491	3
O14757	CHK1	1,4779063	0,74507838	2,22298468	-0,2282591	10
O14920	IKK[beta]	0,80003852	1,32488591	2,12492443	-0,2844471	3,2
O14965	AurA/Aur2	0,9535074	0,41584973	1,36935713	-0,2505243	5,11111111
O15075	DCAMKL1	1,66991772	0,50732894	2,17724667	-0,3756227	4,5
O15111	IKK[alpha]	1,36308526	0,63670611	1,99979137	-0,4207236	3
O15264	p38[delta]	0,13216978	0,04816814	0,18033791	-0,0207551	17,2222222
O15530	PDK1	0,32544341	0,31032761	0,63577102	-0,1287302	3
O43293	DAPK3	0,82518951	0,82447331	1,64966283	-0,2891477	3,11111111
O43930	PRKY	0,16322292	0,055805	0,21902792	0,03917434	10,6666667
O60285	NuaK1	0,80539274	0,43087591	1,23626865	-0,2218711	5,16666667
O75116	ROCK2	0,05114908	0,02991217	0,08106125	-0,0194932	4,2
O75582	MSK1	0,4731181	0,19555545	0,66867355	0,12033802	8
O75676	MSK2	0,30872549	0,16568525	0,47441074	-0,1207451	3

