

University of Groningen

Pemphigus pathogenesis

Sokol, Ena

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2016

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Sokol, E. (2016). *Pemphigus pathogenesis: Insights from light and electron microscopy studies*. University of Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.



Chapter 6

Summary/Samenvatting/Sažetak

E. Sokol

Center for Blistering Diseases, Department of Dermatology and
Department of Cell Biology
University Medical Center Groningen, University of Groningen,
Groningen, the Netherlands

Summary

Pemphigus is an auto-immune blistering skin and/or mucosal disease caused by antibodies against proteins of desmosomes. Desmosomes are cell-cell adhesion structures that interconnect intermediate filament networks of neighboring cells. The transmembrane desmosomal proteins that are the targets of pemphigus autoantibodies, desmoglein 1 (Dsg1) and desmogleins 3 (Dsg3), are specific for the stratified epithelia of the skin and mucosal membranes and are not present in the simple epithelia. Therefore, loss of cell-cell adhesion (acantholysis) induced by pemphigus autoantibodies and clinically presented as blistering occurs only in these tissues. Two main forms of pemphigus are known: pemphigus vulgaris (PV) and pemphigus foliaceus (PF) with a different clinical picture and a different auto-antibody profile. PV has two subforms: mucosal dominant and mucocutaneous PV. In PF autoantibodies against Dsg1 cause blisters on skin; in mucosal PV autoantibodies against Dsg3 cause blisters on the mucosal membranes; and in mucocutaneous PV both autoantibodies and both types of blisters are present.

In normal human skin and mucosa the Dsgs have an even smooth membrane distribution, while in pemphigus patient skin and mucosa they are relocalized in the form of clusters. Which type of Dsg -clusters depends on the autoantibodies. Thus pemphigus autoantibodies induce both loss of cell-cell adhesion and clustering of the targeted autoantigens. These two pathological changes can be induced in experimental conditions by applying pemphigus patient autoantibodies to living normal human skin biopsies.

How pemphigus autoantibodies induce loss of cell-cell adhesion and what is the nature of Dsg1 and or Dsg3 clusters are our main questions. To address this we used advanced imaging approaches applied to pemphigus patient tissue and a cell model system to which we applied patient autoantibodies.

In **chapter 2** we used electron microscopy (EM), a technique already used in pemphigus research for over 50 years, but in this thesis in a much different fashion and approach: Large scale electron microscopy (“nanotomy”) was applied to study pemphigus patient skin and mucosa. This non-biased technique allows easy exploration of large tissue areas which is not possible by conventional EM. We examined both skin and mucosa of PF and PV patients, focusing on ultrastructural details: localization of blister cavities, presence of half desmosomes and localization of keratin filament network in the cells surrounding the blister cavities, desmosomes and intercellular space in non-lesional layers. Examination of remains of desmosome/half desmosomes on the borders of blister cavities plays an important role as it can distinguish two main events: if loss of cell-cell adhesion is a result of disappearance of desmosomes or mechanical interruption of Dsg trans-adhesion. In spontaneous lesional PF patient skin no

desmosomes were present around the blister cavity, while in Nikolsky positive PF patient skin half desmosomes were observed. Half desmosomes were also observed around the blister cavities in the skin and mucosa of lesional PV. In all lesional pemphigus samples and to a lesser extent in non-lesional samples newly described structures named interdigitations composed out of two neighboring cell membranes were present. These structures were abundant in lesional pemphigus skin, what links them to the blister pathogenesis. In these structures remains of desmosomal plaques were found. Reduction of desmosomal size and number and widening of the intercellular spaces in this study were confirmed. Pemphigus datasets are open access available on www.nanotomy.org.

In **chapter 3** we investigated the nature of Dsg1 relocalization into clusters and Dsg1 in desmosomes in perilesional PF patient skin. Correlative light and electron microscopy (CLEM) lead us to the finding that IgG/Dsg1 clusters seen by light microscopy are in fact the interdigitations as revealed by EM-analysis in chapter 2. Thus, Dsg1 is relocalized into the clusters outside desmosomes. We found a reduction of Dsg1 in desmosomes of PF patient skin at the layers where Dsg1 relocalized in clusters. Further nanotomy Dsg1 was implemented to follow the localization of Dsg1 through all epidermal layers using immunolabeling. Dsg1 localizations shifts from interdigitations in the lower layers to large intracytoplasmic double membrane vesicles in the upper epidermal layers. 3D analysis of interdigitations demonstrates that these are continuous for several micrometers and not a local concentration of cytoplasmic double membrane vesicles.

