

Aus dem Institut für experimentelle Dermatologie
der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. R. Ludwig

Lübecker Institut für experimentelle Dermatologie

**Die Effekte einer Inhibition der Januskinase 2 in
in vitro Modellen der Epidermolysis bullosa
acquisita**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

-Sektion Medizin-

vorgelegt von

Jarno Till Scheuber

aus Bad Oldesloe

Lübeck 2016

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ralf Ludwig

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 05.07.2016

Promotionskommission der Sektion Medizin

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----------|
| Inhaltsverzeichnis | I |
| Abkürzungsverzeichnis | IV |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Autoimmunerkrankungen | 1 |
| 1.2 Morphologie der Haut | 3 |
| 1.2.1 Allgemeine Eigenschaften der Haut | 3 |
| 1.2.2 Epidermis | 3 |
| 1.2.3 Dermis | 4 |
| 1.2.4 Subkutis | 5 |
| 1.3 Kollagen Typ VII | 5 |
| 1.4 Blasenbildende Autoimmundermatosen | 6 |
| 1.5 Epidermolysis bullosa acquisita | 8 |
| 1.5.1 Epidemiologie | 8 |
| 1.5.2 Genetik der EBA | 9 |
| 1.5.3 Pathogenese und die Rolle des Kollagen Typ VII | 9 |
| 1.5.4 Entstehung des klinisches Bildes | 9 |
| 1.5.5 Klinik | 10 |
| 1.5.6 Mechanobullöse Form | 10 |
| 1.5.7 Inflammatorische Form | 11 |
| 1.5.8 Diagnose | 12 |
| 1.5.9 Histologie | 12 |
| 1.5.10 Direkte Immunfluoreszenz (DIF) | 13 |
| 1.5.11 Indirekte Immunfluoreszenz (IIF) | 14 |
| 1.5.12 Immunelektronenmikroskopie | 15 |
| 1.5.13 Western Immunoblot | 15 |
| 1.5.14 Enzym-Linked Immune Assay (ELISA) | 15 |
| 1.5.15 Therapie | 16 |
| 1.6 Zytokine in der EBA | 17 |
| 1.6.1 Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) | 17 |
| 1.6.2 Gamma Interferon (IFN- γ) | 17 |
| 1.7 Interleukin 8 (IL-8) | 18 |
| 1.8 JAK-STAT-Signalweg | 18 |
| 1.8.1 JAK2-Inhibitor CEP-33779 | 19 |
| 1.9 Ziele dieser Arbeit | 20 |

| | | |
|----------|--|----|
| 2 | Material und Methoden | 23 |
| 2.1 | Verwendete Pharmaka | 23 |
| 2.2 | Chemikalien..... | 23 |
| 2.3 | Puffer und Medien | 24 |
| 2.4 | Verbrauchsmaterialien..... | 24 |
| 2.5 | Verwendete Laborgeräte | 25 |
| 2.6 | Verwendung humaner Biomaterialien..... | 27 |
| 2.6.1 | Humanes Kollagen Typ VII (hCol7) und anti-human-COL7-IgG1 | 27 |
| 2.7 | ROS-Assay..... | 27 |
| 2.7.1 | Versuchsaufbau | 27 |
| 2.7.2 | Separation neutrophiler Granulozyten (PMN) aus peripherem Vollblut. | 28 |
| 2.7.3 | Vorbereitung und Durchführung..... | 29 |
| 2.7.4 | Auswertung | 31 |
| 2.8 | Granulozyten-Migration-Assay | 32 |
| 2.8.1 | Vorbereitung und Durchführung..... | 32 |
| 2.8.2 | Auswertung | 36 |
| 2.9 | Gefrierschnittmodell..... | 36 |
| 2.9.1 | Gefrierschnittpräparate | 36 |
| 2.9.2 | Versuchsaufbau | 36 |
| 2.9.3 | Vorbereitung und Durchführung..... | 37 |
| 2.9.4 | Färbung der Kryosektionpräparate mit Hämatoxylin-Eosin | 39 |
| 2.9.5 | Lichtmikroskopische Auswertung..... | 40 |
| 2.10 | Elastase-Assay..... | 40 |
| 2.10.1 | Separation der PMN | 40 |
| 2.10.2 | Versuchsaufbau und Durchführung | 41 |
| 2.10.3 | Auswertung | 42 |
| 2.11 | Bestimmung der Zytotoxizität von CEP-33779 auf PMN mittels Durchflusszytometrie. | 42 |
| 2.11.1 | Vorbereitung und Durchführung..... | 43 |
| 2.11.2 | Auswertung | 44 |
| 2.12 | Statistische Auswertung | 44 |
| 3 | Ergebnisse | 45 |
| 3.1 | Der Effekt von CEP-33779 auf die Freisetzung von ROS aus PMN..... | 45 |
| 3.1.1 | JAK2-Blockade inhibiert die Aktivierung von PMN..... | 45 |
| 3.2 | JAK2-Inhibition hat hemmenden Einfluss auf die Migration von PMN | 46 |
| 3.3 | Der Einfluss des JAK2-Inhibitors auf die dermo-epidermale Spaltbildung... | 48 |
| 3.3.1 | Typ VII Kollagen Antikörper | 48 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.3.2 | JAK2-Inhibition vermindert die dermo-epidermale Separation | 48 |
| 3.4 | Elastase-Assay..... | 50 |
| 3.5 | Toxizität..... | 52 |
| 4 | Diskussion | 54 |
| 4.1 | Auswahl des getesteten Wirkstoffes CEP-33779 | 54 |
| 4.2 | Funktionen von PMN und Wichtigkeit in der Pathogenese der EBA..... | 55 |
| 4.2.1 | Der Weg zur Aktivierung von PMN | 56 |
| 4.2.2 | Einfluss der Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren auf PMN .. | 56 |
| 4.2.1 | Reaktive Sauerstoffspezies..... | 57 |
| 4.2.2 | Migration | 58 |
| 4.2.3 | Elastase | 58 |
| 4.3 | Funktion der Januskinase 2..... | 59 |
| 4.3.1 | Tyrosinkinase bei myeloproliferierenden Syndromen | 59 |
| 4.3.2 | Januskinase-2-Inhibitor CEP-33779 in vorangegangenen Studien..... | 60 |
| 4.4 | Der inhibitorische Effekt des CEP-33779 auf die Freisetzung von ROS aus PMN | 61 |
| 4.5 | Der Einfluss von CEP-33779 auf die Migrationseigenschaften von PMN.... | 62 |
| 4.6 | Das Gefrierschnittmodell | 63 |
| 4.6.1 | Versuchsprinzip des Gefrierschnittmodells | 63 |
| 4.6.2 | Der Effekt des Januskinase 2 Inhibitors auf die DES..... | 63 |
| 4.7 | Der inhibitorische Effekt von CEP-33779 auf die Freisetzung von Elastase aus aktivierten PMN | 65 |
| 4.8 | In vivo Mausexperimente mit JAK2 bei passiv induzierter EBA..... | 66 |
| 4.9 | Potentielle Nebenwirkungen des CEP-33779..... | 68 |
| 4.10 | Ausblick..... | 69 |
| 5 | Zusammenfassung | 71 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 73 |
| 7 | Anhang | 86 |
| 7.1 | Voten der Ethikkommission | 86 |
| 7.2 | Abbildungsverzeichnis..... | 86 |
| 8 | Danksagung | 88 |
| 9 | Lebenslauf | 89 |

Abkürzungsverzeichnis

BP – bullöses Pemphigoid

BSA – Rinderserumalbumin

°C – Grad Celsius

CD4 – Cluster of Differentiation 4

CEP-33779 – Janus associated kinase 2 Inhibitor

CL – Chemilumineszenz

DES – dermo-epidermale Spaltbildung

DEJ – dermo-epidermale Junctionszone

DMSO – Dimethylsulfoxid

EBA – Epidermolysis bullosa acquisita

EDTA – Ethylendiamintetraacetic acid (Ethylendiamintetraessigsäure)

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay (Enzymimmunoassay)

Fcγ-Rezeptoren – engl. *fragment crystallisable* gamma Rezeptor

FCS – Fetales Kälberserum

fMLP – N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine

GM-CSF – Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor

hCol7 – humanes Typ VII Kollagen

HE – Hämatoxylin-Eosin

HLA – Humane Leukozyten Antigene

IFN-γ – Gamma-Interferon

IgG – Immunglobulin G

IL – Interleukin

JAK – Janus associated Kinase

kDa – Kilodalton

LIF – Leukämiehemmender Faktor

M – Molar

MHC – Haupthistokompatibilitätskomplex

ml – Milliliter

NaCl – Natriumchlorid

NADPH – Nicotinsäureamid-adenin-dinukleotid-phosphat

NC – non-collagen (nicht-kollagen)

ng – Nanogramm

NF-κB – Nukleärer Faktor 'kappa-leicht-Ketten-Verstärker' aktivierter B-Zellen

OSM – Oncostatin M

NK – Negativkontrolle

PBS – Phosphate-buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)

PI – Propidiumiodid

PMN – polymorphkernige neutrophile Granulozyten

PK – Positivkontrolle

ROS – reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)

rpm – Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)

RPMI – Roswell Park Memorial Institute Medium

RLU – Relative Light Unit

SH2 – Src-homology 2

STAT – Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription

TCR – T-Zell-Rezeptor

TNF – Tumornekrosefaktor

µl – Mikroliter

µm – Mikrometer

1 Einleitung

1.1 Autoimmunerkrankungen

Autoimmunerkrankungen liegen nach Rose & Bona (Rose and Bona, 1993) dann vor, wenn sich die Erkrankung durch den Transfer von T-Zellen oder Antikörpern induzieren lässt. Die Induktion der Erkrankung durch Transfer von T-Zellen oder Antikörpern in Tieren und die klinische Beobachtung, z.B. Detektion von Autoantikörpern und Korrelation dieser mit dem klinischen Schweregrad, sind nach Rose & Bona indirekte Hinweise auf das Vorliegen von Autoimmunerkrankungen. Retrospektive Kohortenstudien von Serumproben zeigen, dass bereits Jahre vor der klinischen Manifestation der Erkrankung Autoantikörper nachweisbar sind (Arbuckle et al., 2003). Da Autoantikörper jedoch auch bei mindestens 10 % der Gesunden vorkommen, lässt sich momentan nicht unterscheiden, ob eine klinisch gesunde Person mit einem Nachweis von Autoantikörpern weiter gesund bleibt („benigne Autoimmunität“), oder ob es sich um eine frühe Manifestation der Erkrankung handelt. Unter Umständen könnte eine weitere Analyse der Autoantikörper, z.B. deren Glykosylierung am Fc-Fragment (Rombouts et al., 2015), hier als Prädiktor verwendet werden.

Die Prävalenz aller Autoimmunerkrankungen in den westlichen Ländern liegt bei etwa 5 % (Davidson und Diamond, 2001). Genetische Faktoren sind essentiell bei deren Entstehung, was epidemiologische Studien und Tierexperimente belegten (Goris und Liston, 2012). Vor allem die Expression besonderer HLA-Haplotypen bringt ein erhöhtes Risiko mit sich eine Autoimmunerkrankung zu entwickeln. Prädisponierende Gene und ungünstige Umweltfaktoren, wie Rauchen, Drogenmissbrauch, Diät, Chemikalienexposition und Sonnenlicht führen zu einem Verlust der Selbsttoleranz und somit zu einer Destruktion von körpereigenem Gewebe durch das Immunsystem (D’Cruz, 2000; Thorsby und Lie, 2005). Die Tatsache, dass Frauen in etwa dreimal so häufig wie Männer an Autoimmunerkrankungen leiden, zeigt einen wahrscheinlichen Einfluss von Hormonen auf die Pathogenese (Grimaldi et al., 2005). Es werden noch weitere Mechanismen in der Pathogenese vermutet. Bei der molekularen Mimikry kommt es aufgrund ähnlicher Oberflächenstrukturen von Erregern und körpereigenem

Gewebe zu einer Kreuzreaktion und somit zu Destruktion von autologen Zellen durch das Immunsystem (Cusick et al., 2012; Libbey et al., 2007).

Im Thymus durchlaufen reife T-Lymphozyten eine Negativ- und eine Positivselektion. Bei diesem Prozess binden sich T-Zell-Rezeptoren (TCR) an körpereigene Peptide, die von MHC-I- und MHC-II-Molekülen auf den Thymusepithelzellen exponiert werden. Ist die Bindung des TCR nicht möglich, wird der apoptotische Zelltod eingeleitet und somit nicht positiv selektiert. Entsteht eine zu starke Bindung zwischen T-Zelle und MHC-Molekül, wird die T-Zelle überaktiviert und ebenfalls apoptotisch. Dieser Vorgang wird Negativselektion genannt. Eine fehlerhafte Selektion kann durch fehlende Elimination von autoreaktiven Zellen zur Entwicklung einer autoimmunen Reaktion führen (Bommhardt et al., 2004; Vallejo et al., 2004). B-Lymphozyten durchlaufen einen ähnlichen Prozess der negativen Selektion, um die Immunkompetenz zu erlangen. Dieser Schritt der Reifung beginnt im Knochenmark und wird in der Milz fortgeführt, in die B-Zellen, unter anderem nach Austritt aus dem Knochenmark, migrieren (Hardy und Hayakawa, 2001). Neben der eben geschilderten zentralen Toleranz, werden bei der peripheren Toleranz Antigenepitope der in der Peripherie vorkommenden körpereigenen Peptide präsentiert. Ein Mechanismus ist die Versetzung einer T-Zelle in Anergie, sobald ein Antigen ohne co-stimulatorische Moleküle präsentiert wird (Schwartz, 2003). Eine autoimmune Reaktion beginnt mit der Aufnahme von Autoantigenen aus geschädigtem Gewebe von dendritischen Zellen, die daraufhin in regionale Lymphknoten migrieren. Die dendritischen Zellen präsentieren anschließend T-Helfer-Zellen das Antigen, welche daraufhin CD8+ T-Zellen und B-Lymphozyten aktivieren. Wenn die Lymphozyten spezifisch für das Autoantigen sind und ein Mangel an Selbsttoleranz vorliegt, folgt eine Immunantwort gegen Gewebe des eigenen Körpers. Die Effektormechanismen sind die gleichen wie die einer Immunantwort auf eingedrungenes Pathogen, einschließlich Antikörpersynthese und Zellantworten von CD4+ T-Zellen, CD8+ T-Zellen, Makrophagen und anderen phagozytischen Zellen sowie Mastzellen (Rose und Mackay, 2006).

Antikörper sind Effektormoleküle, die von Plasmazellen, dem reifsten Differenzierungsstadium eines B-Lymphozyten, sezerniert werden (Manz et al., 2005). Diese Antikörper gegen autologe Strukturen, Autoantikörper, können entweder direkt an Zellenrezeptoren binden und dadurch eine Behinderung oder

Aktivierung der Signaltransduktion induzieren oder indirekt schaden, indem diese mit Faktoren des angeborenem Immunsystems, wie dem Komplementsystem und den unspezifischen Entzündungszellen, mit dem Fc-Fragment der Antikörper interagieren. Des Weiteren können Autoantikörper direkt reaktive Sauerstoffspezies katalysieren, welches einen inflammatorischen Schaden verursacht (Wentworth et al., 2002).

Die in dieser Arbeit beschriebenen Autoimmundermatosen werden nach deren Zielantigenen unterteilt. Während bei den Pemphiguserkrankungen die Zell-Zell-Kontakte, Desmosomen, der Epidermis betroffen sind, kommt es bei subepithelialen Autoimmundermatosen zum Gewebeschaden und in der epidermo-dermalen Junctionszone zu einer Spaltbildung (Sitaru und Zillikens, 2005).

1.2 Morphologie der Haut

1.2.1 Allgemeine Eigenschaften der Haut

Die Haut ist mit einer Fläche von ca. 1,8 m² und einem Gesamtgewicht von 15 % des Körpergewichts das größte Organ des menschlichen Organismus, das die Abgrenzung des Körpers gegenüber der Außenwelt bildet. Die Funktionen beinhalten Schutz vor Sonnenlicht, vor pathologischen Keimen und Austrocknung. Außerdem dient die Haut zur Wärmeregulation des Körpers, sensiblen Sinneswahrnehmungen und als Energiereserve in Form von Fettspeicherung. Die Haut wird in drei Schichten untergliedert. Die Epidermis (Oberhaut), die Dermis (Lederhaut oder Korium) und die Subkutis (Unterhaut) (Wysocki, 1999).

1.2.2 Epidermis

Die Epidermis besteht aus mehrschichtig verhornendem Plattenepithel, das hauptsächlich aus Keratinozyten besteht und nerven- und gefäßfrei ist. Zusätzlich

kommen Melanozyten und Langerhanszellen entlang der Basalmembran vor (Braun-Falco, 2000).

Die Epidermis wird in vier Schichten unterteilt. Das Stratum corneum besteht aus kernlosen Keratinozyten und bildet die oberste Schicht der Haut und dient als mechanischer Schutz der Haut. Im Stratum granulosum kommt es im Zellinneren zur Anreicherung von basophilen Keratohyalin granula, welches mit dem Verlust der Zellorganellen begleitet wird. Das Stratum spinosum wird aus einem mehrschichtigen Bereich mit großen polygonalen Keratinozyten gebildet, welche über Desmosomen miteinander verbunden sind. Stachelige Ausstülpungen sind lichtmikroskopisch zu erkennen. Das aus Stammzellen bestehende Stratum basale bildet die unterste Schicht und ist für die Regeneration des Epithels zuständig. Die hier gebildeten Keratinozyten benötigen ca. 4-6 Wochen, um bis zum Stratum corneum zu wandern (Kanitakis, 2002).

1.2.3 Dermis

Die Dermis, auch Korium oder Lederhaut genannt, dient als Bindegewebe zwischen Epidermis und dem subkutanen Fettgewebe. Im Grenzbereich zwischen Epidermis und Dermis liegt die dermo-epidermale Junctionszone (DEJ), in der die epidermale Basalmembran über Verankerungsfibrillen und Reteleisten mit der Dermis verbunden wird. Durch diese Verankerung wird ein Ablösen der Epidermis von der Dermis, insbesondere bei Einwirkung von Scherkräften, verhindert. Die DEJ wird in verschiedene Zonen unterteilt (Abbildung 3). Die Hemidesmosomen der epidermalen basalen Keratinozyten bilden die erste Zone, auf welche die Lamina lucida, Lamina densa, Sublamina densa sowie die Verankerungsfibrillen der papillären Dermis folgen. Die hemidesmosomalen Plaques der basalen Keratinozyten beinhalten die Proteine Plektin und BP230, die mit den intrazellulären Anteilen der transmembranösen Ankerfilamente BP180 und $\alpha 6\beta 4$ -Integrin interagieren. Die extrazellulär befindlichen Strukturen des BP180 und $\alpha 6\beta 4$ -Integrins gehen zusammen mit dem Laminin 332 (in mancher Literatur noch als Laminin 5 bezeichnet) eine feste Verbindung zu den in der Lamina densa und Sublamina densa befindlichen Verankerungsfibrillen ein. Diese Verankerungsfibrillen, welche sich bis in die papilläre Dermis ausdehnen,

bestehen insbesondere aus Kollagen Typ VII (Borradori und Sonnenberg, 1999; Burgeson und Christiano, 1997).