Anhang

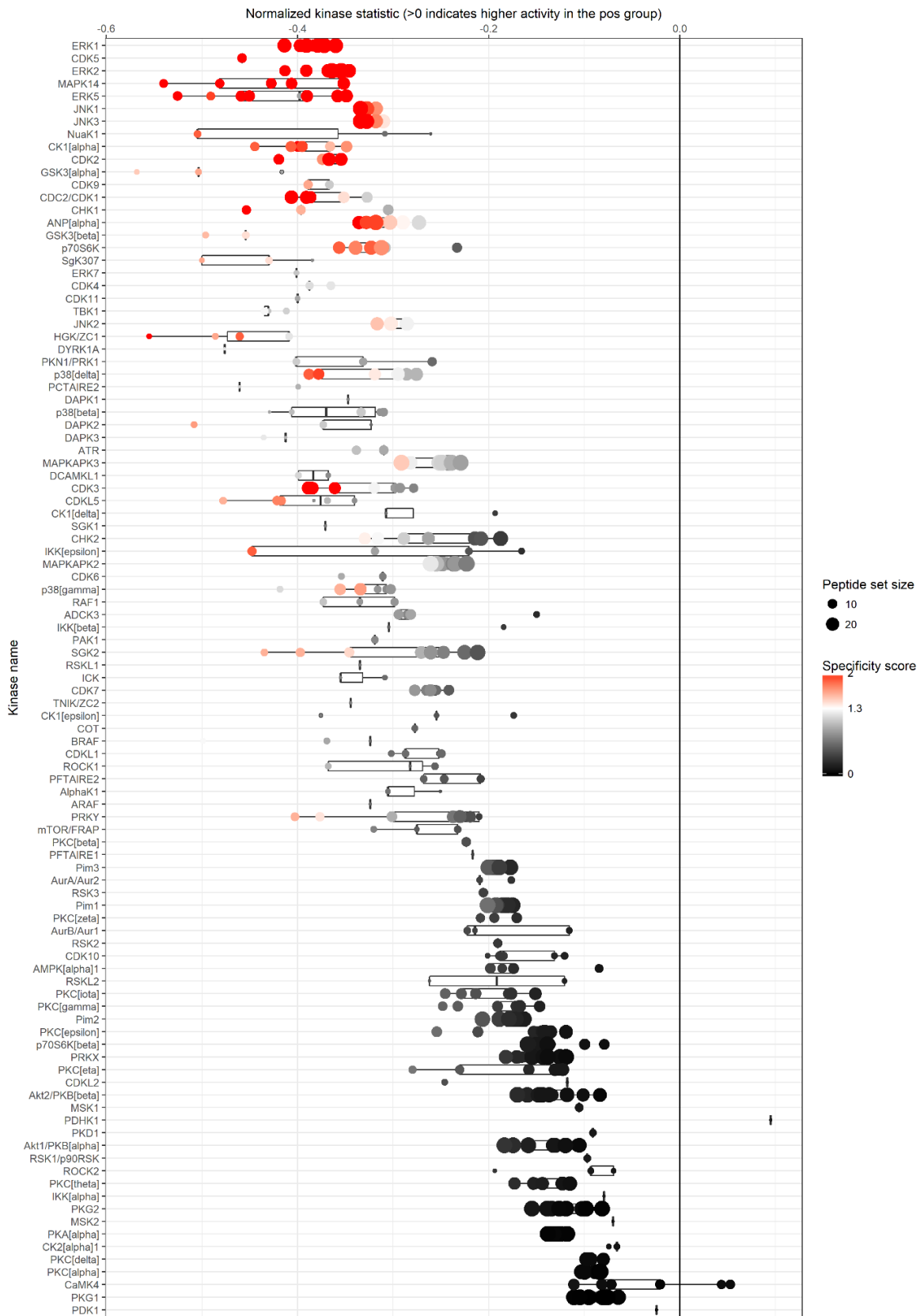
O76039	CDKL5	0,31082207	0,1231242	0,43394627	0,01163659	5,625
O94921	PFTAIRE1	1,26452457	0,62268361	1,88720818	-0,3960361	3
O95819	HGK/ZC1	0,59480005	0,37120486	0,96600491	-0,1570118	5,71428571
O96017	CHK2	1,05142651	0,21083004	1,26225655	-0,1263097	20,11111111
P04049	RAF1	0,16923789	0,05948004	0,22871793	0,05565756	6,33333333
P05129	PKC[gamma]	0,67137895	0,14758704	0,81896599	-0,1161555	13,66666667
P05771	PKC[beta]	0,59019205	0,14960975	0,73980179	-0,1250948	10
P06493	CDC2/CDK1	0,10695014	0,03796302	0,14491316	-0,0058665	16,66666667
P10398	ARAF	0,46917674	0,29946593	0,76864267	0,18142446	3
P11309	Pim1	0,14021328	0,00832735	0,14854063	-0,0132777	61,77777778
P11802	CDK4	0,49462834	0,22942612	0,72405447	-0,1265364	7,11111111
P15056	BRAF	0,37783161	0,25239233	0,63022394	0,14862813	3,33333333
P16066	ANP[alpha]	0,09405418	0,02187046	0,11592463	0,01710202	24,22222222
P17252	PKC[alpha]	0,43460041	0,08017636	0,51477677	-0,0548888	29,22222222
P17612	PKA[alpha]	0,33662637	0,04345749	0,38008386	-0,0302145	52,44444444
P23443	p70S6K	0,23483396	0,05653051	0,29136447	-0,018469	17,44444444
P24723	PKC[eta]	0,82897273	0,16306211	0,99203484	-0,1345337	13,44444444
P24941	CDK2	0,6918972	0,20646135	0,89835855	-0,1031655	17,55555556
P27361	ERK1	0,64937628	0,1491313	0,79850758	-0,0779489	21,77777778
P28482	ERK2	0,45092109	0,12966411	0,5805852	-0,0542042	21
P31749	Akt1/PKB[alpha]	0,06266585	0,01850394	0,08116979	0,0028221	27,55555556
P31751	Akt2/PKB[beta]	0,42789869	0,07402179	0,50192048	0,05797853	25,66666667
P41279	COT	0,15352529	0,06205123	0,21557652	0,05524752	5