Primary human keratinocytes expressing Dsg3 are a reasonable model for studying PV but not PF as they do not express Dsg1, and are easier to manipulate than tissue. In **chapter 4** the pathogenic effect of PV patient auto-antibodies on Dsg3 and other desmosomal proteins was followed on primary human keratinocytes. Two main events of anti-Dsg3 effect were observed after adding PV IgG: rapid internalization of anti-Dsg3 antibodies into the cells followed by formation of dynamic membrane-bound Dsg3 containing clusters that transiently adopt shapes called linear arrays which run perpendicular to the cell membranes. In contrast to earlier findings in skin colocalization of other desmosomal proteins within these clusters was found. CLEM revealed that linear arrays consist of invaginations of one cell into another. These invaginations of one cell into the another have a similar appearance as the interdigitations in skin (chapter 2), with the exception that we did not observe keratin filaments attached to the skin structures. The membranes of both cells were in close proximity in these arrays. Keratin connected to the membrane only on one side of arrays suggests that one cell pulls the other one inside resulting in these linear arrays shapes.

Overall conclusion. This thesis supports and extends the desmoglein depletion theory of pemphigus pathogenesis. Loss of cell-cell adhesion in pemphigus occurs due to the

depletion of the targeted desmogleins, likely non-desmosomal desmogleins, which then are not able to be incorporated into the desmosomes anymore. Due to this lack of the targeted desmogleins in the areas where the other desmoglein isoform is never expressed desmosomes will 'melt' away and loss of cell-cell adhesion will occur. This occurs in the subcorneal layer of skin epithelium and the basal layer of mucosal epithelium. Furthermore partial loss of desmogleins will lead to weakened desmosomes and in such area's blisters can be evoked by applying mechanical force as for example by the Nikolsky test. Future investigation should identify exact mechanism of desmoglein depletion and relocalization. Mechanism of formation of interdigitations between cells in pemphigus tissue and their relation to desmoglein depletion would unravel their role in pemphigus pathogenesis. The remains of desmosomal plaques in the interdigitations can result from the 'melting' away desmosomes or can be newly synthesized desmosomes and understanding this would give more insights to the pathogenesis. The large double cytoplasmic vesicles in the higher skin layers reflect an fascinating unknown mechanism of endocytosis and future research should also focus on this. Understanding exact sequence of the events of the depletion of desmogleins and formation of the interdigitating between neighboring cells would greatly impact our current knowledge about pemphigus pathogenesis.

Samenvatting

Pemphigus is een auto-immuun blaarziekte van de huid en/of slijmvliezen, veroorzaakt door antilichamen tegen desmosomale eiwitten. Desmosomen zijn cel-cel adhesiestructuren die het netwerk van intermediaire filamenten van buurcellen met elkaar verbinden. De desmosomale transmembraaneiwitten die het doelwit zijn van de pemphigus autoantilichamen, desmogleïne 1 (Dsg1) en desmogleïne 3 (Dsg3), komen specifiek tot expressie in het meerlagig epitheel van huid en mucosa, maar niet in simpel epitheel. Pemphigus autoantilichamen induceren daarom alleen in dit weefsel verlies van cel-cel adhesie, klinisch waarneembaar als blaarvorming. Er bestaan twee belangrijke vormen van pemphigus: pemphigus vulgaris (PV) en pemphigus foliaceus (PF), elk met een verschillend klinisch beeld en autoantilichaam profiel. PV heeft twee varianten: mucosa dominante en mucocutane PV. In PF veroorzaken de anti-Dsg1 autoantilichamen blaren op de huid; in mucosale PV veroorzaken anti-Dsg3 autoantilichamen blaren op de mucosa, en in mucocutane PV zijn beide autoantilichamen aanwezig en veroorzaken zij blaren in beide weefsels. In normale humane huid en mucosa tonen de desmogleïnes een gladde distributie langs de epitheliale cel membranen, terwijl desmogleïnes in de huid en slijmvliezen van patiënten met pemphigus, een geclusterde distributie laten zien. Het type Dsg cluster hangt af van tegen welk Dsg het autoantilichaam is gericht. Kortom, pemphigus autoantilichamen induceren verlies van cel-cel adhesie en clustering van specifieke autoantigenen. Deze twee pathologische veranderingen kunnen experimenteel worden nagebootst door autoantilichamen van pemphigus patiënten toe te voegen aan gezonde humane huidbiopten. Hoe pemphigus autoantilichamen het verlies van cel-cel adhesie induceren, en wat de aard is van de Dsg1 en Dsg3 clusters, zijn de twee vragen waarop wij ons richten in dit proefschrift. Om deze vragen te beantwoorden hebben we geavanceerde beeldvormende technieken toegepast op weefsel van pemphigus patiënten en op een in vitro cel model waaraan we autoantilichamen van patiënten hebben toegevoegd.