Die Dermis ist in zwei Schichten unterteilt. Die Obere ist das Stratum papillare und liegt der Epidermis direkt an. Sie setzt sich aus kollagenem Bindegewebe und elastischen Fasern zusammen und beinhaltet ein dichtes Netz aus Kapillaren, Venen und Lymphgefäßen. Das Stratum reticulare ist fest mit dem Stratum papillare verbunden und besteht ebenfalls aus elastischen Fasern sowie kollagenem Bindegewebe. Diese sind für die Straffheit der Dermis verantwortlich.

Neben Hautanhangsgebilden, feinen Nervenfasern und Sinnesrezeptoren, wie die Meißner-Tastkörperchen und Vater-Pacini-Körperchen, befinden sich viele Zellen des Immunsystems in der Schicht. Zu diesen gehören Gewebemakrophagen, Lymphozyten und Mastzellen (Ross und Pawlina, 2006).

1.2.4 Subkutis

Die Aufgaben der aus Bindegewebe und Fettzellen bestehenden Subkutis liegen in der Wärmeisolation und Energiespeicherung. Außerdem dient sie als Verschiebeschicht zwischen Dermis und Körperfaszie (Schwegler und Lucius, 2011).

1.3 Kollagen Typ VII

Das Kollagen Typ VII besteht aus drei identischen Alphaketten, die sich jeweils aus einer zentralen 145 kDa kollagenösen tripelhelikalen Domäne und zwei angrenzenden nichtkollagenösen Domänen zusammensetzen. Die 145 kDa aminoterminalen nichtkollagenösen Domäne wird als NC1 und die kleinere 34 kDa carboxylterminale Domäne als NC2 bezeichnet (Burgeson, 1993; Keene et al., 1987). In der extrazellulären Matrix bildet das Typ VII Kollagen über Disulfidbrücken stabilisierte antiparallele End-zu-End Dimere, wodurch es zu einer proteolytischen Abspaltung eines Fragments der NC2-Domäne kommt. Durch seitliche Anlagerung mehrerer antiparalleler Dimere bilden sich die Ankerfibrillen (Lapiere et al., 1993). Die NC1 Domäne interagiert mit verschiedenen Bestandteilen der extrazellulären Matrix wie Fibronectin, Laminin 332 und

Kollagen Typ I und IV. Somit wird die Verankerung der Basalmembran an umliegenden Strukturen ermöglicht und stabilisiert die Bindung von der Lamina densa zur Dermis (Chen et al., 1997).

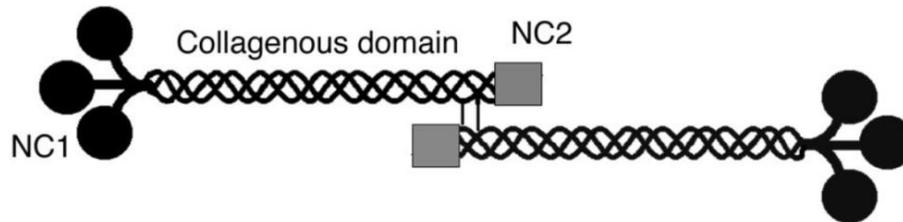


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Kollagen Typ VII. An die kollagenöse tripelhelikale Domäne des Typ VII Kollagens grenzt zum einen die große aminoterminal nichtkollagenöse Domäne (NC1), sowie die kleinere carboxylterminale Domäne (NC2). Zwei Moleküle von antiparallelen End-zu-End Dimeren werden über Disulfidbrücken am carboxyterminalen Ende gebunden. **NC1**: aminoterminal nichtkollagenösen Domäne, **NC2**: carboxylterminale nichtkollagenöse Domäne, **Collagenous domain**: kollagenösen Domäne. Aus: (Sitaru et al., 2005).

Bei der Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) ist in der Mehrzahl der Fälle die NC1 Domäne das Epitop der Autoantikörper (Jones et al., 1995; Lapiere et al., 1993; Woodley et al., 1987). Aber auch die kollagenöse tripelhelikale Domäne, wie bei der milderen, im Kindesalter auftretender Form beschrieben (Trigo-Guzmán et al., 2003), und die NC2 Domäne können betroffen sein (Chen et al., 2012).

1.4 Blasenbildende Autoimmundermatosen

Blasenbildende Autoimmundermatosen sind eine Gruppe von verschiedenartigen Erkrankungen, die durch Autoantikörper gegen desmosale und hemidesmosale Strukturen der Haut oder Gewebetransglutaminase ausgelöst wird (Schmidt und Zillikens, 2011).

| Erkrankung | Autoantigene |
|---|---|
| Pemphigusgruppe | |
| Pemphigus vulgaris | Desmoglein 1, Desmoglein 3 |
| Pemphigus foliaceus | Desmoglein 1 |
| Paraneoplastischer Pemphigus | Desmoglein 1, Desmoglein 3, Plakine |
| IgA-Pemphigus | Desmocollin 1, Desmoglein 3 |
| Pemphigoidgruppe | |
| Bullöses Pemphigoid | BP180, BP 230 |
| Pemphigoid gestationis | BP180, BP230 |
| Schleimhautpemphigoid | BP180, Laminin-332, $\alpha 6\beta 4$ -Integrin |
| Lineare IgA-Dermatose | LAD-1 |
| Lichen planus pemphigoides | BP180 |
| Anti-p200/Laminin $\gamma 1$ Pemphigoid | Laminin $\gamma 1$ |
| Epidermolysis bullosa acquisita | Typ VII Kollagen |
| Dermatitis herpetiformis Duhring | Gewebstransglutaminase |

Abbildung 2: Blasenbildende Autoimmundermatosen mit den dazugehörigen Autoantigenen. In Abhängigkeit des Zielantigens der Autoantikörper ist eine Unterteilung in vier Hauptgruppen möglich, die sich klinisch in epidermalen und subepidermalen Spaltbildungen manifestieren. **BP:** Bullöses Pemphigoidantigenen. **LAD:** Lineare IgA-Dermatose Antigen-1. Modifiziert nach (Kerl et al., 2003).

In Abhängigkeit der befallenden Struktur werden Pemphigus-Erkrankungen, Pemphigoid-Erkrankungen, Epidermolysis bullosa acquisita und Dermatitis herpetiformis Duhring, differenziert. Die Mehrheit der Zielstrukturen wurde bereits identifiziert. Bei den Pemphigus-Erkrankungen entsteht eine intraepitheliale Spaltbildung, wohingegen eine subepidermale Spaltbildung bei Pemphigoid-Erkrankungen, Epidermolysis bullosa acquisita und Dermatitis herpetiformis auftritt (Mihai und Sitaru, 2007; Sitaru und Zillikens, 2005).

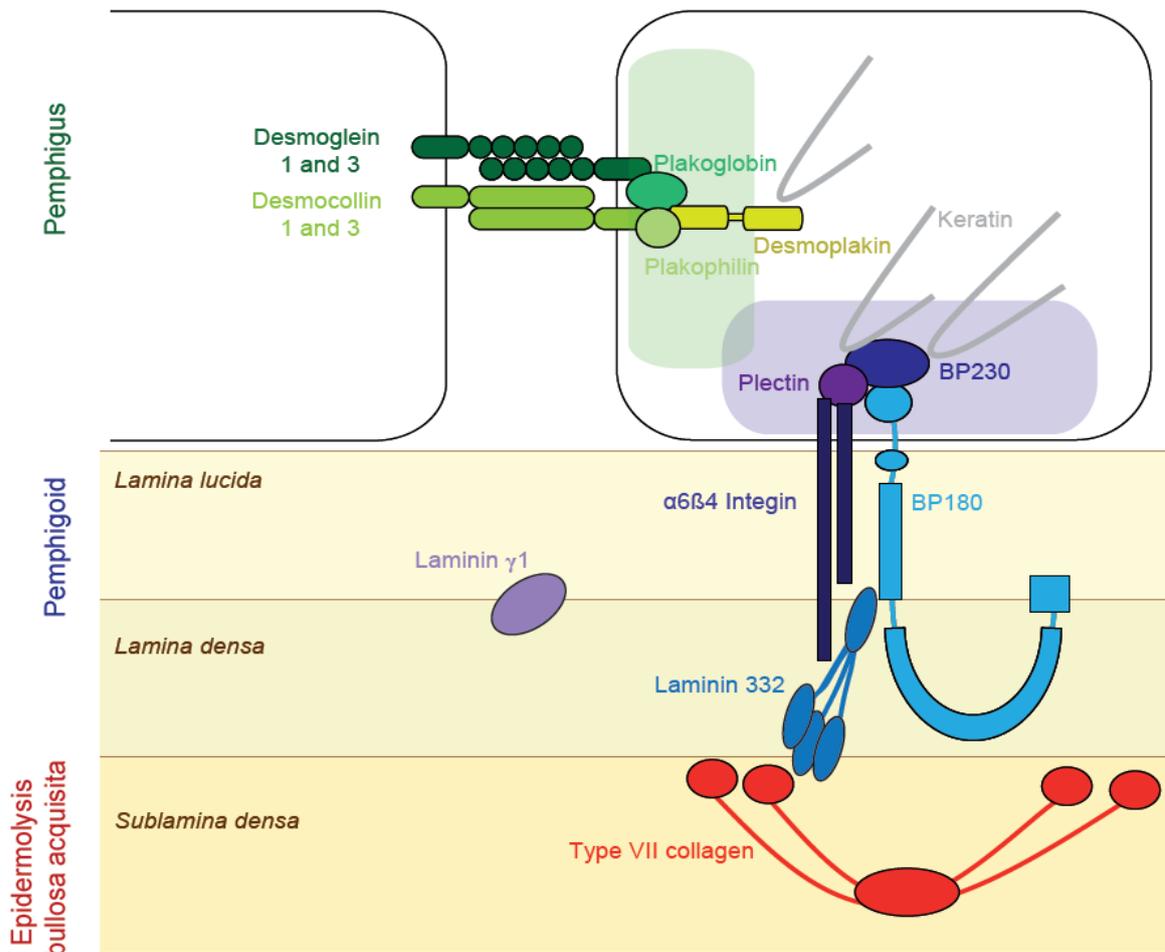


Abbildung 3: Zielantigene der Antikörper bei Autoimmundermatosen. Schematisches Diagramm der desmosomalen, hemidesmosomalen und dermal-epidermalen Junctionszonen. Die Desmosomen der Epidermis sind eine typische Zielstruktur des Pemphigus. Pemphigoiderkrankungen betreffen die hemidesmosomale Bindungen der Basalmembran mit den Keratinozyten. Basal verbindet das in der Sublamina densa liegende Kollagen Typ VII, welches das Antigen bei der EBA repräsentiert, die Dermis mit der Lamina densa; **Type VII collagen:** Kollagen Typ VII Aus: (Bieber et al., 2010).

1.5 Epidermolysis bullosa acquisita

1.5.1 Epidemiologie

Epidermolysis bullosa acquisita ist eine erworbene und chronisch verlaufende subdermale blasenbildende Autoimmundermatose, welche durch Antikörperbindung an das 290 kDa Kollagen Typ VII verursacht wird (Woodley et al., 1988, 1984). EBA ist eine seltene Erkrankung mit einer Inzidenz von 0.2 bis 0.5 auf 1 Millionen Einwohner in Westeuropa (Bernard et al., 1995; Zillikens et al.,

1995). In Deutschland liegt die Prävalenz bei einem Fall auf 1.3 Millionen Einwohnern (Kim et al., 2011). Das Alter des Krankheitsbeginns variiert vom Kindesalter bis zum späten Erwachsenenalter, jedoch in den meisten Fällen zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr. Eine ethnische und geschlechtliche Häufung ist nicht zu beobachten (Gupta et al., 2012).

1.5.2 Genetik der EBA

MHC Genotypisierung und klinische Beobachtungen von EBA Patienten deuten auf einen genetischen Einfluss bei der Krankheitsentstehung hin. In Mausexperimenten konnte diese Annahme bestätigt werden. Bestimmte MHC-Allele werden mit der EBA assoziiert. So konnte HLA-DR2 und HLA-DRB1*15:03 mit der Erkrankung in Verbindung gebracht werden (Gammon et al., 1988; Zumelzu et al., 2011). Des Weiteren konnten mehrere EBA Fälle innerhalb einer Familie beobachtet werden, was auf eine genetische Determinierung der EBA Suszeptibilität hindeutet (Noe et al., 2008).

1.5.3 Pathogenese und die Rolle des Kollagen Typ VII

EBA ist gekennzeichnet durch die Autoimmunität gegen das Kollagen Typ VII, welches den Großteil der Ankerfibrillen bildet. Letztere befestigen die Epidermis zusammen mit der Basalmembran an das darunterliegende Stratum papillare der Dermis. Antikörper gegen das Kollagen Typ VII mit anschließender Entzündungsreaktion können ungenügende Haftung oder Spaltbildung zwischen Dermis und Epidermis zur Folge haben (Hashimoto et al., 2012).

1.5.4 Entstehung des klinisches Bildes

Obwohl die Pathogenese auf molekularer Ebene noch nicht vollständig verstanden wurde (Hashimoto et al., 2012; Yancey, 2005), gibt es zwei Hypothesen zur Entstehung des klinischen Bildes der EBA. Bei der inflammatorischen Form geht man davon aus, dass an einer oder mehreren Domänen des Kollagen Typ VII

gebundene Antikörper eine Immunantwort auslösen und so eine Destruktion der Verbindungsstrukturen der DEJ und Blasenbildung zur Folge haben (Chen et al., 2012). Für die dermo-epidermale Spaltbildung sind hauptsächlich IgG1 und IgG3 verantwortlich, nicht aber IgG2 und IgG4 (Recke et al., 2010). Dieser Vorgang wird afferente Phase genannt. An der Entzündungsreaktion beteiligt sind das Komplementsystem, verschiedene Zytokine und polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN). Letztere migrieren aus der Blutbahn zum Ort der Entzündung und sekretieren ROS und Enzyme wie Elastase und Gelatinase B, welche in der efferenten Phase die Spaltbildung induzieren (Shimanovich et al., 2004).

Bei der klassischen mechanobullösen Form der EBA kommt es ebenfalls zur Bindung von Autoantikörpern an das Kollagen Typ VII, jedoch wird aufgrund der geringen Entzündungsaktivität ein anderer Pathomechanismus als bei der inflammatorischen Variante vermutet. So könnten Antikörper am NC1 direkt die Interaktion zwischen Kollagen Typ VII und Bestandteilen der DEJ, unter anderem Laminin-332, Kollagen Typ IV und Fibronectin, stören (Chen et al., 1999, 1997; Gammon et al., 1993). Das erklärt die Fragilität der betroffenen Haut, bei der bereits geringe Traumata zum klinischen Bild der subepidermalen Blasenbildung führen (Kim et al., 2011).

1.5.5 Klinik

Die Hautmanifestation von EBA ist sehr heterogen und kann in zwei Hauptgruppen unterteilt werden. Dazu zählen die mechanobullöse (klassisch, nicht-entzündlich) und die entzündliche EBA.

1.5.6 Mechanobullöse Form

Diese Variante der EBA betrifft annähernd ein Drittel der Patienten und zeichnet sich durch bereits leichtes Trauma verursachte Erosionen und pralle Blasen aus, die mit Narben und Milienbildung ausheilen und meist an der Streckseite der Akren, Ellenbogen und Sakralregion auftreten. Des Weiteren werden häufig

Nageldystrophien, Mundschleimhautbefall und Depigmentierung beschrieben. Schwerere Formen werden mit der Klinik der vererblichen dystrophischen Epidermolysis bullosa acquisita verglichen, wogegen leichtere Formen der Porphyria cutanea tarda ähneln (Buijsrogge et al., 2011; Kim et al., 2011; Lam und Vleugels, 2013).

1.5.7 Inflammatorische Form

Die entzündliche Variante der EBA betrifft in etwa zwei Drittel der Patienten. Die klinische Manifestation ähnelt unterschiedlichen Autoimmundermatosen, wie bullöses Pemphigoid, dem Schleimhautpemphigoid, der linearen IgA-Dermatose und dem Brunsting-Perry Pemphigoid.

Typisch sind stammbetonte, weit verbreitete vesikobullöse Erosionen, die mit starkem Pruritus einhergehen. Auch Extremitäten und intertriginöse Hautflächen sind betroffen. Im Gegensatz zur mechanobullösen heilt die inflammatorische Form ohne oder mit nur geringer Narben- und Milienbildung ab (Buijsrogge et al., 2011; Gupta et al., 2012; Kim et al., 2011).

Patienten berichten über starke Schmerzen und aufgrund der häufig auftretenden Läsionen an Händen und Füßen kommt es zu Einschränkungen im Alltag und führt oftmals zur Arbeitsunfähigkeit (Engineer und Ahmed, 2001).



Abbildung 4: Klinisches Bild der EBA. Blasenbildung und Erosionen mit erythematösen und trophischen Plaques (a, b) Oraler Schleimhautbefall durch EBA (c) Durch wiederholte Minortraumata entstandene pralle Blasenbildung im Achillessehnenbereich (d) Multiple erosive Läsionen am Rücken und Gesäß (e). Aus: (Ishii et al., 2010).

1.5.8 Diagnose

Die Diagnose beruht hauptsächlich auf der Präsentation des klinischen Bildes, der durch direkte Immunfluoreszenz detektierten gewebegebundenen Antikörper in Form von u-Zacken und der im Blut zirkulierenden Antikörper gegen Kollagen Typ VII (Ludwig, 2013).

1.5.9 Histologie

Die Histologie der nichtinflammatorischen klassischen Variante zeigt sich als subepidermale Blase mit intakten dermalen Papillen mit nur wenigen bis keinen infiltrierenden Entzündungszellen. Wohingegen sich zwar bei der entzündlichen Variante an selber Stelle die Spaltbildung zeigt, jedoch zusätzlich mit in das Gewebe eingewanderten Lymphozyten, Monozyten sowie neutrophilen und eosinophilen Granulozyten am Blasenboden und den Seiten. Die PMN dominieren

das entzündliche Infiltrat. Anhand der Histologie ist aufgrund der Ähnlichkeit zu anderen Autoimmundermatosen keine zuverlässige Diagnose möglich (Kerl et al., 2003; Schmidt und Zillikens, 2011).