P41743	PKC[iota]	0,20294065	0,07015533	0,27309598	-0,0422671	15,22222222
P42345	mTOR/FRAP	0,33557069	0,13913478	0,47470547	0,10962005	4,88888889
P45983	JNK1	0,91458014	0,17804025	1,09262039	-0,0965446	26,44444444
P45984	JNK2	0,94976004	0,22632484	1,17608488	-0,1127263	20,77777778
P48729	CK1[alpha]	0,84900104	0,27045226	1,11945329	-0,1318904	12,22222222
P48730	CK1[delta]	0,84514773	0,51886068	1,36400841	-0,2885538	3,25
P49137	MAPKAPK2	0,957939	0,17384511	1,13178411	-0,0926609	30,33333333
P49674	CK1[epsilon]	0,9664673	0,49263766	1,45910496	-0,2843323	3,88888889
P49840	GSK3[alpha]	0,51847254	0,2441439	0,76261644	-0,1664383	4,66666667
P49841	GSK3[beta]	0,44765331	0,19139317	0,63904648	-0,132087	5,88888889
P50613	CDK7	0,32539559	0,08793801	0,4133336	0,06883794	13
P50750	CDK9	0,93852047	0,49644517	1,43496564	-0,1831203	8,66666667
P51812	RSK2	0,30945584	0,12420015	0,433656	0,08077149	9
P51817	PRKX	0,24957722	0,04346507	0,29304229	-0,0329413	31,11111111
P53355	DAPK1	1,0345764	1,00545315	2,04002956	-0,3342412	3
P53778	p38[gamma]	0,40490253	0,14936254	0,55426507	-0,0894901	9,77777778
P53779	JNK3	0,84150678	0,1670147	1,00852148	-0,0906523	25,88888889
P68400	CK2[alpha]1	1,08955329	0,37377922	1,46333251	-0,267716	4,88888889
Q00526	CDK3	0,84690228	0,20957765	1,05647993	-0,099956	13
Q00532	CDKL1	0,09358969	0,0567122	0,1503019	0,00407653	5,8
Q00534	CDK6	0,37165728	0,24866473	0,62032201	-0,1100842	5,88888889
Q00535	CDK5	2,00726897	0,66838525	2,67565422	-0,2608793	10
Q00537	PCTAIRE2	0,05223789	0,02893806	0,08117595	0,02145299	3,2
Q02156	PKC[epsilon]	0,32951493	0,0775187	0,40703363	-0,0555883	18,55555556
Q04759	PKC[theta]	0,12600091	0,04146919	0,1674701	-0,0235836	21