In **hoofdstuk 2** wordt EM gebruikt, een techniek die al meer dan 50 jaar in pemphigus onderzoek wordt toegepast, maar in dit proefschrift op een nieuwe manier. Grootschalige electronenmicroscopie ("nanotomie"; www.nanotomy.org) wordt gebruikt om de huid en mucosa van pemphigus patiënten te bestuderen. Deze techniek maakt gemakkelijke exploratie van grote weefseloppervlakten toegankelijk, wat niet mogelijk is met conventionele EM, en is dus vrij van selectiebias. Huid en mucosa van PF en PV patiënten worden onderzocht, met nadruk op de ultrastructurele details in blaarniveau, de aanwezigheid van half-desmosomen en locatie van keratine filament netwerk in de cellen direct om de blaar, en desmosomen en intercellulaire ruimte in de niet-lesionale lagen. De analyse van desmosoom restanten of half-desmosomen langs de blaar is belangrijk aangezien het onderscheid kan maken tussen twee belangrijke

gebeurtenissen, namelijk of verlies van cel-cel adhesie het gevolg is van het verdwijnen van desmosomen of van mechanische verbreking van de Dsg-Dsg trans-adhesie. In spontane lesionale PF huid zijn desmosomen volledig afwezig rond de blaar, terwijl in Nikolsky positieve PF patiënten huid wel half-desmosomen rond de blaar aanwezig zijn. Half-desmosomen worden ook aangetroffen rond de blaren in de lesionale huid en mucosa van PV patiënten. In alle lesionale pemphigus bipten en, in mindere mate, ook in niet-lesionale bipten, zijn tevens niet eerder beschreven interdigiterende structuren aanwezig die bestaan uit de celmembranen van twee buurcellen. Deze structuren zijn met name aanwezig in lesionale pemphigus huid, waardoor ze mogelijk een rol hebben in de pathogenese van blaarvorming. In deze structuren zijn ook restanten van desmosomale plaques aanwezig. De desmosomen zijn hier ook kleiner en in mindere mate aanwezig als in normale huid. Deze pemphigus EM datasets zijn vrij toegankelijk op www.nanotomey.org.

In **hoofdstuk 3** wordt de aard van de Dsg1 clusters en de desmosomaal Dsg1 in perilesionale PF patiënten huid onderzocht. Met correlatieve licht en electronen microscopie (CLEM) wordt aangetoond dat de IgG/Dsg1 clusters welke zichtbaar zijn met licht microscopie, de interdigiterende structuren zijn die in hoofdstuk 2 met EM worden gevonden. De hoeveelheid Dsg1 is sterk verlaagd in de desmosomen van PF patiënten huid, met name in die lagen waar tde Dsg1 clusters aanwezig zijn. Ofwel, er vindt redistributie van Dsg1 plaats, van desmosomen naar clusters buiten het desmosoom. Aanvullende nanotomie laat zien dat de locatie van Dsg1 zich verplaatst van interdigitaties in de lagere lagen, naar grote intracytoplasmatische vesikels met een dubbel membraan in de bovenste epidermale lagen. 3D analyse van de interdigiterende structuren laat zien dat deze structuren een continuüm vormen, met een lengte van enkele micrometers, in plaats van een lokale concentratie van cytoplasmatische vesikels.