1.5.10 Direkte Immunfluoreszenz (DIF)

Die Gewebeentnahme für die direkte Immunfluoreszenz bei EBA Patienten erfolgt nicht direkt in den Hautdefekten, sondern periläsional. Häufig kann eine IgG Ablagerung an der dermo-epidermalen Junktionszone (DEJ) beobachtet werden, jedoch auch Faktor B, Komplement (C3 und C5), Properdin, IgA und IgM wurden mittels der Immunfluoreszenzen detektiert (Smoller und Woodley, 1992; Yaoita et al., 1981). Die Färbung sollte sich als linear fluoreszierende Bande an der DEJ zeigen und lässt sich bei 93 % der Patienten darstellen (Ludwig, 2013).

Um andere Autoimmundermatosen mit ähnlichem Fluoreszenzbild auszuschließen, können bei starker Vergrößerung u-Zacken und n-Zacken unterschieden werden. Während n-Zacken z.B. beim bullösen Pemphigoid auftreten, sind u-Zacken spezifisch für EBA (Vodegel et al., 2004).

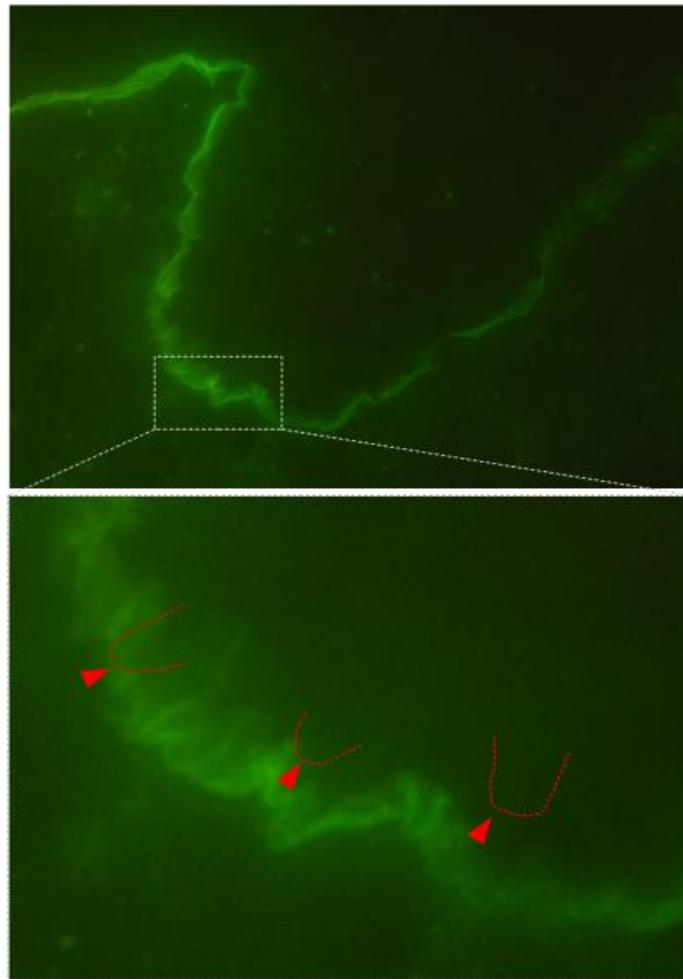


Abbildung 5: Mikroskopisch vergrößerte Photographie von U-Zacken in der direkten Immunfluoreszenz. Bei einer durch EBA betroffenen Haut wurden die IgG-Antikörper angefärbt und unter dem Mikroskop 400x vergrößert. Zu sehen sind im Bereich der DEJ gebundene Antikörper. In dem weiter vergrößertem Bildausschnitt unten sind die U-Zacken durch rote Linien verdeutlicht. Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Ludwig.

1.5.11 Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)

Die IIF kann zur Detektion von im Patientenserum zirkulierenden Antikörpern benutzt werden. Hierfür werden meist humane Hautschnitte verwendet, die mit 1 M NaCl bei 4 °C für drei Tage vorbehandelt wurden, wodurch eine artifizielle Spaltbildung entsteht (Ghohestani RF et al., 1997). Am Blasenboden stellen sich dann die markierten gebundenen Antikörper als fluoreszierende Bande dar, was die Sublamina densa kennzeichnet. Die Antikörper gehören meistens zur IgG1- und IgG3-Subklasse (Ishii et al., 2010).

1.5.12 Immunelektronenmikroskopie

Die Immunelektronenmikroskopie stellt eine sichere Methode zur Diagnose einer EBA dar. Bei der Betrachtung von Patientenhautproben präsentieren sich Antikörper und Komplement an der Lamina densa sowie Sublamina densa, was eine Spaltbildung genau unterhalb dieser Strukturen zu Folge hat und pathognomonisch für EBA ist (Nieboer et al., 1980; Yaoita et al., 1981). Selten zeigen Patienten eine Spaltbildung in der Lamina lucida (Fine et al., 1989). In den meisten Fällen binden die Antikörper N-terminale nicht-kollagenöse (NC1) Domänen des Typ VII Kollagens in der Lamina densa. Seltener kommt es zur Bindung an der NC2 Domäne unterhalb der Lamina densa (Ishii et al., 2004).

1.5.13 Western Immunoblot

Beim Immunoblot werden Extrakte der Basalmembran der Haut oder aus Zellkulturen durch Elektrophorese auf eine Membran transferiert und fixiert. Die präparierte Membran wird mit Serum eines EBA Patienten und einem Kontrollserum inkubiert. Die Antikörper aus dem EBA-Serum binden an der 290 kDa Bande, welche die Alphakette des Typ VII Kollagens beinhaltet. Meistens stellt sich eine 145 kDa Bande dar, welche das Hauptepitop der EBA-Antikörper repräsentiert und aus der aminoterminalen NC1 Domäne des Typ VII Kollagens besteht (Jones et al., 1995; Lapierre et al., 1993; Woodley et al., 1988, 1984).

1.5.14 Enzym-Linked Immune Assay (ELISA)

Eine zuverlässige Methode stellt der ELISA dar. Hierfür wird eine Mischung von rekombinanten NC1 und NC2 Domänen des Typ VII Kollagens benutzt, auf die mit einer Sensitivität von 93,8 % und Spezifität von 98,1 % die EBA-Seren reagieren (Saleh et al., 2011). Des Weiteren bestehen die Vorteile in der schnellen Durchführung eines ELISA, der geringen Menge an benötigtem Serum (10-20 µl) und der im Gegensatz zu den anderen Methoden hohen Sensitivität bei niedrigen Titern (Gupta et al., 2012).

1.5.15 Therapie

Die Behandlung der EBA, im Besonderen der mechanobullösen Form, stellt sich als äußerst schwierig dar. Patienten mit schwerem Verlauf neigen zu kompliziert zu behandelnden Rückfällen. Aufgrund der geringen Prävalenz gibt es keine klinische Studien zur Behandlung und eine definierte Leitlinientherapie existiert nicht. Behandlungsempfehlungen beruhen meist auf den Erfahrungen der auf Autoimmundermatosen spezialisierten Kliniken (Engineer und Ahmed, 2001; Kirtschig G. et al., 2002). Die am häufigsten verwendete systemische Behandlung erfolgt durch Kortikosteroide, bei denen insbesondere in Kombination mit Colchicin und Dapsone gute Behandlungserfolge berichtet wurden. Therapierefraktäre Fälle konnten erfolgreich mit intravenös verabreichten Immunglobulinen, Immunadsorption und dem Anti-CD20 Antikörper Rituximab behandelt werden (Kim und Kim, 2013; Kim et al., 2011). Viele Literaturen empfehlen als First-Line-Therapie eine Colchicinbehandlung, da im Vergleich zu anderen Therapiekonzepten die erwarteten Nebenwirkungen milder sind und sie gegen die entzündliche sowie klassische EBA Form effektiv ist (Cunningham et al., 1996; Megahed und Scharffetter-Kochanek, 1994). Immunsuppressiva wie Azathioprin, Methotrexat, Mycophenolat-Mofetil, Cyclophosphamid und Cyclosporin kommen als Adjuvanz zu den Kortikosteroiden zum Einsatz. Ein Effekt der Immunsuppressiva ist die mögliche Dosisreduktion des Kortikosteroids (Schmidt und Zillikens, 2011).

Durch das zunehmende Verständnis des Pathomechanismus werden neue Therapieansätze erprobt, die gezielt an der Entstehungskette angreifen und die oben beschriebene unspezifische Therapie möglicherweise ablösen könnten.

1.6 Zytokine in der EBA

1.6.1 Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)

GM-CSF ist ein wichtiger hämopoetischer Wachstumsfaktor und Immunmodulator. Mithilfe des GM-CSF's werden zirkulierende PMN, Monozyten und Lymphozyten zum Ort der Infektion rekrutiert und es bewirkt dort eine Differenzierung von Vorläuferzellen zu Granulozyten und Makrophagen. GM-CSF wird eine signifikante Rolle bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen zugesprochen (Shi et al., 2006). So wurde es zum Beispiel mit rheumatoider Arthritis und anderen Autoimmunerkrankungen durch die Aktivierung von PMN mit der Krankheitsentstehung in Verbindung gebracht (Campbell et al., 2000).

Weitere Funktionen sind zum einen die Stimulation der Granulozyten- und Makrophagensekretion von proinflammatorischen Zytokinen IL-1 und TNF- α sowie der gesteigerten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Eine erhöhte Ausschüttung von entzündungsfördernden Arachidonsäuremetaboliten durch GM-CSF wurde beschrieben (Fuhler et al., 2007; Weisbart et al., 1987) und die Rolle als entzündungsfördernder Mediator durch Blockung von GM-CSF in Studien bestätigt (McQualter et al., 2001). Des Weiteren unterstützt der GM-CSF die PMN bei der Migration aus den Gefäßen in das Entzündungsgewebe (Cook et al., 1989; Hamilton, 1993). Eine Verringerung der Autoantikörperproduktion konnte in Mausversuchen durch Blockade des GM-CSF beobachtet werden (Samavedam et al., 2014).

Aufgrund der proinflammatorischen Eigenschaften, vor allem auf PMN, wird angenommen, dass GM-CSF auf die Entstehung des klinischen Bildes der EBA einen Einfluss hat.

1.6.2 Gamma Interferon (IFN- γ)

IFN- γ ist ein Zytokin, welches von natürlichen Killerzellen, T-Helferzellen, zytotoxischen Zellen und dendritischen Zellen, Makrophagen und PMN auf ein Immunstimulus oder durch Zytokinaktivierung von z.B. IL-12 sekretiert wird (Hanada und Yoshimura, 2002; Yamada et al., 2011). Dieses Interferon hat

antivirale und immunmodulatorische Effekte und antitumorale Eigenschaften. Die immunmodulatorischen Fähigkeiten haben Einfluss auf viele Teile der Immunantwort. So aktivieren sich z.B. Makrophagen zu Beginn einer Infektion untereinander mit IFN- γ , was zur vermehrten Antigenpräsentation führt. Des Weiteren aktiviert Gamma Interferon die natürlichen Killerzellen und induziert die IgG2a- und IgG3-Sekretion aus Plasmazellen (Schroder et al., 2004). Auch wurde die Aktivierung von NF- κ B durch IFN- γ beschrieben (Boehm et al., 1997). Auf PMN hat IFN- γ einen aktivierenden Effekt. So konnte beobachtet werden, dass IFN- γ die Phagozytose sowie Chemotaxis und somit Migration induziert und die Sekretion von ROS stimuliert (Schroder et al., 2004).

1.7 Interleukin 8 (IL-8)

IL-8 ist ein Zytokin, das von Epithelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und Monozyten, die einem entzündlichen Stimulus ausgesetzt sind, produziert wird. Das IL-8 hat einen aktivierenden Einfluss auf PMN, welches eine Exozytose, Chemotaxis und eine Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies beinhaltet (Godaly et al., 1997). Die Signaltransduktion von IL-8 auf die PMN ist G-Protein vermittelt über den CXCR-Rezeptor 1 und 2. Es konnte in Experimenten gezeigt werden, dass nach intradermaler Injektion von IL-8 eine stark ausgeprägte Akkumulation von PMN folgte. Nach bereits 15 min. war ein signifikanter Effekt zu messen, der bis 10 Stunden nachzuweisen war (Baggiolini and Clark-Lewis, 1992).

1.8 JAK-STAT-Signalweg

Über die JAK-STAT-Signaltransduktion werden von bestimmten extrazellulär gebundenen Zytokinen und Hormonen Signale zu den im Nucleus liegenden Promotoren weitergeleitet. Durch die extrazelluläre Bindung eines Liganden am Rezeptor entsteht durch Wechselwirkungen ein Rezeptordimer, welches diesem den Namen verlieh (Janus: römischer doppelgesichtiger Gott der Torbögen und öffentlichen Durchgänge) (Berg et al., 2003).

Nach der Dimerisierung kommt es zur gegenseitigen Phosphorylierung von Tyrosinen der Januskinasen und es entsteht ein Kontakt zu den Src-homology 2 (SH2) Domänen der Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription (STATs). Darauf folgt die Phosphorylierung und Bindung zweier STATs, welche als Dimer in den Zellkern als Transkriptionsfaktor wandern und die Expression des Zielgenes induzieren.

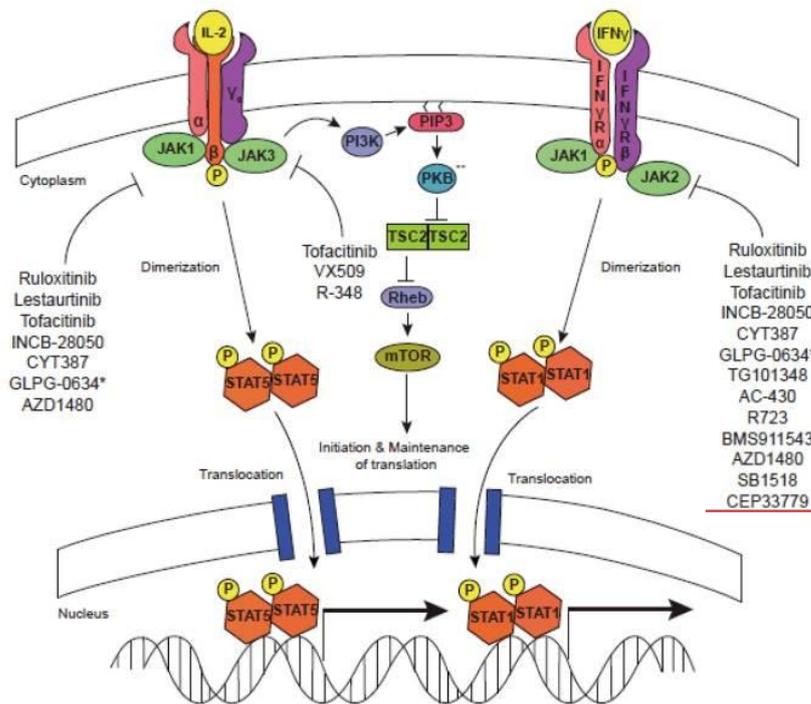


Abbildung 6: Januskinase-Inhibitoren blocken den Zytokinsignalweg. Die Bindung der Zytokine an deren spezifischen Rezeptor führt zur Phosphorylierung der intrazellulären Domäne des Tyrosinrezeptors durch die zugehörigen JAKs. Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription (STATs) binden daraufhin am Rezeptor und werden ebenfalls phosphoryliert. Es folgt die Dimerisierung, Translokation und letztendlich die Regulierung der Gentranskription. **Dimerization:** Dimerisierung, **Translocation:** Translokation, **Cytoplasm:** Zytoplasma. Aus: (O’Shea et al., 2013).

1.8.1 JAK2-Inhibitor CEP-33779

Der bei den Experimenten dieser Arbeit verwendete CEP-33779 ist ein oral verfügbarer, hochspezifischer JAK2-Inhibitor, der in höheren Konzentrationen STAT1, STAT3, STAT4 und STAT5 hemmt (John J O’Shea und Murray, 2008; Stump et al., 2011). JAK2 dient als Rezeptor für Erythropoetin, Thrombopoetin, GH (Growth Hormon), IL-3 und IL-5, den Granulozyten-Monozyten-Kolonie-

stimulierenden Faktor (GM-CSF) die gp130 Rezeptor Familie wie IL-6, IL-11, OSM und LIF, die IL-10 Familie mit IL-10, 19, 20, 22, 24 und die IL-12 Familie mit IL-12 und IL-23 sowie IFN- γ . Somit spielt JAK2 eine essentielle Rolle, neben entzündungsmodulierenden Funktionen, bei der Bildung der Blutbestandteile (Kisseleva et al., 2002; O'Shea et al., 2002; Schindler et al., 2007).

Erste Mausversuche zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen mittels CEP-33779 sind bereits erfolgt. So wurden bei mit rheumatoider Arthritis induzierten Mäusen eine Reduktion von Gewebeerstörung, Knochendegeneration, Synovialinflammation und Osteoarthritis beobachtet (Stump et al., 2011). Bei Mäusen mit induzierten systemischem Lupus erythematoses (SLE) konnte durch Behandlung eine Lebensverlängerung erreicht und die Entwicklung einer Glomerulonephritis verhindert werden. Die Verringerung der Serumspiegel von den proinflammatorischen Zytokinen IL-12, IL-17A, IFN- α , IL-1 β , und TNF- α wurden unter Therapie gemessen (Lu et al., 2011).

1.9 Ziele dieser Arbeit

Die Therapie der EBA ist nach heutigem Stand auf die allgemeine Immunsuppression beschränkt, welche mit vielen Nebenwirkungen behaftet ist und häufig zu keiner zufriedenstellenden klinischen Verbesserung führt. Trotz Behandlung sind Rezidive nicht selten (Engineer und Ahmed, 2001). Neue Therapiekonzepte, die spezifisch in den Prozess der dermal-epidermale Spaltbildung eingreifen, könnten Vorteile in Hinsicht auf Wirksamkeit und Nebenwirkungen haben.

An der Entzündungsreaktion sind das Komplementsystem, die Autoantikörper, Zytokine und PMN beteiligt, wobei letztere die Haupteffektorzellen für die dermal-epidermale Spaltbildung darstellen (Chiriac et al., 2007). Die Aktivierung führt zur Degranulation, wodurch unter anderem die Matrix-Metalloproteasen Elastase und Gelatinase B ausgeschüttet werden. Zusammen mit ROS sind das die ursächlichen Mediatoren der Pathogenese der EBA (Kopecki et al., 2013, 2011; Shimanovich et al., 2004). Ein möglicher Therapieansatz wäre die Hemmung der

PMN im Hinblick auf die Sekretion der Enzyme und Migration aus den Gefäßen zum Entzündungsgeschehen.