Anhang

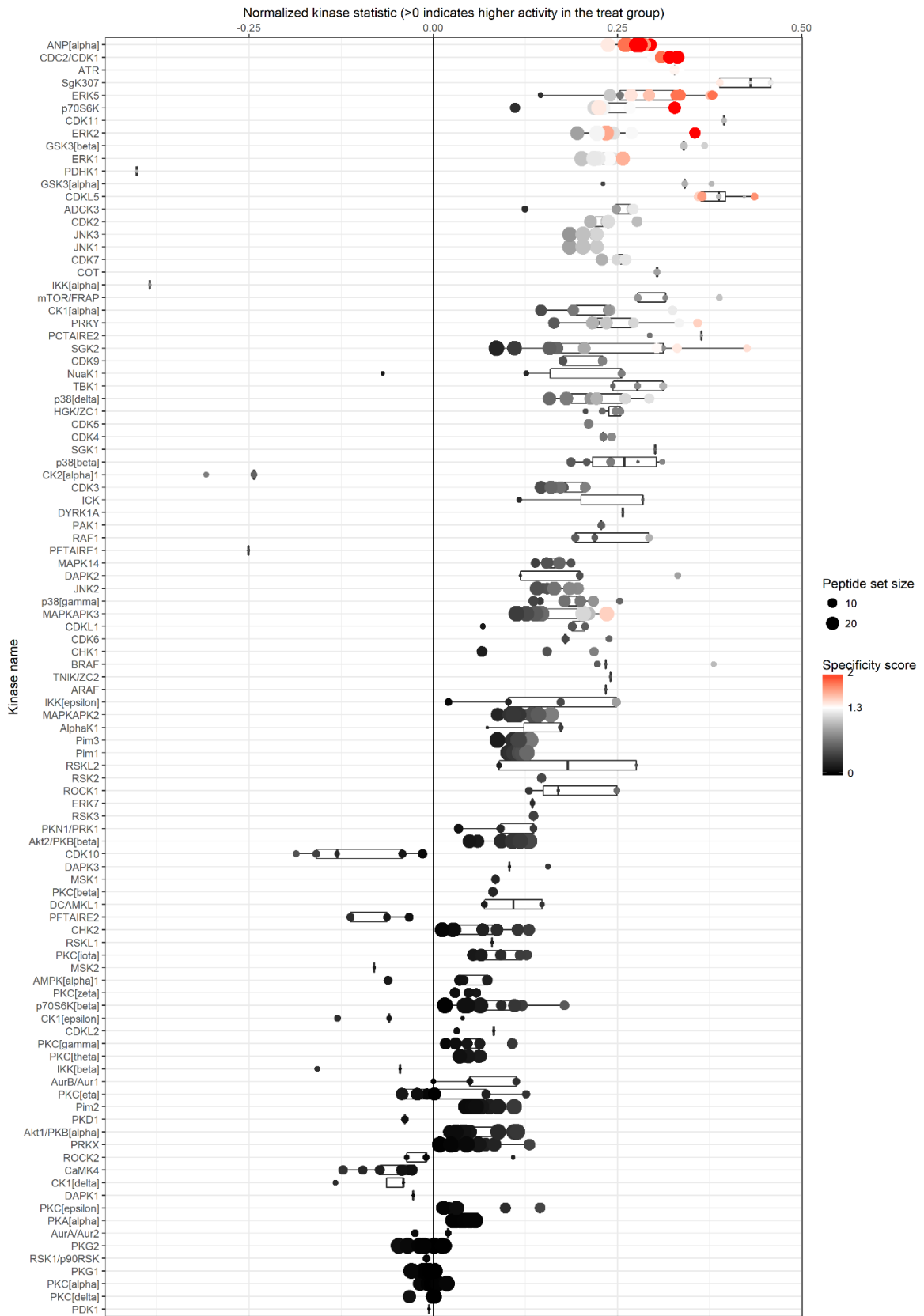
Q05513	PKC[zeta]	0,63327661	0,16615699	0,7994336	-0,1325339	9,55555556
Q05655	PKC[delta]	0,30952883	0,0678609	0,37738973	-0,048785	21,7777778
Q13131	AMPK[alpha]1	0,34096048	0,09881432	0,4397748	-0,0757041	10,7777778
Q13153	PAK1	0,15038863	0,07381757	0,2242062	0,0534207	6
Q13164	ERK5	0,56535561	0,16455473	0,72991033	-0,1127773	12
Q13237	PKG2	0,76384682	0,11025461	0,87410143	-0,0673958	36,1111111
Q13464	ROCK1	0,17558143	0,08736224	0,26294367	-0,0619935	4,71428571
Q13535	ATR	0,58950843	0,24674982	0,83625825	0,12266179	9,88888889
Q13627	DYRK1A	0,299888	0,22538555	0,52527356	-0,1196952	3
Q13976	PKG1	0,2785168	0,0500472	0,328564	-0,028743	39,6666667
Q14164	IKK[epsilon]	0,61377378	0,23835944	0,85213322	-0,1409449	7
Q15118	PDHK1	1,08035853	0,65905084	1,73940937	-0,3545041	3
Q15131	CDK10	0,91467156	0,31778983	1,23246139	-0,2205135	6,11111111
Q15139	PKD1	0,11393225	0,05623263	0,17016488	0,04180124	6
Q15349	RSK1/p90RSK	0,16792055	0,07811208	0,24603263	0,0595913	6
Q15418	RSK3	0,03448454	0,03186018	0,06634472	0,01104443	10
Q15759	p38[beta]	0,21676116	0,11549288	0,33225404	-0,0786111	5,66666667
Q16512	PKN1/PRK1	0,85477469	0,30121741	1,15599209	-0,1969331	6,88888889
Q16539	MAPK14	1,48042271	0,54086131	2,02128402	-0,2097367	13,8888889