Primaire humane keratinocyten brengen Dsg3, maar niet Dsg1, tot expressie en vormen daarom een redelijk goed model om PV, maar niet PF, te bestuderen, ook al omdat het eenvoudiger te manipuleren is dan huidweefsel. In **hoofdstuk 4** worden de pathogene effecten van PV autoantilichamen op Dsg3 en andere desmosomale eiwitten in primaire humane keratinocyten bestudeerd. Twee belangrijke gebeurtenissen worden geobserveerd: na het toevoegen van PV IgG vind er snelle internalisatie van Dsg3 autoantilichamen plaats, gevolgd door de formatie van dynamische membraan-gebonden Dsg3 bevattende clusters die tijdelijk de vorm van lineaire structuren ('linear arrays') aannemen welke haaks ten opzichte van de celmembraan staan. In tegenstelling tot eerdere bevindingen in huid, is er sprake van colocalisatie van andere desmosomale eiwitten in deze clusters. Met CLEM zien we dat de lineaire structuren gevormd worden door invaginaties van buurcellen in elkaar. Deze invaginaties lijken op de interdigitaties die in de huid aanwezig zijn (hoofdstuk 2), behalve dat er geen

keratine filamenten aan de huidstructuren vast zit. De membranen van beide cellen liggen vlak naast elkaar in deze lineaire structuren. Keratine zit slechts aan een kant van de lineaire structuren vast, wat de suggestie wekt dat de ene cel de andere naar binnen trekt.

Algehele conclusie. Dit proefschrift ondersteunt en breidt de desmogleïne depletie theorie van pemphigus pathogenese uit. Verlies van cel-cel adhesie in pemphigus komt voort uit het verdwijnen van specifieke desmogleïnes, waarschijnlijk uit de 'pool' van niet-desmosomale desmogleïnes, die vervolgens niet meer ingebouwd kunnen worden in desmosomen. Door dit gebrek aan specifieke desmogleïnes in de gebieden waar andere desmogleïne isovormen ontbreken zullen desmosomen 'wegsmelten', wat resulteert in verlies van cel-cel adhesie. Dit gebeurt in de subcorneale lagen van de huid en de suprabasale lagen van mucosaal epitheel. Daarnaast zal het gedeeltelijke verlies van desmogleïnes leiden tot verzwakte desmosomen, en in dergelijke gebieden kunnen blaren worden opgewekt door het toepassen van mechanische druk, bijvoorbeeld met de Nikolsky test. Toekomstige onderzoeken zullen de exacte mechanismes van desmogleïne depletie en relocatie moeten ontrafelen. Het mechanisme van de formatie van interdigitaties tussen cellen, en hun relatie met desmogleïne depletie zou verder inzicht kunnen geven in welke rol zij spelen in pemphigus pathogenese. De restanten van desmosomale plaques in de interdigitaties zouden het resultaat kunnen zijn van 'smeltende' desmosomen, of de vorming van nieuwe desmosomen kunnen weergeven, en een beter begrip van dit proces zou meer inzicht in pathogenese van acantholyse kunnen geven. De grote cytoplasmatische vesikels met dubbel membraan in de hogere huidlagen weerspiegelen een fascinerend en nog onbekend mechanisme van endocytose en is voer voor toekomstig onderzoek. Begrip van de exacte mechanismen die ten grondslag liggen aan de opeenvolgende gebeurtenissen van depletie van desmogleïnes en de vorming van interdigiterende structuren tussen buurcellen, zal van grote invloed zijn op de huidige kennis van de pathogenese van pemphigus.