In dieser Arbeit soll der Einfluss eines JAK2-Inhibitors auf die Aktivität der PMN gezeigt werden. Neben Interaktion mit Fremdorganismen oder Immunkomplexen aktivieren verschiedene Zytokine die PMN. Zu diesen zählen, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, Tumornekrosefaktor α , GM-CSF, G-CSF und IFN- γ (Schroder et al., 2004; Witko-Sarsat et al., 2000). Der Tyrosinrezeptor des JAK/STAT-Signalwegs dient vielen dieser Zytokine als Bindungsstelle (Kisseleva et al., 2002), wobei das Hauptaugenmerk auf den GM-CSF und IFN- γ fällt. Eine Hemmung dieser Signalwege könnte die positive Rückkopplung der PMN unterdrücken und somit deren Aktivität reduzieren. Aufgrund der guten Ergebnisse des CEP-33779 in vorangegangenen Studien zur Behandlung der Autoimmunerkrankungen SLE und rheumatoider Arthritis, fiel die Wahl auf diesen Inhibitor (Lu et al., 2011; Stump et al., 2011). In nachfolgend beschriebenen in-vitro-Experimenten soll die mögliche Wirksamkeit des JAK2-Inhibitors auf die Pathogenese der dermo-epidermalen Spaltbildung bei EBA untersucht werden.

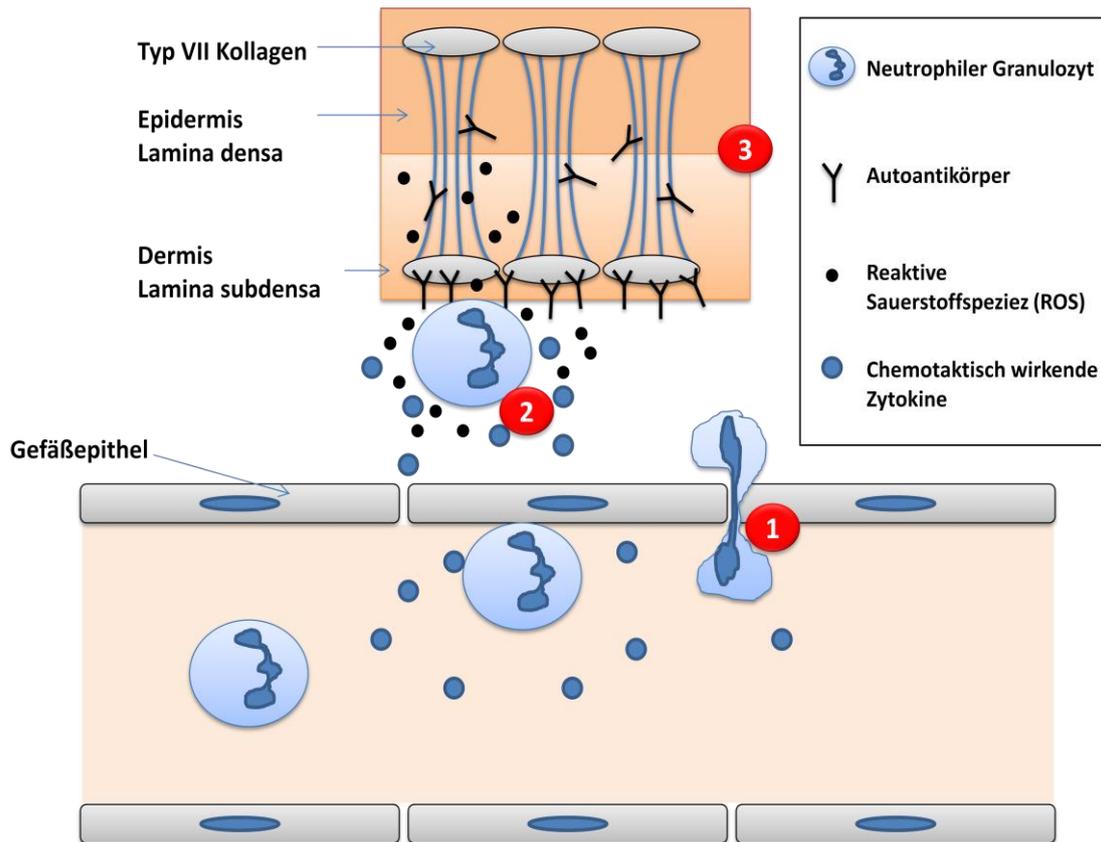


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Pathogenese der EBA. Markierungen (1)-(3): experimentelle Vorlagen zur Testung der Wirkung von CEP-33779. Autoantikörper binden an das Kollagen Typ VII und verursachen eine Entzündungsreaktion. (1) Durch chemotaktisch agierende Zytokine migrieren PMN zum Ort der Entzündung. Die Migration durch Endothel kann mit einem Migrations-Assay gemessen werden, bei dem die Anzahl der durchwandernden Granulozyten durch eine dem Endothel nachempfundenen Membran zwischen zwei Kammern bestimmt wird. (Kawa et al., 1997; Mul et al., 2000). (2) Der ROS-Assay ist ein Verfahren das die Sekretion der reaktiven Sauerstoffspezies von aktivierten PMN quantifizieren kann. Eine mögliche Auswirkung des Inhibitors auf die Sekretion kann durch diesen Versuch ermittelt werden. (Yamazaki et al., 2011). Der Elastase-Assay ist ein ELISA-Verfahren, durch das die sekretierte Elastase, welche die DES verursacht, bestimmt werden kann (Clark-Lewis et al., 1991). (3) Bei einem Kryostatschnitt-Experiment kann histologisch die dermo-epidermale Spaltbildung auf Gewebeschnitten beobachtet werden. Durch Inhibition der PMN kann dieser Prozess unterbrochen werden (Mihai und Sitaru, 2007).

Ergänzend wird die eventuelle Toxizität des JAK2-Inhibitors sowie des Lösungsmittels DMSO auf die PMN, nach spezieller Färbung mittels Durchflusszytometrie, getestet (Rieger et al., 2011; van Eeden et al., 1999).

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Pharmaka

| | |
|-----------------------------|---------------------------------------|
| Heparin-Natrium-25.000 I.E. | <i>Ratiopharm GmbH, Ulm</i> |
| CEP-33779 JAK2-Inhibitor | <i>Teva Pharmaceutical Industries</i> |

2.2 Chemikalien

| | |
|---|---|
| Ammoniak-Lösung | <i>Merck KgaA, Darmstadt</i> |
| Aqua dest. | <i>Apotheke UKSH, Campus Lübeck</i> |
| BSA (bovine serum albumin) | <i>Sigma-Aldrich, Hamburg</i> |
| Dextran T-500 | <i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe</i> |
| Dimethylsulfoxide (DMSO) | <i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i> |
| Essigsäure-Alkohol | <i>Merck KgaA, Darmstadt</i> |
| Ethanol 70 % | <i>Apotheke UKSH, Campus Lübeck</i> |
| Formyl-Methionyl-Leucyl- Phenylalanin (fMLP) | <i>Sigma-Aldrich, Hamburg</i> |
| Formaldehyd-Lösung 5 % | <i>Merck KgaA, Darmstadt</i> |
| Hämatoxylin | <i>Merck KgaA, Darmstadt</i> |
| Histopaque 1119 | <i>Sigma-Aldrich, Hamburg</i> |
| Luminol | <i>Sigma-Aldrich, Hamburg</i> |
| Lymphocyte Separation Medium 1077 | <i>PromoCell GmbH, Heidelberg</i> |
| Octoxinol 9 (Triton X) | <i>E. Merck, Darmstadt</i> |
| Percoll Density Centrifugation Media | <i>GE Healthcare, Hamburg</i> |
| Polymorphprep | <i>Axis-Shield, Heidelberg</i> |
| Tissue-Tek O.C.T.TMCompound | <i>Sakura Finetek Germany GmbH</i> |
| Trypan Blau | <i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i> |
| Xylol | <i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i> |

2.3 Puffer und Medien

| | |
|--------------------------------------|--|
| Blockingpuffer | <i>1 % Biotinfreies BSA, gelöst in PBS-T</i> |
| Carbonate buffer (Adsorption buffer) | <i>5.3 g Na₂CO₃, 5.04 g NaHCO₃ gelöst in 1 l dest. Wasser. pH auf 9.6 mit 1N HCl titriert</i> |
| Chemilumineszenzmedium | <i>RPMI ohne Phenol rot, stab. L-Glutamin, 25 mM HEPES</i> |
| Glycinpuffer | <i>7.52 g Glycin in 1 l dest. Wasser. pH auf 2.8 mit 1N HCl titriert</i> |
| Lysepuffer | <i>PBS 1-fach 20 %, in Aqua dest.</i> |
| PBS (phosphate buffered saline) | <i>8 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 1.44 g/l Na₂PO₄K₂HPO₄ in dest. Wasser, pH auf 7.2 mit Phosphatsäure titriert</i> |
| PBS-T | <i>0.05 ml Tween 20 in 1L PBS</i> |
| RPMI 1640 Medium without L-Glutamine | <i>PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria</i> |
| RPMI-1640 Complete | <i>RPMI-1640 (mit Phenolrot) + 1 % Fetales Kälberserum</i> |
| Waschpuffer | <i>PBS + 0.05 % Tween</i> |

2.4 Verbrauchsmaterialien

| | |
|--|---|
| Aluminiumfolie Paclan | <i>A. Hartenstein Laborbedarf, Würzburg</i> |
| Aqua Spüllösung | <i>Deltaselect GmbH, Dreieich</i> |
| Blutentnahmeröhrchen S-Monovette 9 ml, Kalium-EDTA | <i>Sarstedt, Nümbrecht</i> |
| Deckgläser 24 x 60 mm | <i>G. Menzel, Glasbearbeitungswerk, Braunschweig</i> |
| Einbettungsmedium Tissue-Tek | <i>Sakura Finetek Europe B.V., Zoulerwoude, Niederlande</i> |

| | |
|---|--|
| Einmal-Kanüle BD Microlance 3, 26Gx1/2 | <i>Becton Dickinson GmbH, Heidelberg</i> |
| Einmal-Spritze-1ml BD PlastipakTM | <i>Becton Dickinson GmbH, Heidelberg</i> |
| Einmal-Spritze-20ml BD DiscarditTM II | <i>Becton Dickinson GmbH, Heidelberg</i> |
| ELISA plate Maxisorb | <i>Nunc, Roskilde, Norwegen</i> |
| ELISA Platte seal | <i>Sarstedt AG&Co., Nümbrecht</i> |
| Falcon-Röhrchen 15 ml, 50 ml | <i>Sarstedt AG&Co., Nümbrecht</i> |
| Minisart-Sterile Filter (0.20µm) | <i>Sarstedt AG&Co., Nümbrecht</i> |
| Human PMN Elastase Platinum Elisa-Kit | <i>eBioscience, USA</i> |
| Objektträger 26 x 76 mm/ca. 1mm | <i>Heinz Herenz Medizinalbedarf, Hamburg</i> |
| Objektträger SuperFrost /Plus | <i>G. Menzel, Glasbearbeitungswerk, Braunschweig</i> |
| Parafilm M Laboratory Film | <i>Pechiney Plastic Packaging, Menasha, Wisconsin, USA</i> |
| Pasteurpipette, Glas | <i>Sondheim/Rhön</i> |
| Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,0 ml, 1,5 ml | <i>Eppendorf AG, Hamburg</i> |
| Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml | <i>Sarstedt AG & Co. Nuembrecht</i> |
| Transwell-Platte 3472 clear, 3µl Porengröße | <i>Sigma-Aldrich, Hamburg</i> |

2.5 Verwendete Laborgeräte

| | |
|-------------------------------|--|
| Airsterilisator US PATS | <i>Binder GmbH, Tuttlingen</i> |
| Analysenwaage Analytical Plus | <i>Ohaus Corporation, New Jersey, USA</i> |
| Begasungsbrutschrank | <i>Heraerus Instruments GmbH, Hanau</i> |
| Bio Vortex V1 | <i>lab4you GmbH, Berlin</i> |
| Eindeckautomat Leica CV 5030 | <i>Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar</i> |
| ELISA Plattenlesegerät | <i>Perkin Elmer, CA, USA</i> |
| ELISA Plattenwascher | <i>TECAN, Maennedorf, Switzerland</i> |

| | |
|--|--|
| Elektrische Feinwaage PT 150 | <i>Sartorius AG, Göttingen</i> |
| Eppendorf Research Pipetten | <i>Eppendorf AG, Hamburg</i> |
| Feuchtigkeitskammer | <i>Werner Hassa GmbH, Lübeck</i> |
| Kühlschrank (4°C) / Gefrierschrank (-20°C) | <i>Liebherr International AG, Bulle, Switzerland</i> |
| Gefriertruhe C660 (-80 °C) | <i>New Brunswick Scientific, England</i> |
| Kühlkammer | <i>Viessmann GmbH & Co. KG, Allendorf</i> |
| Kryostat Leica CM 3050 S | <i>Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar</i> |
| Laborabzug captairchem | <i>Erlab Laboreinrichtungen, Wangen</i> |
| Magnetrührer IKA ® RH basic 2 | <i>IKA Werke GmbH, Staufen</i> |
| Mikroskop Olympus BX40 | <i>Olympus Deutschland, Hamburg</i> |
| Mikroskop Wilovert S | <i>Helmut Hund GmbH, Wetzlar</i> |
| Neubauer Zählkammer | <i>A. Hartenstein Laborbedarf, Würzburg</i> |
| pH-Meter ph526 | <i>MultiCal WTW, Weilheim</i> |
| Pipettierhilfe, pipetus®-akku | <i>Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt</i> |
| Schütteltisch Duomax 1030 | <i>Heidolph Instruments, Nürnberg</i> |
| Sterilbank, Biowizard Kojair | <i>W. H. Mahl, Reinraumtechnik GmbH, Magdeburg</i> |
| Vortex Genie 2 | <i>Scientific Industries, Bohemia, New York, USA</i> |
| Wasserstrahlpumpe | <i>Brand GmbH & Co. KG, Wertheim</i> |
| Zentrifuge Varifuge 3.0 R | <i>Haereus Instruments GmbH, Hanau</i> |
| Zentrifuge Biofuge pico | <i>Haereus Instruments GmbH, Hanau</i> |

2.6 Verwendung humaner Biomaterialien

Für sämtliche Experimente in dieser Arbeit wurden PMN benötigt. Die Isolierung der PMN erfolgte aus dem Vollblut von freiwilligen männlichen und weiblichen Spendern im Alter zwischen 24 und 42 Jahren. Einschlusskriterien waren die Verneinung von Vorerkrankungen und aktuelle Medikamenteneinnahme. Die Spender wurden über die Risiken einer peripheren venösen Blutentnahme aufgeklärt.

Die aus Vorhaut bestehenden Proben für die Gefrierschnitte stammen aus der Kinderklinik und wurden für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt.

2.6.1 Humanes Kollagen Typ VII (hCol7) und anti-human-COL7-IgG1

Für die Versuche in dieser Arbeit wurden rekombinante, monoklonale anti-human-COL7-IgG1 und Fragmente der NC1 Domäne der Kollagen Typ VII verwendet. Ihre Herstellung war bereits in unserer Einrichtung etabliert und erfolgte in Zusammenarbeit mit weiteren Laboren. In der Arbeit von Recke et al. ist die Prozedur im Detail beschrieben. Zusammenfassend formuliert wurden aus hCol7 codierenden cDNA Fragmenten Plasmide erzeugt. Diese Vektoren wurden daraufhin in *Escherichia coli*-BL21 transferiert. Die erzeugten Proteine wurden mittels Gluthation Affinitätschromography purifiziert. Auch die anti-human-COL7-IgG1 wurden geklont, exprimiert und isoliert.

2.7 ROS-Assay

2.7.1 Versuchsaufbau

Durch die Aktivierung von PMN durch einen Immunkomplex aus hCol7 und spezifischen Antikörpern vom IgG1-Typ werden neben Zytokinen und Enzymen auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) freigesetzt, welches einen Anteil in der Pathogenese der EBA durch einen gewebeschädigenden Effekt hat (Cedergren et al., 2007).

Die freigesetzte reaktive Sauerstoffspezies kann mittels ROS-Assay und photometrischer Auswertung nach Hinzugabe von Luminol quantifiziert werden. Folglich kann der Einfluss des CEP-33779 in verschiedenen Konzentrationen auf die Freisetzung von ROS aus PMN untersucht werden.

2.7.2 Separation neutrophiler Granulozyten (PMN) aus peripherem Vollblut

Für diesen Versuch wurde peripher entnommenes venöses Vollblut von gesunden männlichen und weiblichen Spendern im Alter von 24 bis 32 Jahren entnommen. Die Gesamtteilnehmerzahl betrug 15, wovon 7 Frauen und 8 Männer waren.

Hierfür verwendete Materialien waren Butterflykanülen und ein 9 ml Röhrchen, welche das Antikoagulans EDTA enthielten.

Im nächsten Schritt wurde pro EDTA-Röhrchen ein 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 6 ml Polymorphprep gefüllt. Dann wurden mit 6 ml Blut mittels akkubetriebener Pipettierhilfe und 10 ml Aufsatz langsam im 45-Grad-Winkel das Polymorphprep überlagert. Die Röhrchen wurden daraufhin bei 1600 rpm in der oben aufgelisteten Zentrifuge (s. Kapitel 2.5), Raumtemperatur und inaktiverer Bremse für 35 Minuten zentrifugiert.

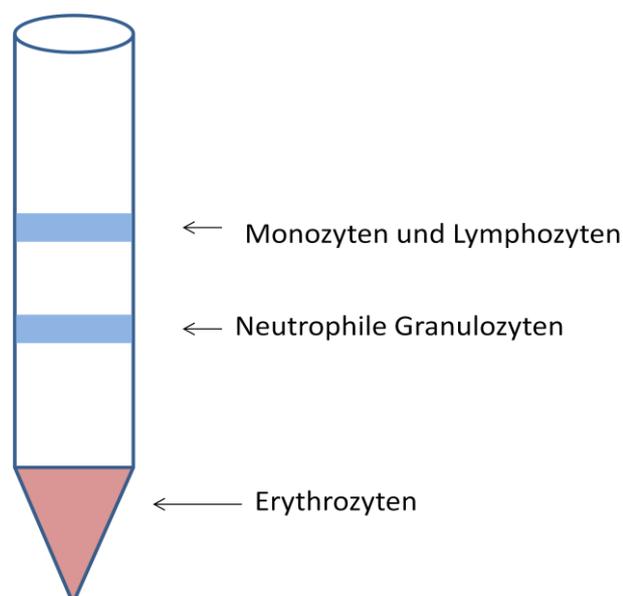


Abbildung 8: Schematische Darstellung der entstandenen Zellbanden nach Zentrifugation von EDTA-Vollblut in Polymorphprep in einem 15 ml Röhrchen. Die Zellbestandteile laufen je nach Größe und Gewicht unterschiedlich weit durch das Polymorphprep bei Zentrifugation.