Q16566	CaMK4	0,43564593	0,10828592	0,54393184	-0,0809118	12,3333333
Q16644	MAPKAPK3	0,87172965	0,15339942	1,02512907	-0,0734899	35,2222222
Q86V86	Pim3	0,22362513	0,01898555	0,24261068	-0,020633	59,6666667
Q8IWB6	Sgk307	0,1511372	0,06743287	0,21857006	0,05843196	4,44444444
Q8NI60	ADCK3	0,13031786	0,04798003	0,17829789	0,03548296	9,55555556
Q8TD08	ERK7	0,59859946	0,62342304	1,2220225	-0,1973384	4
Q92772	CDKL2	0,1321211	0,05184792	0,18396903	-0,0444936	3,33333333
Q96GD4	AurB/Aur1	0,32170149	0,15839692	0,48009841	-0,1047285	5,11111111
Q96L96	AlphaK1	0,29074312	0,13824841	0,42899153	-0,1095291	3,66666667
Q96Q40	PFTAIRE2	1,78380816	0,73019161	2,51399977	-0,3004796	6,88888889
Q96S38	RSKL1	0,485758	0,22628271	0,71204071	-0,1849812	3
Q9BWU1	CDK11	0,05551813	0,033955	0,08947313	0,0240434	4
Q9HBY8	SGK2	0,32654064	0,06520722	0,39174786	-0,0330748	15,7777778
Q9P1W9	Pim2	0,43644251	0,05049423	0,48693674	-0,0429089	41
Q9UBS0	p70S6K[beta]	0,43415842	0,08504661	0,51920503	0,00135523	25
Q9UHD2	TBK1	0,71902478	0,36428685	1,08331163	-0,2088031	4,88888889
Q9UIK4	DAPK2	0,81385459	0,32723264	1,14108724	-0,2334583	4,88888889
Q9UKE5	TNIK/ZC2	0,37175726	0,16534547	0,53710273	-0,1429084	3
Q9UPZ9	ICK	0,67158548	0,33729596	1,00888144	-0,2239972	3,33333333
Q9Y6S9	RSKL2	0,18230802	0,08330038	0,2656084	0,07301046	3,5