Sažetak

Pemfigus je autoimuna bulozna dermatoza kod koje dolazi do gubitka veza između ćelija u koži i/ili u epitelu sluznice uslijed prisustva cirkulirajućih antitijela protiv dezmozomalnih proteina. Gubitak veza između ćelija dovodi do stvaranje intraepidermalnih šupljina što se klinički očituju u vidu bula. Dezmozomi su ćelijske veze koje povezuju citoskelete susjednih ćelija i na taj način osiguravaju čvrstoću i stabilitet tkiva. Dezmozomi su komponovani od transmembranoznih i citoplazmatskih proteina od koji su antigeni pemfigusnih autoantitijela dezmogleini 1 i 3. Dezmogleini su transmembranozni glikoproteini koji se sa svojim ekstraćelijskim dijelovima vežu za suprotne u ekstraćelijskom prostoru dezmozoma, a sa intraćelijskim dijelovima za ostale citoplazmatske proteine dezmozoma. Pemfigusna autoantitijela tipa IgG su usmjerena protiv ekstraćelijskih dijelova dezmogleina 1 i/ili 3. Postoje dvije glavne forme pemfigusa: pemfigus foliaceus (PF) i pemfigus vulgaris (PV). Antitijela protiv dezmogleina 1 kod PF pacijenata izazivaju stvaranje bula po koži. Razlikujemo dvije forme PV, blaža forma koja se odlikuje prisustvom autoantitijela protiv dezmogleina 3 i prisustvom bula samo po sluznicama i forma kod koje obje vrste autoantitijela izazivaju stvaranje bula i po koži i sluznicama.

Pored stvaranja bula pemfigusna autoantitijela izazivaju poremećaj distribucije antigena, koji u koži i sluzokoži ovih pacijenata nemaju normalnu distribuciju duž ćelijskih membrana već grozdanu. Stvaranje bula se može izazvati u eksperimentalnim uslovima ako inkubiramo zdravu kožu sa serumom pemfigusnih pacijenata. Glavna tema ove disertacije je mehanizam nastanka bula izazvan pemfigusnim autoantitijelima i uloga redistribucije dezmogleina.

U ovome radu koža i sluzokoža pemfigusnih pacijenata je izučavana, kao i promjene izazvane pemfigusnim autoantitijelima na eksperimentalnom pemfigusnom modelu primarnih kožnih ćelija. Korištene su različite mikrosopske metode koje uključuju savremeni oblik elektronske mikroskopije tzv. "Nanotomiju" (od riječi nano i anatomija), korelativnu svjetlosnu i elektronsku mikroskopiju i konfokalnu mikroskopiju.

U **poglavlju 1B** dat je pregled dosadašnjih članaka o neadhezivnim funkcijama dezmozomalnih proteina. Dezmozomalni proteini pored adhezije posjeduju ostale uloge kao što je uloga dezmogleina 1 u stratifikaciji epitela i uloga dezmogleina 3 u kontroli funkcije aktina. U **poglavlju 2** koža i sluzokoža pacijenata je izučavana savremenom mikrosopskom metodom koja podsjeća na Google Earth aplikaciju. Kontrolni i pemfigusni preparati su dostupni putem (www.nanotomy.org). Opisane su nove ultramikrosopske promjene u oštećenim tkivima u vidu interdigitacija između ćelija. U **poglavlju 3** koža pacijenata koji boluju od PF je izučavana korelativnom mikroskopijom i zaljučeno je da mjesta redistribucije pemfigusnih antigena vidljiva fluorescentnom mikroskopijom odgovaraju interdigitacijama između ćelija uočena elektronskom

mikroskopijom. Kod PF pacijenata je prisutna redukcija broja dezmogleina 1 u dezmozomima. U **poglavlju 4** praćene su patološke promjene na primarnim ćelijama kože izazvane autoantitijelima iz seruma pacijenata koji su označeni fluorescentnom bojom. Fluorescentnom mikroskopijom opisana je linearna redistribucija antigena i ostalih dezmozomalnih proteina izazvana PV autoantitijelima. Na mjestima ovih specifičnih promjena elektronskom mikroskopijom zapažene su invaginacije između susjednih ćelija. Ove promjene na eksperimentalnom ćelijskom modelu podsjećaju na promjene u tkivima pemfigusnih pacijenata opisane u poglavlju 2 i 3.

Ovaj rad podržava i opširuje takozvanu teoriju deplecije dezmogleina o mehanizmu nastanka bula kod pemfigusa. Naime, pemfigusna autoantitijela izazivaju depleciju antigena. Zbog manjka dezmogleina 1 i/ili 3 i odsustva ostalih kompenzirajućih formi dezmogleina dolazi do iščezavanja dezmozoma i stvaranja bula. Interdigitacije između ćelija u oštećenim tkivima pacijenata najvjerojatnije nastaju zbog bipolarnog karaktera autoantitijela. Budući rad treba da je usmjeren na objašnjenje preciznog mehanizma nastanka interdigitacija i njihove uloge u nastanku bula kod pemfigusa.