Durch das Zentrifugieren entstanden weißlich trübe Zellbanden, wobei die oberste Monozyten und Lymphozyten und die zweite von oben PMN beinhalteten. Am Boden des Röhrchens sammelten sich die Erythrozyten in einer Schicht. Die oberste Zellbande, der sog. "Buffy coat", mit darüber befindlichem Plasma wurde mit einer akkubetriebenen Pipettierhilfe und einem 5 ml Aufsatz entnommen und verworfen. Der gesamte Bereich, in dem sich die Granulozytenbande befand, bis zur Erythrozytenschicht am Boden des Röhrchens, wurde mit einer Pipettierhilfe in jeweils ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Hierzu wurde zuerst 5 ml Halbmedium hinzugefügt und daraufhin bis auf 50 ml Gesamtmenge mit RPMI-1640 Medium aufgefüllt. Die Röhrchen wurden 10 Minuten bei 1400 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurde der Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe entnommen, wobei auf eine noch vorhandene Befeuchtung des Pellets zu achten ist. Zu den Pellets wurden jeweils 3 ml Lysepuffer hinzugefügt, mit einer Pipette resuspendiert und nach 30 Sekunden mit RPMI Medium wieder auf 50 ml aufgefüllt. Die Zentrifugenröhrchen kamen wieder für 10 Minuten bei 1400 rpm und Raumtemperatur in die Zentrifuge und der Überstand wurde nach Beendigung aspiriert. Nach dem Hinzufügen von 20 ml CL-Medium zu jedem Pellet wurde mit denselben Einstellungen wie beim vorigen Mal zentrifugiert. Nach dem Aspirieren des Überstandes wurden 3 ml CL-Medium mit einer Pipette in jedes Röhrchen hinzugefügt, gründlich resuspendiert und bis zur Verwendung auf Eis gelegt.

2.7.3 Vorbereitung und Durchführung

Der erste Schritt war die Beschichtung einer 96-Kammer-ELISA-Platte mit dem Antigen Kollagen Typ VII (hCol7). Hierzu wurde die Lösung von 0,7 mg/ml auf 20 µg/ml verdünnt und jeweils 50 µl in die Kammern 5-12 pipettiert. Die Platte wurde daraufhin mit einer klebenden Folie bedeckt und für drei Stunden bei Raumtemperatur auf den Schütteltisch gestellt. Um die nicht an die Platte gebundenen hCol7 Antikörper aus den Kammern zu entfernen, wurde diese durch den ELISA-Plattenwascher mit Programm WHITE mit PBS gespült. Nach diesem Schritt wurden in jede Kammer 100 µl Blockpuffer (PBS + 1 % biotinfreies BSA +

0,05% Tween) pipettiert und über Nacht bei 4 °C auf dem Schütteltisch positioniert.

Am folgenden Tag wurde die Platte wieder mit PBS durch das Waschprogramm WHITE gewaschen. Dann wurde die IgG1-Antikörper gegen das Kollagen Typ VII aus der Stocklösung 1:400 mit Blockpuffer verdünnt und jeweils 100 µl in die Kammern 3 und 4 und 7-12 mit einer Pipette gefüllt (s. Abbildung 9). Die Platte wurde wieder mit der Folie luftdicht verklebt und zur Inkubation eine Stunde bei Raumtemperatur auf den Schütteltisch gestellt.

Der nächste Schritt bestand aus den Vorbereitungen der Lösungen für die nächsten Arbeitsgänge. Als Positivkontrolle der Neutrophilenaktivierung wurde Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) aus der Stocklösung 1:50 mit CL-Medium verdünnt und auf Eis gelegt. Bei der Vorbereitung für die Luminollösung wurden 2 mg Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazindion) in 8 µl NaOH gelöst und mit 1 ml doppelt destilliertem Wasser aufgefüllt. Da Luminol lichtempfindlich ist, wurde Aluminiumfolie zur UV-Licht-Abschirmung um das Röhrchen gewickelt. Kurz vor dem Auftragen der Granulozytensuspension auf die Platte wurden 100 µl Luminol aus der vorbereiteten Suspension hinzugefügt. Nachdem die Platte eine Stunde inkubierte, wurde diese per Hand mit einer Mehrkanalpipette mit CL-Medium gewaschen. Hierzu wurden in jede Kammer 200 µl CL-Medium pipettiert, kurz geschüttelt und anschließend ausgeklopft. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt.

Um den JAK2-Inhibitor in verschiedenen Konzentration einfacher in die verschiedenen Kammern zu pipettieren, wurden die 10 mg/ml Stocklösung zu einer 1:10 (1 mg/ml) und einer 1:50 (0.2mg/ml) Lösung mit DMSO verdünnt.

Nachdem die PMN mit 100 µl Luminol versetzt und alle Ingredienzien vorbereitet wurden, folgte das Pipettieren in die Kammern. Es konnten auf einer Platte Proben von acht Probanden untersucht werden. In die Kammer 1 kam die Positivkontrolle, d.h. 100 µl fMLP-Lösung. In die Kammern 2, 4 und 6 kam die in diesem Versuch angewendete Höchstdosis des Jak2-Inhibitors (100 ng/ml oder 250 ng/ml). In den Kammern 2-12 musste die hinzugefügte Menge stets 100 µl ergeben, z.B. musste zu einer 2 µl Jak2-Lösung in einer Kammer noch 98 µl CL hinzugefügt werden. Da für die Kammern 3, 5 und 7 kein Inhibitor vorgesehen war, wurden diese mit 100 µl CL-Medium befüllt. In die Kammern 8-12 kamen in aufsteigenden Konzentrationen

entweder 5, 25, 50, 75, 100 ng/ml oder 50, 100, 150, 200, 250 ng/ml der vorbereiteten JAK2-Inhibitor Lösung. Im nächsten Arbeitsschritt wurden zügig jeweils 100 µl der mit Luminol versetzten Zellen in jede Kammer pipettiert und umgehend in das auf 37 °C vorgeheizte ELISA-Plattenlesegerät zur photometrischen Auswertung gelegt.

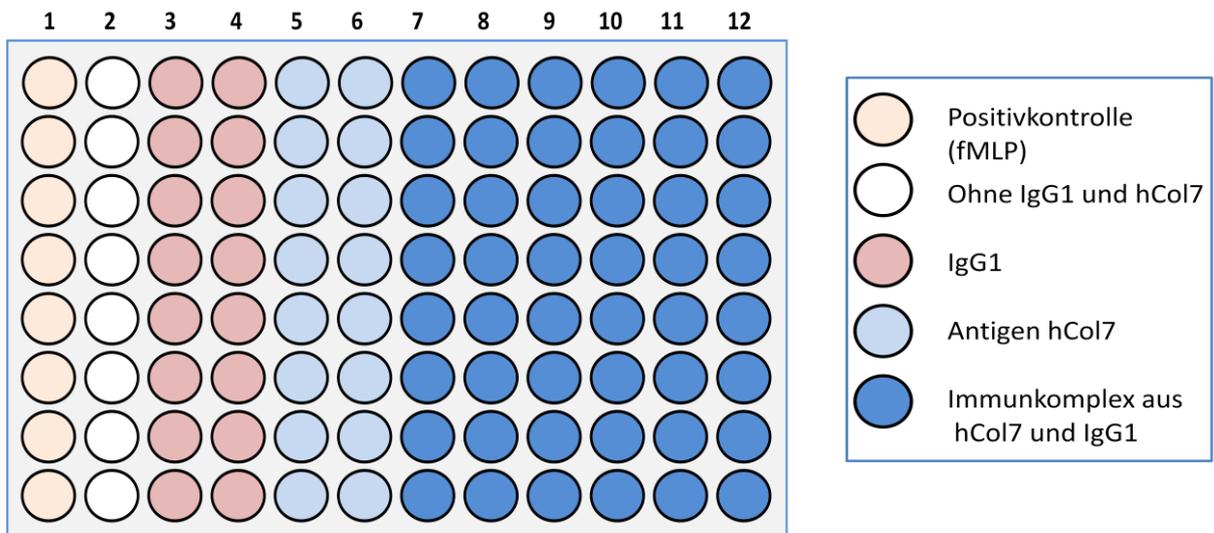


Abbildung 9: Pipettierschema der 96-Kammer-Platte im ROS-Assay. Die verschiedenen Farben repräsentieren die Vorbereitung der Plattenkammern, bevor die PMN hinzugegeben wurden. In die Kammern 8-12 wurden in aufsteigenden Konzentrationen entweder 5, 25, 50, 75, 100 ng/ml oder 50, 100, 150, 200, 250 ng/ml hinzugegeben. In die Kammern 2, 4 und 6 wurde für die Kontrollen die in dem Versuch benutzte Höchstdosis pipettiert. In absteigender Reihenfolge wurden PMN der verschiedenen Spender aufgetragen.

2.7.4 Auswertung

Im ROS-Assay ist es möglich, reaktive Sauerstoffspezieskonzentrationen mit Hilfe einer Chemilumineszenzreaktion durch Luminol zu bestimmen (Yamazaki et al., 2011). Hierbei geht Luminol mit dem ROS eine Bindung ein, die entstehende Lichtemission wird von einem ELISA-Plattenlesegerät ausgewertet und in RLU (Relative Light Unit)/ml angegeben. Diese Messung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 425 nm in 60-Minutenzyklen. Durch den mit dem ELISA-Plattenlesegerät verbundenen Wallac-1420-Manager erfolgte die Auswertung der gemessenen Werte.

2.8 Granulozyten Migration-Assay

Bei einer Entzündung werden chemotaktische Botenstoffe freigesetzt, die PMN dazu bewegen, durch Gefäßendothel zu wandern, um zum Ort des Entzündungsgeschehens zu gelangen. Die sogenannte Migration (Mul et al., 2000).

In diesem Versuch wurde der Einfluss des JAK2-Inhibitors auf die Migration gemessen, indem Granulozytensuspensionen zu unterschiedlichen Bedingungen in Kammern hinzugefügt wurden und die Migration von PMN durch eine Polycarbonatmembran mittels ELISA- Plattenlesegerät quantifiziert wurde.

2.8.1 Vorbereitung und Durchführung

Der erste Schritt war die periphere venöse Vollblutentnahme mittels Butterflykanüle. Hierzu wurden von gesunden Probanden, zwei Frauen und zwei Männern, im Alter zwischen 24 und 42 Jahren zwei 9 ml EDTA-Röhrchen Blut aus der Armbeuge nach medizinischem Standard entnommen. Die 18 ml Blut jedes Probanden wurden mit sterilem PBS bis 25 ml Gesamtmenge aufgefüllt. In einem 50 ml Falcon-Röhrchen wurden 12,5 ml Lymphozyten Separationsmedium vorsichtig auf 12,5 ml Histopaquegradient mit einer akkubetriebenen Pipettierhilfe mit 10 ml Aufsatz überlagert. Es entstanden zwei Phasen. Schließlich wurden die 25 ml Blut-PBS Gemisch ebenfalls mittels Pipettierhilfe im 45-Grad-Winkel langsam aufgetragen und für 30 Minuten bei 1000 rpm und deaktivierter Bremse zentrifugiert.

Zwischenzeitlich wurde die Percollverdünnung vorbereitet. Hierzu wurden zuerst 36 ml Percoll mit 4 ml PBS gemischt, das dann in fünf 15 ml Zentrifugenröhrchen mit RPMI auf eine Konzentration von 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, und 65 % verdünnt wurde. Aus diesen fünf Röhrchen mit jeweils einer entsprechenden Konzentration wurde dann in einem 15 ml Röhrchen ein Gradient angefertigt. Mit der höchsten Konzentration beginnend, 85 %, wurden jeweils 2 ml bei absteigender Konzentration auf die darauf folgende Phase vorsichtig pipettiert. Bei der 65-prozentigen Percollkonzentration wurden abschließend 3 ml aufgetragen.

Durch das Zentrifugieren sind fünf Phasen entstanden. Die oberen drei Schichten mit den enthaltenen Monozyten, Lymphozyten und dem Plasma wurden mit einer Vakuumpumpe und Glaspipette verworfen. Die Phase über der am Boden abgesetzten Erythrozytenschicht wurde mit einer Pipette in ein 50 ml Falcon-Röhrchen transferiert und mit PBS bis 50 ml aufgefüllt. Das Röhrchen wurde für 10 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand über dem durch das Zentrifugieren entstandenen Pellet wurde mit einer Vakuumpumpe mit Glaspipettenaufsatz entfernt und 5 ml RPMI + 1 %FCS hinzugegeben. Das Pellet wurde bis zur Auflösung resuspendiert und jeweils 2,5 ml auf einen Percollgradient vorsichtig aufgetragen.

Der Percollgradient mit der Granulozytensuspension wurde dann bei 2000 rpm und deaktivierter Bremse für 25 Minuten zentrifugiert. Bei diesem Schritt entstanden 6 Banden (s. Abbildung 10). Die obersten Beiden beinhalteten Monozyten und basophile Granulozyten und wurden mit einer Glaspipette unter Sog entfernt. Die dann folgenden drei Banden enthielten die für den Versuch benötigten PMN, die daraufhin mit einer Pipette in ein 50 ml Falcon-Röhrchen übertragen wurden, wobei darauf zu achten war, die am Röhrchenboden abgesetzte Erythrozytenschicht nicht mit zu entfernen.

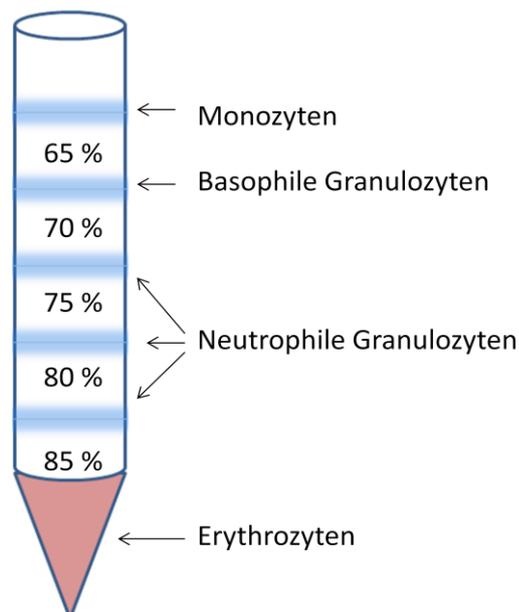


Abbildung 10: Schematische Darstellung der durch den Percollkonzentrationsgradient entstandenen Zellbanden nach Zentrifugation in einem 15ml Röhrchen. Die Zellen wandern während der Zentrifugation je nach Größe und Gewicht unterschiedlich weit durch den Gradienten und sammeln sich zwischen den Konzentrationssprüngen.

Die transferierte Granulozytensuspension wurde wieder mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und bei 2000 rpm 10 Minuten zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde dem Pellet 5 ml RPMI + 1 % FCS hinzugegeben, resuspendiert und anschließend in der Neubauer Zählkammer die Granulozytenzahl per ml bestimmt. Zum Zählen wurden zu 50 µl Zellsuspension 100 µl PBS und 100 µl Trypanblau in ein Eppendorf Gefäß gegeben und aus diesem Gemisch 10 µl in die Zählkammer pipettiert. Bei zehnfacher Vergrößerung wurden nun die in vier Echkammern enthaltenen Granulozyten gezählt und durch vier dividiert, um den Mittelwert zu erhalten. Der Mittelwert wird nun zuerst mit 10^4 multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu erhalten und dann mit 50 multipliziert, um die für die Zählung angesetzte Verdünnung auszugleichen. Die Werte lagen zwischen 510×10^4 und 740×10^4 im Mittel bei 588×10^4 . Daraufhin wurde die 24-Kammern-Transwell-Platte mit einlegbaren Polycarbonatmembranen und 3 µm Porengröße vorbereitet. Hierzu wurde in Kammer Nummer 1 17 µl DMSO pipettiert und mit 593 µl RPMI + 1 % FCS auf 600 µl aufgefüllt. Hiermit wurde der Einfluss von DMSO, dem Lösungsmittel des Inhibitors, auf die Migration getestet. Für die Positivkontrolle kam in Kammer 2 Interleukin 8 (IL-8), welches unter anderem auf PMN chemotaktisch wirkt und deren Migration induziert (Clark-Lewis et al., 1991). Hier wurde, wie in allen weiteren Kammern auch, der Inhalt bis 600 µl mit RPMI aufgefüllt. Nun wurde in einer Konzentration von 5, 25, 50, 75, und 100 ng/ml der JAK2-Inhibitor jeweils in eine Kammer der Transwellplatte in die IL-8 Suspension pipettiert. Anschließend wurden die Membranen in die Kammern gelegt und in jede Kammer, ohne die Membran mit der Pipettenspitze zu berühren, 100 µl von der PMN-Suspension gegeben. 600 µl wurden für den Standard in ein Mikroreaktionsgefäß pipettiert. Die fertig vorbereitete Platte und der Standard kamen für 3 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ Gehalt in den Inkubator.