Grafische Darstellung aller Serin-Threonin-Kinasen zwei verschiedener Proben im Vergleich.

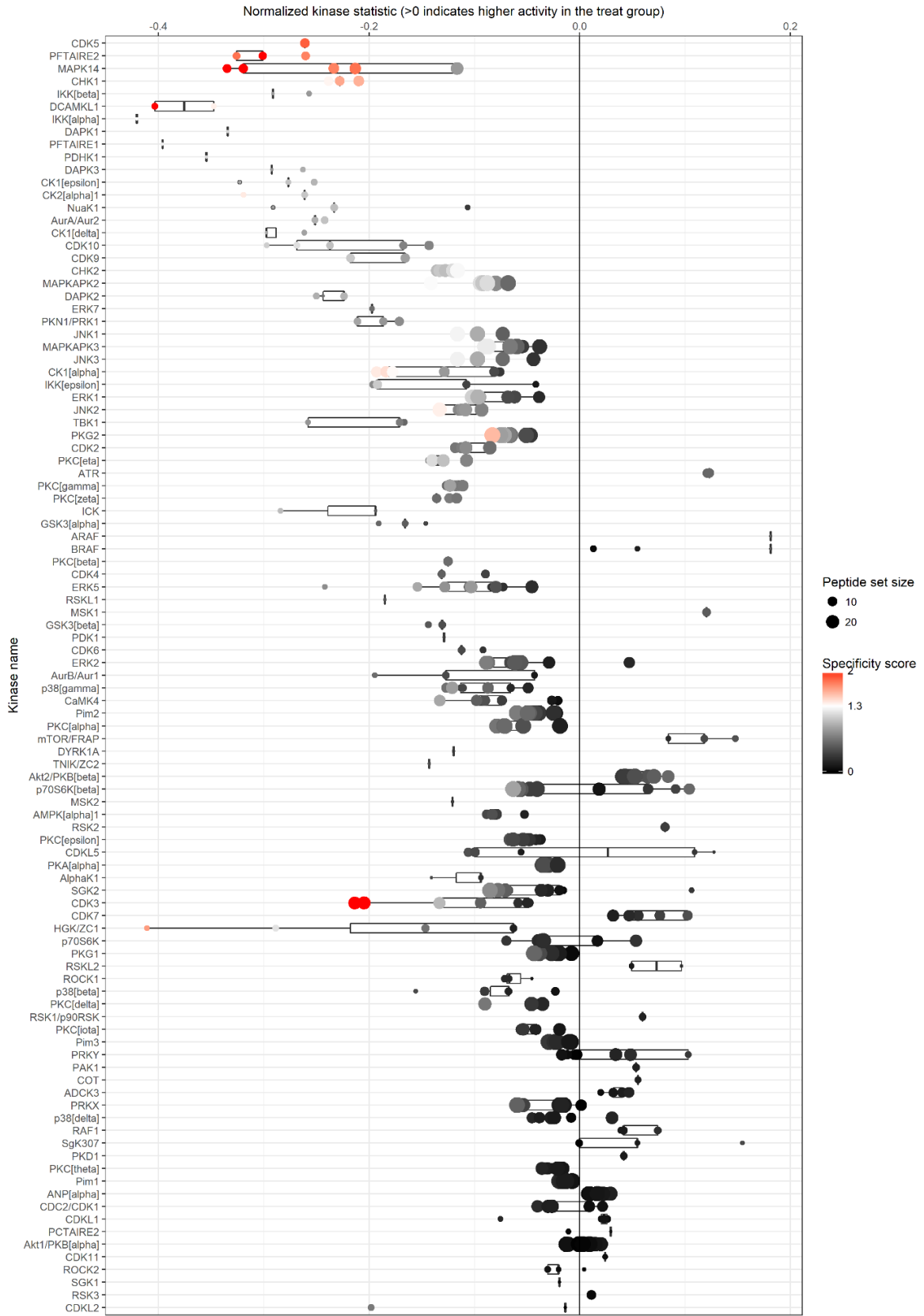
Negativkontrolle vs. Positivkontrolle



Positivkontrolle vs. Prednisolon-Behandlung



Negativkontrolle vs. Prednisolon-Behandlung



11 Danksagung

Mein größter Dank gilt meiner Betreuerin und Doktormutter **Prof. Dr. Jennifer Hundt**. Vielen Dank, Jenny, dass du mich in deine großartige Arbeitsgruppe aufgenommen hast und mir bei der Bearbeitung meines Projekts jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standest.

Auch möchte ich **Prof. Dr. Ralf Ludwig** als Leiter des „Lübecker Instituts für Experimentelle Dermatologie“ (LIED) danken, der ebenfalls das Projekt fleißig unterstützt hat und Ressourcen seiner Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt hat. Ebenso möchte ich **Dr. Dr. Christoph Hammers** für das Zurverfügungstellen des Antikörpers danken, welcher in meiner Arbeit Verwendung fand.

Außerdem gilt mein herzlicher Dank dem Doktoranden der AG Ludwig **Colin Osterloh**, der mich engagiert bei meiner Arbeit unterstützt hat, sowie der Bachelorstudentin **Bejtije Naumann**, die mein Projekt fortgeführt hat und deren Mitbetreuung und Einarbeitung mir viel Spaß gemacht hat. Auch möchte ich **Uta Radine** danken, die mir den Start im Labor durch das Beibringen der ersten Methoden, sowie das Einführen in mein Projekt, stark erleichtert hat.

Ebenfalls danken möchte ich der ganzen **AG Hundt** für das großartige Arbeitsklima und die coolen Partys. Ich habe super gerne Zeit mit euch verbracht! Hervorheben möchte ich **Nadine Merg**, die bei Labor-Problemen immer zur Verfügung stand und schnelle Lösungen parat hatte.

Auch danken möchte ich der **Holstentor Privatklinik** in Lübeck, der **Aestheticum Praxisklinik** in Bremen, sowie der **Plastischen Chirurgie** des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein für das Zurverfügungstellen der Haut.

Natürlich möchte ich auch meinen **Eltern** danken, die mich zur Durchführung eines Doktorarbeitsprojektes ermutigt haben und mich jederzeit in jeder Hinsicht unterstützt haben.