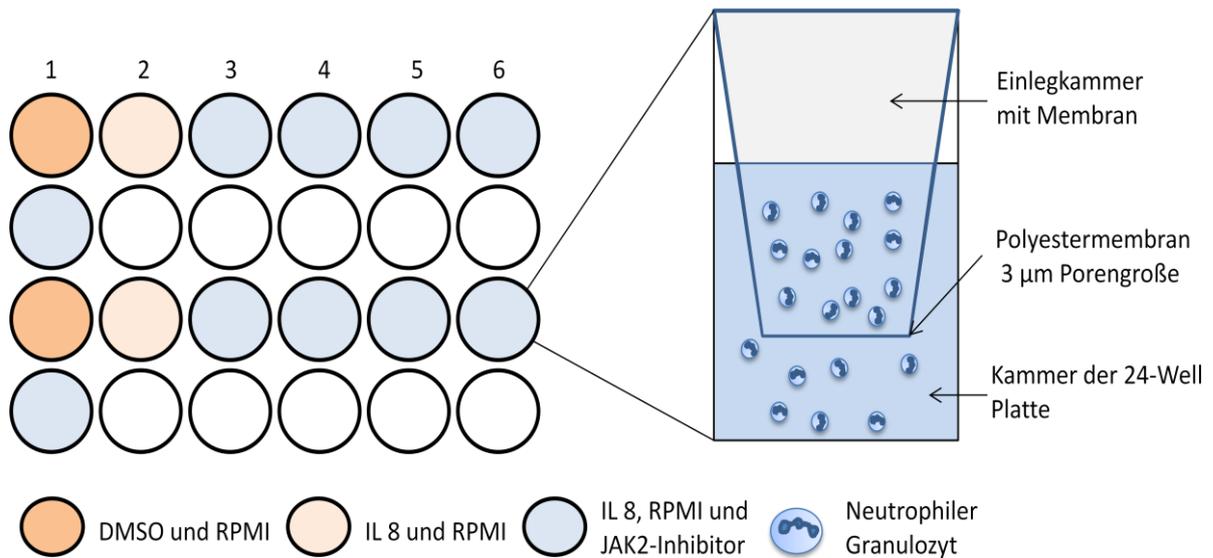


Abbildung 11: Pipettierschema und Prinzip des Migrations-Assays. Die farblich unterlegten Kammern repräsentieren das unterschiedlich vorbereitete Milieu für die Migration der PMN durch die Polycarbonatmembran. Die Kammern 1 und 2 der ersten und dritten Reihe sind die Kontrollen, wobei bei Kammer 1 die Wirkung des JAK2-Lösungsmittels DMSO getestet wurde und Kammer 2 die Positivkontrolle ist. In die hellblau unterlegten Kammern wurden in aufsteigender Konzentrationen 5, 25, 50, 75, 100 ng/ml pipettiert. Es konnten Zellen von zwei verschiedenen Probanden auf einer 24 Kammer-Transwell-Platte getestet werden.

Nach der Inkubationszeit wurde in jede Kammer und in die Standardsuspension 100 µl Triton X (Octoxinol 9) hinzu pipettiert, welches die Granulozyten lysiert. Daraufhin wurde eine durchsichtige, nicht bindende 96-Kammer-ELISA-Platte vorbereitet. Für die Standards wurden in alle Kammern 150 µl RPMI pipettiert, mit Ausnahme der ersten beiden. Anschließend kam in Kammer Nummer 1 dieser zwei Reihen 300 µl der mit Triton X versetzten Zellenlösung des Standards und es wurde eine Konzentrationsreihe erstellt, indem 150 µl mit einer Pipette resuspendiert, aspiriert und in die darauffolgende Kammer transferiert wurde. Dieser Vorgang erfolgte in allen Kammern außer in den letzten beiden, in denen weiterhin reines RPMI enthalten war. Aus diesen Standards wurden daraufhin je 100 µl in derselben Reihenfolge auf eine weitere durchsichtige, nicht bindende 96-Kammer-ELISA-Platte transferiert. Anschließend wurden aus jeweils einer Kammer der Transwellplatte zweimal 100 µl mit einer Multikanalpipette entnommen und in die unter den Standards liegenden zwei Reihen der ELISA-Platte pipettiert. In jede Kammer kam daraufhin 100 µl Substratlösung, die aus 20 ml 0,1 M Acetatpuffer und 5 mg p-Nitrophenyl-β-Glucoronidid bestand. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Am Folgetag wurde zum

Stoppen der Reaktion 100 µl 0,4 M Glycinpuffer (pH 10,3) je Kammer pipettiert, das den Farbumschlag der Lösung in den Kammern bewirkte.

2.8.2 Auswertung

Die Auswertung erfolgt mittels ELISA-Plattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 450 nm mit dem angeschlossenen Wallac-1420-Manager mit dem β -Glucuronidase-Assay-Protokoll.

2.9 Gefrierschnittmodell

2.9.1 Gefrierschnittpräparate

Die für diesen Versuch benötigten Gefrierschnitte bestanden aus 6 µm dünnen Scheiben aus menschlicher Vorhaut. Hierzu wurde die Haut zunächst in ca. 1 cm große Stücke aufgeteilt und bei -80°C in kleinen Einbettkassetten mit Tissue-Tek-O.C.T.-Compound-Medium gelagert. Jeweils drei der mit dem Mikrotom abgetrennten Gewebeschnitte wurden auf einen Objektträger platziert und bei -80°C eingefroren.

2.9.2 Versuchsaufbau

Für diesen Versuch wurden Präparate aus menschlicher Vorhaut zuerst mit rekombinanten oder Kaninchen-anti-human-IgG-Antikörpern gegen COL7 oder Patientenserum und danach mit einer PMN Suspension versetzt. Dabei handelte es sich bei beiden um gesamt Kaninchen-anti-human-IgG und um Patienten-Gesamt-IgG. Die unterschiedliche Beimischung war erforderlich, weil die ersten drei Versuchsdurchgänge mit Patientenserum und zwei Versuchsdurchläufe mit dem auch in den anderen Versuchen benutzen rekombinanten anti-human-IgG1 frustran waren. Mit dem gesamt Kaninchen-anti-human-IgG konnten daraufhin sechs Versuche erfolgreich durchgeführt werden. Die Bindung der Granulozyten

an die in der Haut gebundenen Immunkomplexe aus Antikörpern und COL7 führt zur Degranulation, die sich in der Freisetzung von Zytokinen und proteolytischen Enzymen wie z.B. Elastase und Gelatinase B sowie reaktiver Sauerstoffspezies äußert. Insbesondere infolge der Freisetzung der proteolytischen Enzyme und der ROS kommt es zu einer dermo-epidermalen Spaltbildung (Chiriac et al., 2007; Shimanovich et al., 2004; Sitaru et al., 2002).

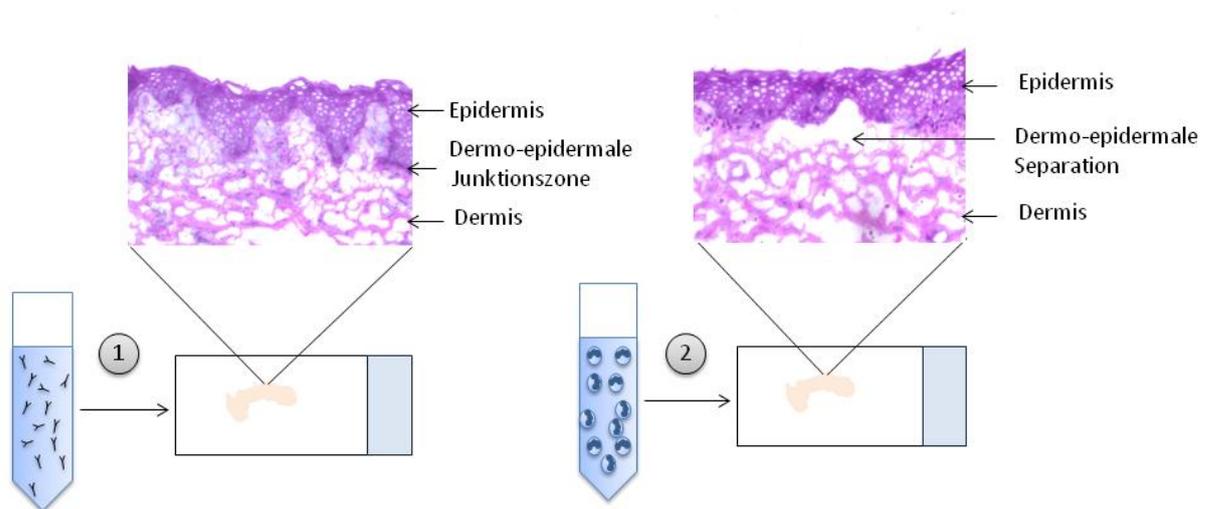


Abbildung 12: Prinzip des Gefrierschnittmodells: (1) Die Gefrierschnitte humaner Haut werden zunächst mit einer Antikörpersuspension gegen Kollagen Typ VII inkubiert, welche als Verankerungsfibrillen in der dermo-epidermalen Junctionszone fungieren. (2) Nach erfolgter Inkubation werden auf die verschiedenen Gefrierschnitte aus Vollblut isolierte PMN mit aufsteigender JAK2-Inhibitor-Konzentration gegeben. Die PMN binden daraufhin am Immunkomplex aus Antikörpern und COL7. Das hat eine Sekretion von ROS und proteolytischen Enzymen zur Folge. Eine dermo-epidermale Separation entsteht. Die mikroskopische Auswertung folgt nach HE-Färbung, wobei die prozentuale dermo-epidermale Separation in Bezug auf die Gesamtlänge der dermo-epidermalen Junctionszone bestimmt wird.

2.9.3 Vorbereitung und Durchführung

Der erste Schritt bestand aus dem Befüllen von vier 20 ml Spritzen mit 1 ml Heparin (25.000 I.E./ 5 ml). Daraufhin wurde von männlichen und weiblichen gesunden freiwilligen Spendern zwischen 24 und 30 Jahren peripher Vollblut mit einer Butterflykanüle entnommen und in die vorbereiteten Spritzen aspiriert. Anschließend wurde das Blut in vier 50 ml Zentrifugenröhrchen transferiert und mit 20 ml dreiprozentigem Dextran vermischt. Diese Suspension inkubierte für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Die Verwendung verschiedener Methoden zur Isolation der PMN in den einzelnen Versuchen dieser Arbeit ist durch die

unterschiedliche Effektivität der Separationsvorgänge bedingt. Insbesondere für den Gefrierschnitt-Assay werden relativ viele PMN benötigt.

Währenddessen erfolgte die Vorbereitung der Gefrierschnittpräparate. Benötigt wurden je ein Objektträger für die Positivkontrolle, Negativkontrolle und die JAK2-Inhibitor Konzentrationen 5, 25, 50, 75, 100 ng/ml. Auf sämtliche der drei Hautschnitte auf jedem Objektträger wurden 25 µl des Kaninchen-anti-human-IgG-Antikörpers gegen COL7 in einer Verdünnung von 1:2 mit PBS aufgetragen. Die Präparate kamen zur Inkubation für eine Stunde bei 37 °C in den Begasungsbrutschrank. Zur Vorbeugung gegen Austrocknung der Objektträger wurden feuchte Papierstreifen der Aufbewahrungsbox beigelegt.

Durch die Senkung der Erythrozyten waren nun zwei Banden zu erkennen. Die obere Bande mit den enthaltenen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten wurde mit einer akkubetriebenen Pipettierhilfe und einem 10 ml Aufsatz in vier 50 ml Röhren überführt und bei 19 °C bei 1200 rpm 12 Minuten lang zentrifugiert. Mit einer Wasserstrahlpumpe mit Glaspipettenspitze wurde der Überstand vorsichtig entnommen. In jedes Zentrifugenröhrchen wurde 10 ml RPMI pipettiert und das Pellet so lange resuspendiert, bis es vollkommen gelöst war. Der Inhalt aller vier Röhren wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen vereint. Dieses wurde bei gleichen Bedingungen wie das vorige Mal zentrifugiert. Nach der Entnahme des Überstandes, wurden 20 ml 0,2 % NaCl Lösung zur Lyse der Erythrozyten in das Falcon-Röhrchen pipettiert und resuspendiert. Nach 20 Sekunden Inkubation kamen 20 ml 1,6 %er NaCl Lösung zur Neutralisierung hinzu. Die Suspension kam für 12 Minuten bei 1200 rpm und 4 °C in die Zentrifuge. Nach Beendigung wurde der Überstand mittels Wasserstrahlpumpe und Glaspipette entnommen, 30 ml RPMI in das Falcon-Röhrchen hinzugegeben, resuspendiert und bei 4 °C bei 1200 rpm 7 Minuten lang zentrifugiert. Schließlich wurde der Überstand entnommen, 5 ml RPMI hinzugefügt, resuspendiert und die Suspension auf Eis gelagert. Als nächstes wurden die verschiedenen Konzentrationen des JAK2-Inhibitors vorbereitet. Hierzu wurde die Stocklösung mit der Zellsuspension in jeweils einem 1 ml Mikroreaktionsgefäß auf 5, 25, 50, 75, 100 ng/ml verdünnt.

Nach der einstündigen Inkubation konnten die Kryosektionpräparate aus dem Brutschrank entnommen und mit PBS auf einem Schütteltisch 5 Minuten gewaschen werden. Die Objektträger wurden vorsichtig auf saugfähigem Papier abgeklopft, um möglichst viel PBS zu entfernen. Nun wurden die

Kryosektionpräparate mit einem weiteren Objektträger mit endständigem Abstandhalter mittels zwei 1 cm breiten Paraffinstreifen fixiert. In dem entstandenen Zwischenraum zwischen den Objektträgern wurden nun die vorbereiteten Inhibitorlösungen, PBS als Negativkontrolle und reine Granulozytenlösung für die Positivkontrolle langsam im 45-Grad-Winkel pipettiert. Mögliche gebildete Luftblasen konnten durch leichtes Klopfen auf den Objektträger entfernt werden. Die Präparate kamen für 3 Stunden bei 37 °C in den Begasungsbrutschrank, zusammen mit feuchtem saugfähigem Papier. Der nächste Schritt bestand aus dem Entfernen der gebundenen Granulozyten vom Kryosektionpräparat durch Waschen per Hand in PBS mit lichtmikroskopischer Kontrolle. Nach dem Waschen wurden die Präparate bis zur Färbung in PBS gelagert.

2.9.4 Färbung der Kryosektionpräparate mit Hämatoxylin-Eosin

Der erste Schritt bestand aus der Fixierung des Präparates mit Formaldehyd. Hierzu wurde das PBS aus dem Glasbehälter mit dem Objektträger verworfen, mit Formaldehyd befüllt, um es 5 Minuten einwirken lassen. Daraufhin wurden die Präparate mit kaltem Wasser gespült und in einen Färbeständer mit der Oberseite nach vorne platziert. Nun kam der Färbeständer für vier Minuten in die Kernfärbung nach Papanicolaou, wurde mit kaltem Wasser gespült und in Ethanol 20 Sekunden durch Schwenken gereinigt. Als nächstes wurden die Objektträger wieder mit Wasser ab gespült und für 10 Sekunden in Ammoniak vor- und zurück bewegt. Nach der erneuten Spülung mit Wasser kam der Färbeständer mit den Präparaten für eine Minute in die Eosin Lösung und wurde dann in der aufsteigenden Alkoholreihe bis hin zur 100 % Lösung 10- bis 15 mal geschwenkt, um Wasser aus den Gewebeschnitten zu verdrängen. Die anschließende Eindeckung der fertig gefärbten Objektträger erfolgte durch den Glaseindeckautomat (Leica CV 5030).

2.9.5 Lichtmikroskopische Auswertung

Die Auswertung erfolgte unabhängig durch zwei Personen, die unter dem Lichtmikroskop die prozentuale dermo-epidermale Spaltbildung in Bezug auf die Gesamtlänge des Gewebeschnitts errechneten, ohne Kenntnis darüber, mit welchen CEP-33779 Konzentrationen das Präparat inkubiert wurde. Aus den Ergebnissen der beiden Auswertungen wurde ein Mittelwert errechnet. Die angefertigten Fotografien wurden mit Hilfe eines Programms (ProgResCapture) erstellt, welches mit einem Lichtmikroskop verbunden ist. Der Doktorand war dabei stets an der Auswertung aller Schnitte beteiligt. Die 2. auswertende Person wechselte, sodass an der Auswertung der Schnitte Dr. Andreas Recke und Prof. Ralf Ludwig beteiligt waren.

2.10 Elastase-Assay

In diesem Versuch wird der Einfluss vom JAK2-Inhibitor CEP-33779 auf die Ausschüttung von Elastase aus aktivierten PMN mittels "Human PMN Elastase Platinum Elisa-Kit" von eBioscience untersucht. Die Elastasesekretion gehört zu den physiologischen Abwehrmechanismen der PMN (Tkalcevic et al., 2000) und spielt eine Rolle im Pathomechanismus der EBA (Shimanovich et al., 2004). Das Kit basiert auf der Sandwich-ELISA Methode mit anschließender photometrischer Auswertung.

2.10.1 Separation der PMN

Für diesen Versuch wurde peripher entnommenes venöses Vollblut von gesunden männlichen und weiblichen Spendern im Alter von 24 bis 32 Jahren entnommen. Es wurden drei Versuchsdurchläufe durchgeführt. Hierfür verwendete Materialien waren eine Butterflykanüle und zwei 9 ml EDTA-Röhrchen pro Proband. Es war darauf zu achten, dass das Blut nicht koaguliert, welches eine Sekretion von Elastase und falsch positive Ergebnisse zur Folge hätte.

Die Trennung der PMN vom Vollblut ist identisch mit dem im „Separation neutrophiler Granulozyten (PMN) aus peripherem Vollblut“ beschriebenen

Prozedere vom ROS-Assay (s. Kapitel 2.7.2). Die fertige Granulozytensuspension wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelegt.

2.10.2 Versuchsaufbau und Durchführung

Für dieses Experiment wurde eine 96-Kammer-ELISA-Platte mit dem Antigen hCol7 und anschließend mit dem rekombinanten anti-human-COL7-IgG-Antikörper beschichtet, nach dem Schema des ROS-Assays. Auf einer separaten 96-Kammer-ELISA-Platte wurde nach dem Pipettierschema des ROS-Assays (s. Kapitel 2.7.3) der JAK2-Inhibitor in unterschiedlichen Konzentrationen die Suspension aus PMN hinzugegeben und für eine Stunde auf den Schütteltisch inkubiert. Das weitere Prozedere beinhaltete das Transferieren der Zellen mit einer Mehrkanalpipette auf die beschichtete ELISA-Platte und die anschließende fünfzehnminütige Inkubation auf dem Schütteltisch. Im Anschluss wurde die ELISA-Platte bei 1500 rpm für 20 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Daraufhin wurden 10 µl des entstandenen Überstandes auf eine weitere 96-Kammer-ELISA-Platte in gleicher Reihenfolge mit einer Mehrkanalpipette überführt und mit der im Elastase-Kit enthaltenden Verdünnungslösung auf ein Verhältnis von 1:10 verdünnt. Zusammenfassend formuliert, inkubierten die PMN mit den unterschiedlichen Konzentrationen des JAK2-Inhibitors eine Stunde ohne Immunkomplex und anschließend 15 Minuten mit dem Immunkomplex aus IgG und hCol7, um daraufhin die im Überstand enthaltene Elastase zu messen.

Für die anschließenden Schritte wurde eine mit Antikörpern gegen Elastase beschichtete Mikrotiterplatte verwendet. Für die Standardlösung wurden 200 µl der im Kit enthaltenden Standard-Lösung in Duplikaten in die ersten beiden Kammern der Platte pipettiert. In die darauf folgenden Kammern wurden jeweils 100 µl Verdünnungslösung hinzugefügt. Hieraus wurde dann eine Verdünnungsreihe erstellt, indem 100 µl aus den ersten beiden Kammern entnommen und in die darauf folgenden transferiert wurde. Dieser Vorgang wurde bis zur letzten Kammer wiederholt. Die letzte Kammer wurde ausgelassen. Sie enthielt lediglich die Verdünnungslösung. Daraufhin wurden je 100 µl der 1:10 Verdünnung in gleicher Reihenfolge auf die Mikrotiterplatte übertragen. In einem letzten Schritt wurden in Duplikaten 100 µl der Standardlösungen "low" und "high" auf die Platte pipettiert

und für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schütteltisch inkubiert. Anschließend wurde die Platte viermal mit dem im Kit enthaltenen Waschpuffer gewaschen, daraufhin vollständig entleert und zum Entfernen der letzten Rückstände auf saugfähigem Papier ausgeklopft. Im nächsten Schritt kamen 150 µl der an Peroxidase konjugierten α -1 Proteaseinhibitor-Antikörper in jedes Well. Diese binden an den Immunkomplex aus Elastase und Antikörpern. Nach einer 60 minütigen Inkubationszeit folgte ein vierfach durchgeführter Waschgang, wie bereits im vorausgegangenen Arbeitsschritt beschrieben. Daraufhin wurde 200 µl vom Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) dazugegeben und die Reaktion nach 20 Minuten Inkubation in dunkler Umgebung mit 2M HCl-Lösung gestoppt. Der erfolgte Farbumschlag konnte im Anschluss photometrisch gemessen werden.

2.10.3 Auswertung

Die vorbereitete Mikrotiterplatte wurde bei 450 nm Wellenlänge mittels ELISA-Plattenlesegerät und dem angeschlossenen Wallac-1420-Manager ausgewertet.

2.11 Bestimmung der Zytotoxizität von CEP-33779 auf PMN mittels Durchflusszytometrie.

In diesem Experiment wurde die Toxizität von CEP-33779 auf PMN getestet, um auszuschließen, dass der inhibitorische Effekt der vorangegangenen Experimente auf dem Untergang der Zellen beruht. Hierfür wurden PMN mit verschiedenen Konzentrationen von dem JAK2-Inhibitor inkubiert und mittels Durchflusszytometrie der prozentuale Anteil der apoptotischen, nekrotischen und lebenden Zellen bestimmt. Das Prinzip besteht darin, dass das Färbemittel Annexin V, welches normalerweise das im Inneren der Zelle befindliche Membranphospholipid Phosphatidylserin, welches bereits im Frühstadium der Apoptose nach außen exponiert wird, markiert. Zerstörte Zellmembranen sind permeabel für den Marker Propidiumiodid (PI), welcher später zur Differenzierung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen dient (Rieger et al., 2011).

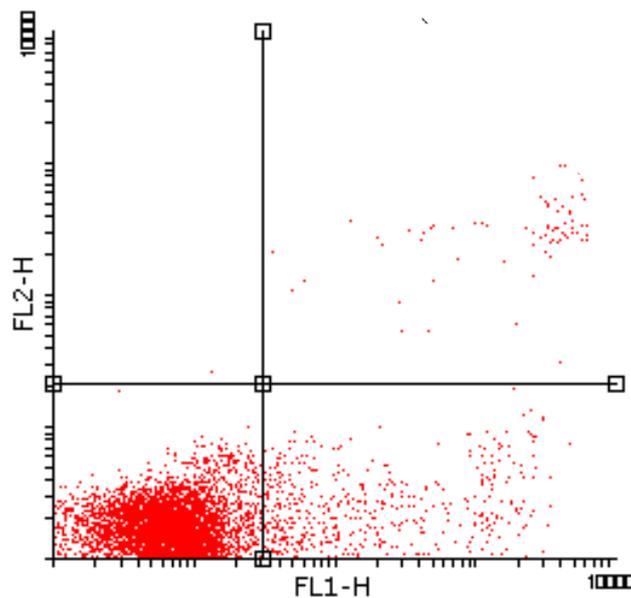


Abbildung 13: Ein Beispiel der Quantifizierung von apoptotischen und nekrotischen PMN mittels Durchflusszytometrie. Zu sehen ist ein Punktdiagramm einer Durchlaufzytometrie mit Annexin und PI markierten Granulozyten. Im unteren linken Quadranten sind die lebenden PMN zu sehen, an die weder PI noch Annexin gebunden hat. Der untere rechte Quadrant repräsentiert die früh apoptotischen Zellen, die Annexin positiv und PI negativ sind. Der obere rechte Quadrant beinhaltet die nicht-lebenden, nekrotischen oder spätapoptotischen Zellen. Sowohl Annexin als auch PI sind an der Zellmembran gebunden (Sulowska et al., 2002).

2.11.1 Vorbereitung und Durchführung

Die Aufreinigung der PMN aus peripher entnommenem Blut der Probanden erfolgte mittels Percollgradient, wie schon bei der Migration beschrieben (s. Kapitel 2.8.1). Nach der Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer wurde die Granulozytensuspension mit RPMI auf eine Konzentration von 10^6 Zellen pro ml verdünnt.

Dann wurden 500 μ l Zellen in Mikroreaktionsgefäße mit JAK2-Inhibitorkonzentrationen von 5, 25, 50, 75, 100 ng/ml für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert sowie auch die Granulozyten ohne Inhibitor für die Kontrollen. Die Positivkontrolle wurde 15 Minuten mit artifiziellem UVC-Licht behandelt, was eine Zellnekrose induzierte. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben für 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit 100 μ l PBS resuspendiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, mit der Ausnahme, dass nach der letzten Zentrifugation mit 1X-Binding-Puffer resuspendiert wurde. Zu der

Konzentrationsreihe mit den Inhibitoren wurden jeweils 5 µl Annexin und 10 µl PI gegeben. Die Kontrollen bestanden aus jeweils einem Mikroreaktionsgefäß mit ausschließlich PMN, Zellen mit Annexin V, Zellen mit Propidiumiodid, PMN mit 0,5 µl DMSO, Annexin und Propidiumiodid und einem mit PMN und 2 µl DMSO, Annexin und Propidiumiodid, was der DMSO-Menge bei der höchsten Konzentration des Inhibitors (100 ng/ml) entspricht. Unter Ausschluss von UV-Licht wurden die Proben für 15 min. inkubiert. Daraufhin wurden die Granulozyten in ein Reagenzglas transferiert und weitere 400 µl 1X-Binding-Puffer hinzupipettiert. Nach kurzem Durchmischen mit dem Vortex wurden die Proben der Durchlaufzytometrie FACSCalibur angeboten.

2.11.2 Auswertung

Die Daten wurden mit Hilfe der Flowing Software ausgewertet. Durch das Erstellen eines Punktdiagramms konnte der prozentuale Anteil von lebenden, apoptotischen und nekrotischen Granulozyten bestimmt werden. Bei jeder Probe wurden 10.000 Zellen ausgewertet.

2.12 Statistische Auswertung

Die Varianzanalyse (Kruskal-Wallis) wurde zum Vergleich von mehr als zwei Gruppen angewendet, worauf die Dunnett's Methode oder Bonferroni t-Test zum multiplen Paarvergleich folgte. In allen angewendeten Tests wurde ein $p < 0.05$ als signifikant betrachtet. Alle statistischen Analysen wurden mit dem Sigma Plot 12.0 (Systat Software, Erkrath, Germany) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Der Effekt von CEP-33779 auf die Freisetzung von ROS aus PMN

3.1.1 JAK2-Blockade inhibiert die Aktivierung von PMN

Um den Einfluss einer JAK2-Inhibition auf die PMN-Aktivierung zu untersuchen, wurden diese wie oben beschrieben (s. Kapitel 2.7) durch einen Immunkomplex aktiviert. Die Aktivierung der PMN wurde anhand der Freisetzung der ROS bestimmt. In Anwesenheit des JAK2-Inhibitors CEP-33779 kam es zu einer dosisabhängigen Reduktion der ROS-Freisetzung. Die Rangvarianzanalyse nach Kruskal-Wallis ergab einen p-Wert von 0,001; somit besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Die getesteten Dosen lagen zwischen 5 und 500 ng/ml. Ab einer Konzentration von 75 ng/ml konnte eine signifikante Reduktion der ROS-Freisetzung im Bonferroni t-Test festgestellt werden. Das Maximum der Inhibition wurde mit 250 ng/ml erreicht. Ab dieser Konzentration lag die ROS-Freisetzung im nicht messbaren Bereich.

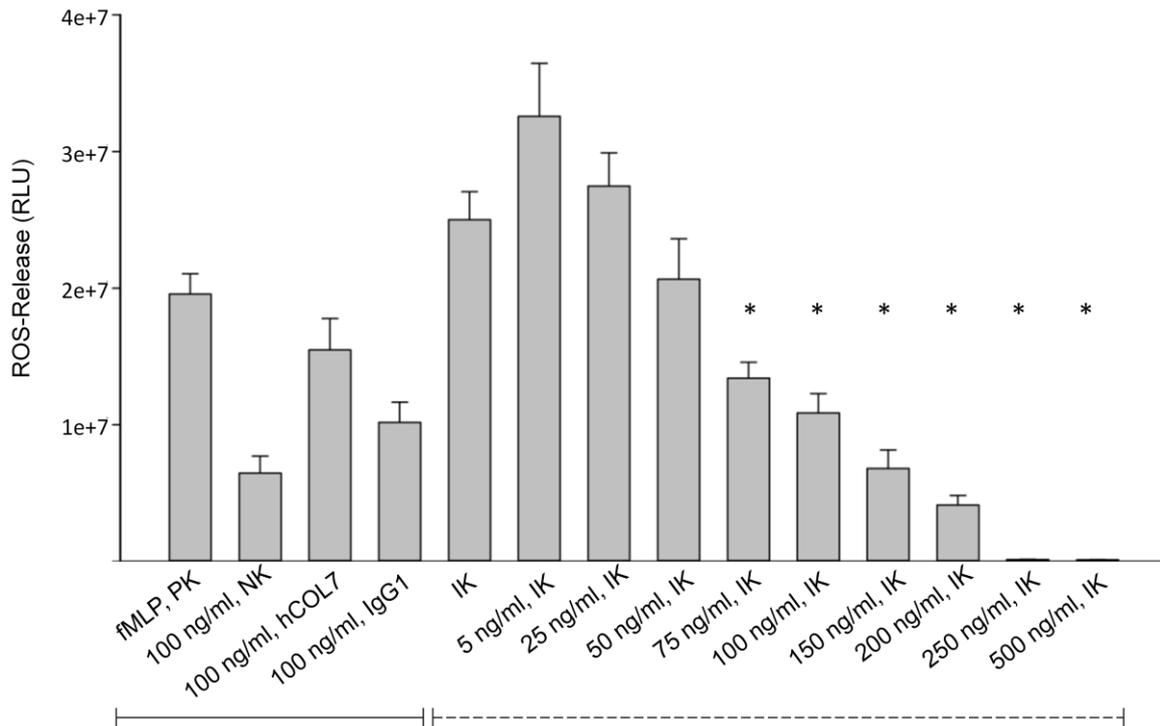


Abbildung 14: JAK2 ist essentiell für die Aktivierung PMN. Gezeigt ist die Sekretion der reaktiven Sauerstoffspezies der verschiedenen Kontrollgruppen (—) und der in aufsteigend aufgelisteten Konzentrationen des JAK2-Kinaseinhibitors der Versuchsgruppen (---) angegeben in (RLU) Relative Light Unit/ml. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert der 60 gemessenen Zyklen aus fünfzehn Versuchsdurchläufen (N=15) \pm Standardabweichung. Ab einer Konzentration von 75 ng/ml wurde die ROS-Sekretion in Bezug auf die IK-Gruppe im Bonferroni t-Test signifikant reduziert (*) = $p < 0,05$. Abkürzungen: (**fMLP**) N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine, (**PK**) Positivkontrolle, (**NK**) Negativkontrolle, (**IK**) Immunkomplex aus hCol7 und IgG1-Antikörpern. (**hCol7**) humanes Typ VII Kollagen, die Konzentrationsangabe (**ng/ml**) ist die JAK2-Inhibitor-Konzentration in der jeweiligen Kammer auf der 96-Kammer-Platte.

3.2 JAK2-Inhibition hat hemmenden Einfluss auf die Migration von PMN

Um die Wirkung von JAK2-Inhibition auf die Migration von PMN zu testen, wurden diese zunächst mit Interleukin 8 aktiviert. Die Migration wurde mittels Anzahl migrierter Granulozyten durch eine Polycarbonatmembran bei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen quantifiziert (s. Kapitel 2.7). CEP-33779 zeigte in allen Versuchsreihen eine deutliche Hemmung der Migration durch die Polycarbonatmembran. So zeigte sich im Verhältnis zur Positivkontrolle eine Verminderung der migrierten PMN bereits bei einer Konzentration von 25 ng/ml um 86,0 % (Median). In den Versuchsreihen mit den Konzentrationen 50, 75 und 100 ng/ml migrierten im Median noch 6,1 %, 5,3 % und 5,1 % der PNM-Anzahl der Positivkontrolle. Die Rangvarianzanalyse nach Kruskal-Wallis ergab einen p-Wert

von 0,010; somit besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Bei 5 ng/ml ergab die Messung im Median ein Wert von 42.2 % und erreichte beim Dunnett's Test gegenüber der Positivkontrolle, im Unterschied zu den Versuchsreihen mit den höheren Konzentrationen, keine Signifikanz. Auch die Konzentrationen 150, 200 und 250 ng/ml wurden getestet und ergaben keinen Unterschied zu den 50, 75, und 100 ng/ml.

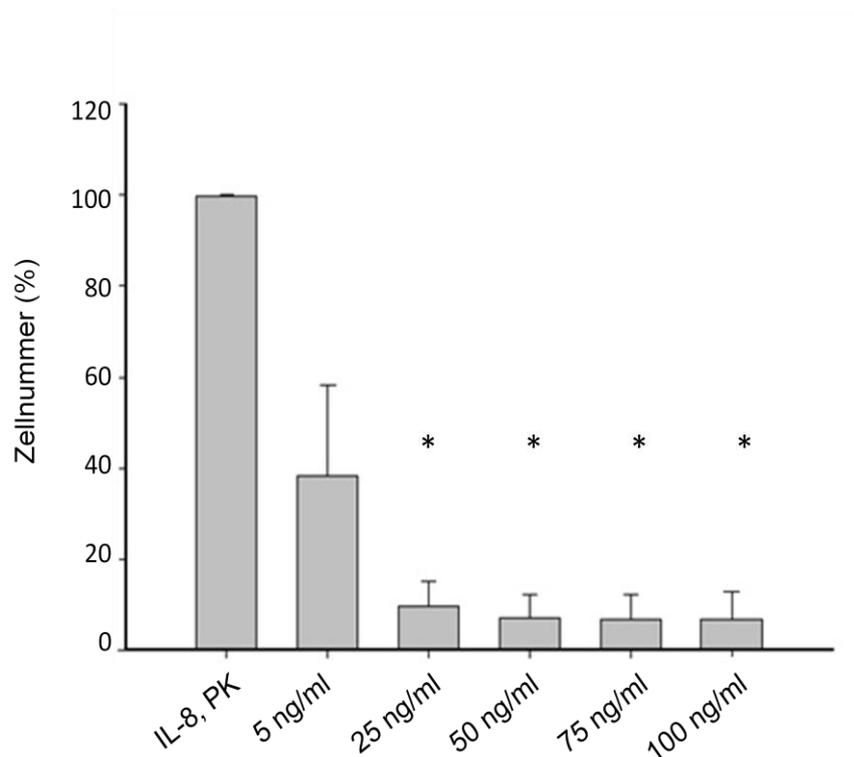


Abbildung 15: JAK2 hemmt die Migration durch Polycarbonatmembranen. Die Anzahl der migrierten PMN angegeben in Prozent. Ausgehend von der Positivkontrolle (**PK**), bestehend aus dem PMN-Stimulator Interleukin 8 (**IL-8**) und PMN, wurden die mit JAK2-Inhibitor versetzten migrierten PMN in Relation gesetzt. Jeder Balken repräsentiert den Median aus vier Versuchsdurchläufen (N=4) \pm Standardabweichung. Eine Signifikanz ist ab 25 ng/ml in Bezug auf die Positivkontrolle erkennbar (*) = $p < 0,05$. Ab einer Konzentration von 50 ng/ml besteht kaum noch ein Unterschied der Inhibition der Migration zu den höheren Dosierungen und wurden deshalb hier nicht abgebildet. Die Konzentrationsangabe (**ng/ml**) ist die JAK2-Inhibitor-Konzentration in der jeweiligen Kammer auf der Transwell-Platte.

3.3 Der Einfluss des JAK2-Inhibitors auf die dermo-epidermale Spaltbildung

3.3.1 Typ VII Kollagen Antikörper

Die ersten Versuchsdurchgänge wurden mit rekombinanten anti-human-COL7-IgG1 und durch Plasmapherese gewonnenen EBA Patientenseren durchgeführt. Hier zeigte sich in allen Durchläufen in der Positivkontrolle keine dermo-epidermale Separation. Die daraufhin verwendeten Gesamt-Antikörper aus Seren von Kaninchen, die mit humanen COL7 immunisiert wurden, ergaben verwertbare Ergebnisse.

3.3.2 JAK2-Inhibition vermindert die dermo-epidermale Separation.

Zur Prüfung des Effektes von JAK2-Inhibitoren auf die dermo-epidermalen Separation in vitro werden humane Gefrierschnitte zuerst mit Antikörpern gegen Kollagen Typ VII und daraufhin mit purifizierten PMN inkubiert (s. Kapitel 2.9). Die durch den Immunkomplex aktivierten Granulozyten bewirken eine mikroskopisch quantifizierbare Separation zwischen Dermis und Epidermis. Die prozentuale dermo-epidermale Spaltbildung in Bezug auf die Gesamtlänge des Gewebeschnitts wurde errechnet und der Mittelwert gebildet.

Es konnte eine dosisabhängige Verminderung der dermo-epidermalen Spaltbildung durch den JAK2-Inhibitor CEP-33779 beobachtet werden. Die Rangvarianzanalyse nach Kruskal-Wallis ergab einen p-Wert von $<0,010$, somit besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Ab einer Konzentration von 5 ng/ml konnte eine signifikante Reduktion der DES im Bonferroni t-Test im Vergleich zur Positivkontrolle festgestellt werden. Ab einer Dosis von 75 ng/ml war das Maximum an Inhibition erreicht und lag auf dem Niveau der Negativkontrolle.

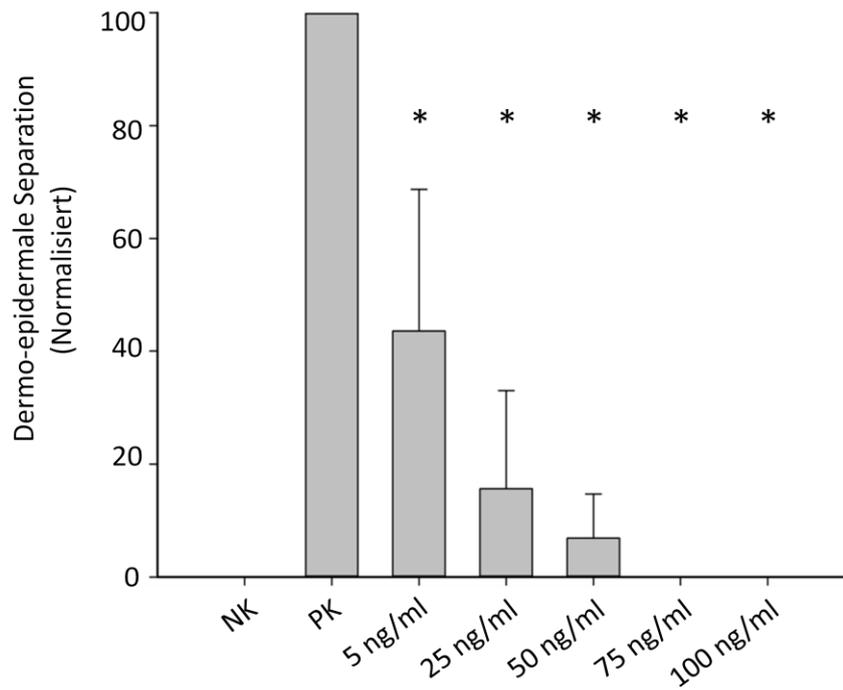


Abbildung 16: Der Einfluss des JAK2-Inhibitors CEP-33779 auf die dermo-epidermale Separation. Der prozentuale Anteil der Haut mit Spaltbildung zur nicht betroffenen Haut wurde ermittelt, der Mittelwert aus sechs Versuchsdurchläufen (N=6) gebildet und normalisiert. Jeder Balken repräsentiert den normalisierten Mittelwert \pm Standardabweichung. Bereits die niedrigste Konzentration von 5 ng/ml des JAK2-Inhibitors führte zu einer signifikanten Reduktion der DES. Ab 75 ng/ml ist kein Unterschied zur Negativkontrolle zu erkennen. **(NK)** Negativkontrolle, **(PK)** Positivkontrolle, die Konzentrationsangabe (**ng/ml**) ist die JAK2-Inhibitor Konzentration, mit der die Gefrierschnitte inkubiert wurden.

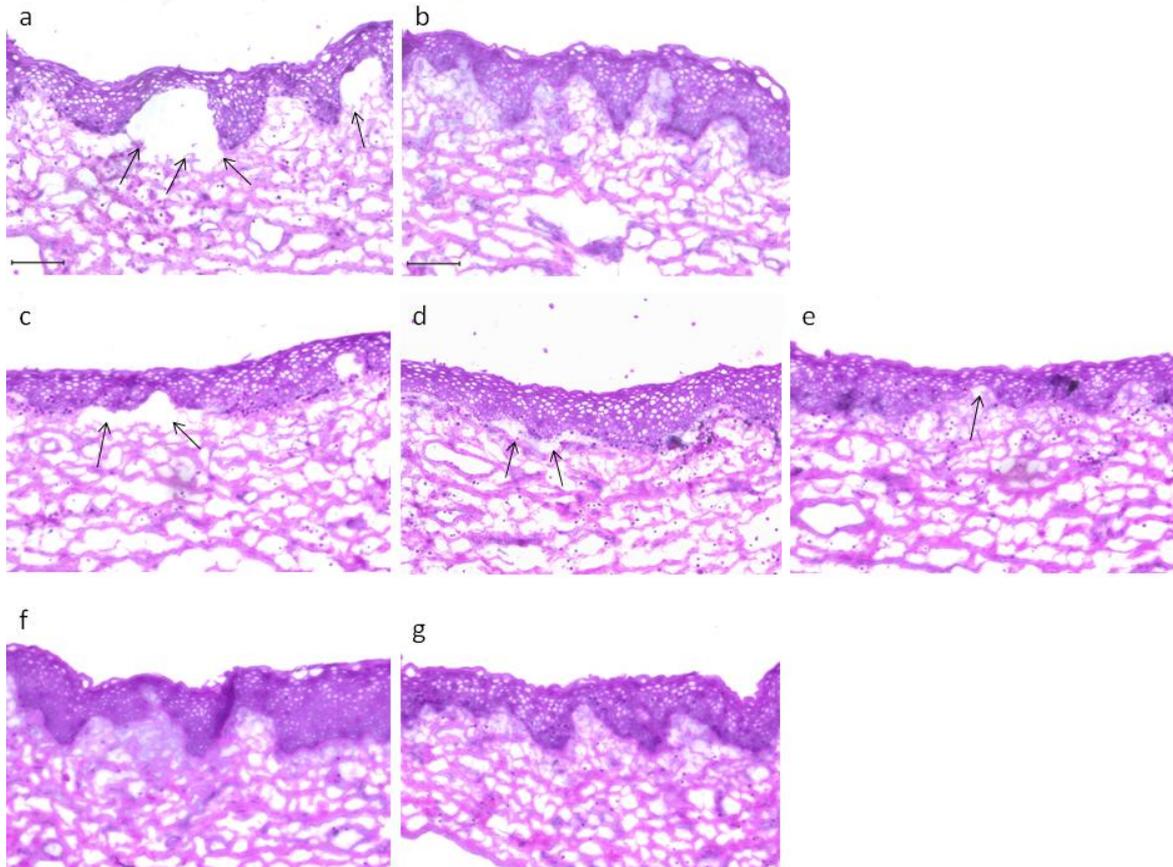


Abbildung 17: Die Auswirkung des JAK2-Inhibitors CEP-33779 auf die dermo-epidermale Spaltbildung. Darstellung der Gefrierschnitte nach HE Färbung unter 200-facher Vergrößerung. Die Strichlänge der am unteren linken Bildrand liegenden Legende entspricht 1 μm . Bei der Positivkontrolle (a) zeigten sich starke Spaltbildungen (durch schwarze Pfeile markiert) Bei der Negativkontrolle (b) ist eine intakte dermo-epidermale Junktionszone zu erkennen. Bei 5 ng/ml (c) ist noch eine deutliche Spaltbildung zu erkennen. Die DES ist bei 25 ng/ml (d) bereits weniger ausgeprägt und bei 50 ng/ml (e) kaum noch erkennbar. Bei 75 ng/ml (f) und 100 ng/ml (g) ist die Separation vollständig inhibiert.

3.4 Elastase-Assay

Mithilfe des Elastase-Assays wurde der Effekt des CEP-33779 auf die Freisetzung von Elastase aus PMN untersucht. Hierfür wurden die separierten PMN durch einen Immunkomplex aktiviert und mittels Sandwich-ELISA-Methode die freigesetzte Elastase quantifiziert (s. Kapitel 2.10). Hier zeigte sich eine von der CEP-33779-Dosis abhängige Reduktion der Elastasefreisetzung aus PMN. Es wurden die Konzentrationen zwischen 5 und 100 ng/ml getestet. Die Rangvarianzanalyse nach Kruskal-Wallis ergab einen p-Wert von 0,023; somit besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Ab einer Dosis von 25 ng/ml erreichte der Dunnett's Test gegenüber der Positivkontrolle

eine Signifikanz. Das Maximum der Inhibition wurde bei der höchsten Konzentration von 100 ng/ml beobachtet. Folglich kann eine Inhibierung des JAK2-Signalwegs die Elastasefreisetzung aus PMN signifikant hemmen.

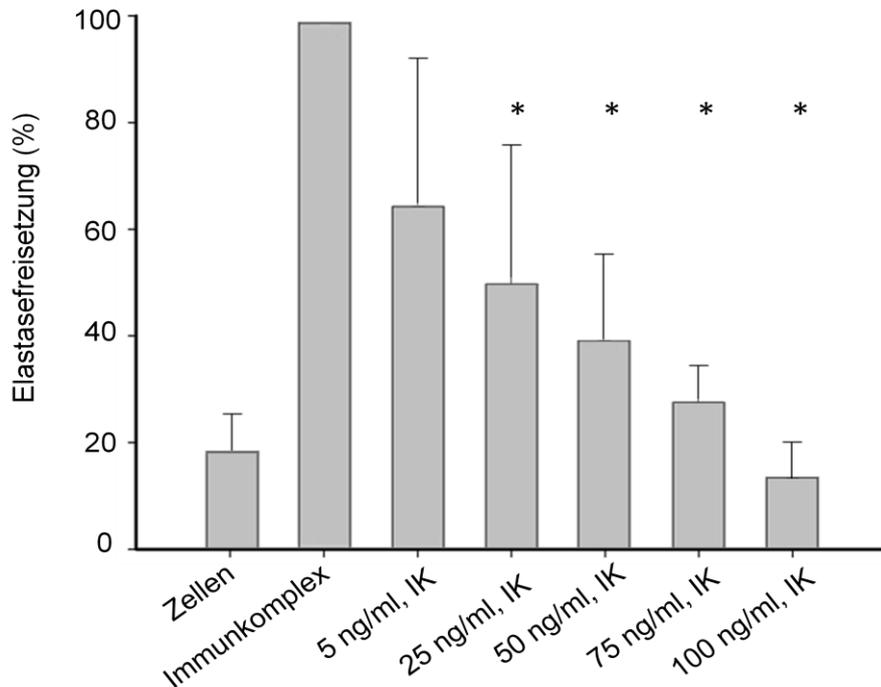


Abbildung 18: Der JAK2-Inhibitor CEP-33779 hemmt dosisabhängig die Elastasefreisetzung aus PMN. Aus den Daten aus drei Versuchsdurchgängen (N=3) wurde ein Mittelwert gebildet, normalisiert und als Balken (Prozent) dargestellt \pm Standardabweichung. Ausgehend von der freigesetzten Elastase der durch einen Immunkomplex aktivierten PMN wurden die Elastasekonzentrationen der mit CEP-33779 behandelten Proben in Relation gesetzt. Eine Signifikanz war ab 25 ng/ml zu beobachten (*) = $p < 0,05$. Die Konzentrationsangabe (**ng/ml**) ist die JAK2-Inhibitor-Konzentration in der jeweiligen Kammer auf der 96-Well-Platte. (**IK**) Immunkomplex.

3.5 Toxizität

Um die Toxizität von CEP-33779 auf PMN zu testen, wurden diese mit Konzentrationen zwischen 5 und 100 ng/ml des JAK2-Inhibitors inkubiert und mit der unbehandelten Probe verglichen. Der prozentuale Anteil der apoptotischen, nekrotischen und lebenden Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt (s. Kapitel 2.11). In einer Versuchsgruppe wurde die Menge DMSO, die bei einer 100 ng/ml JAK2-Inhibitor-Konzentration enthalten ist, untersucht. Die Rangvarianzanalyse der lebenden Zellen nach drei Stunden Inkubation einzelner Versuchsgruppen nach Kruskal-Wallis ergab einen p-Wert von 0,139; somit besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Aufgrund der fehlenden Signifikanz wurde kein multipler Paarvergleich zwischen den unbehandelten Zellen und den Versuchsgruppen durchgeführt.

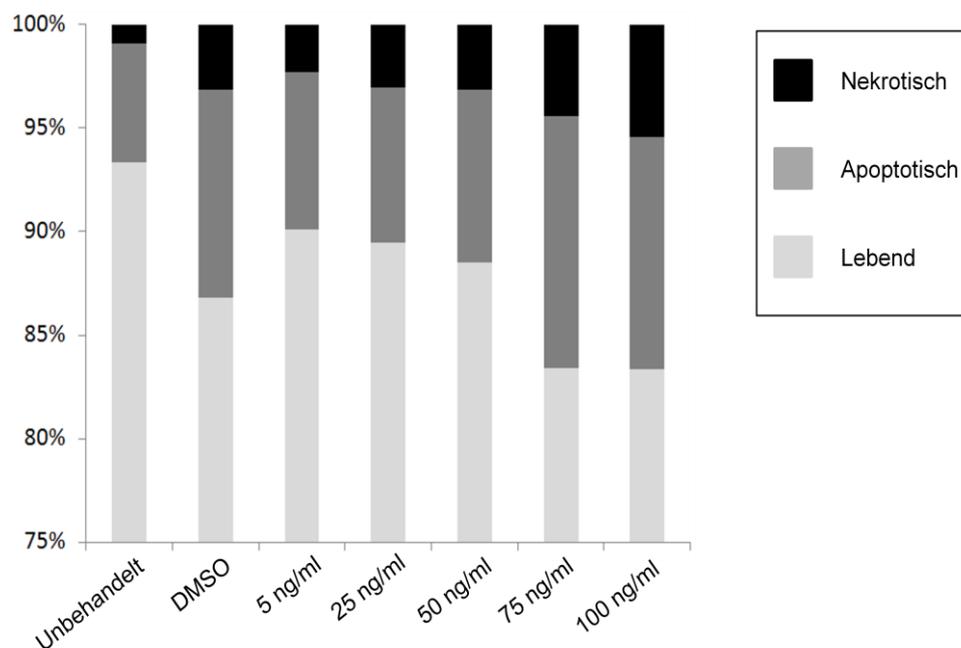


Abbildung 19: Die dosisabhängige Auswirkung des JAK2-Inhibitors CEP-33779 auf PMN. Dargestellt ist der prozentuale Anteil von lebenden, apoptotischen und nekrotischen Granulozyten nach 3 Stunden Inkubation. **(DMSO)** Dimethylsulfoxid. Die Konzentrationsangabe **(ng/ml)** ist die JAK2-Inhibitor Konzentration der jeweiligen Proben.

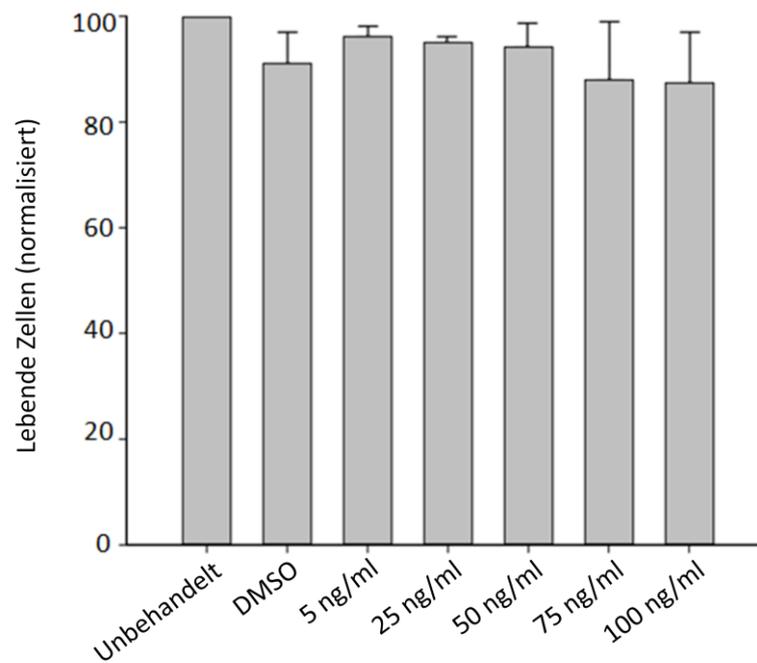


Abbildung 20: Der zytotoxische Effekt des JAK2-Inhibitors CEP-33779 auf PMN. Der prozentuale Anteil der lebenden Zellen nach drei Stunden Inkubation mit CEP-33779 und DMSO wurde ermittelt, der Mittelwert aus drei Versuchsdurchläufen (N=3) gebildet und normalisiert. Jeder Balken repräsentiert den normalisierten Mittelwert \pm Standardabweichung. Es konnte im Kruskal Wallis Test keine Signifikanz unter den Versuchsgruppen ermittelt werden (p -Wert=0,139). **(DMSO) Dimethylsulfoxid.** Die Konzentrationsangabe (**ng/ml**) ist die JAK2-Inhibitor Konzentration der jeweiligen Proben.

4 Diskussion

Die EBA gehört zu den Autoimmundermatosen und ist charakterisiert durch die Bindung von Autoantikörpern am Kollagen Typ VII mit resultierender Separation der Dermis von der Epidermis (Kim und Kim, 2013). Die Spaltbildung ist entweder die Folge von direkter Interaktion von Antikörper und Zielstruktur oder entzündlicher Ätiologie, bei der die Immunantwort auf den Antigen-Antikörper-Komplex zum klinischen Bild führt (Gupta et al., 2012; Ishii et al., 2010).

Die Immunreaktion beinhaltet eine durch Chemotaxis resultierende Migration von PMN aus den Blutgefäßen zum Ort der Entzündung. Diese werden durch den Immunkomplex aktiviert und sekretieren ROS sowie die Matrix-Metalloproteasen Elastase und Gelatinase B. Dieser Prozess ist ein wichtiger Bestandteil der Pathogenese von EBA (Ludwig, 2013; Shimanovich et al., 2004).

Die Therapiemöglichkeiten beschränken sich aktuell auf die allgemeine Immunsuppression, vor allem mit Prednisolon, Colchicin, Azathioprin und Mycophenolat-Mofetil (Schmidt und Zillikens, 2011). Unter der Therapie kommt es jedoch häufig zu Rezidiven (Engineer und Ahmed, 2001).

4.1 Auswahl des getesteten Wirkstoffes CEP-33779

Aufgrund der unbefriedigenden Therapiemöglichkeiten soll in dieser Arbeit ein neuer Therapieansatz untersucht werden. Dieser sollte im Gegensatz zur bisherigen Therapie spezifisch den entzündlichen Prozess der Pathogenese hemmen. Die Wahl fiel auf den oral verfügbaren, spezifischen JAK2-Inhibitor CEP-33779 wegen der guten Ergebnisse in Studien in Bezug auf die Autoimmunerkrankungen rheumatoide Arthritis und systemischer Lupus erythematodes (Lu et al., 2011; Stump et al., 2011). Über den JAK/STAT-Signalweg laufen viele Zytokine (Parganas et al., 1998), welche die PMN aktivieren und als chemotaktische Botenstoffe dienen (Yamashiro et al., 2001).

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass der CEP-33779 auf viele Ebenen des Pathomechanismus der EBA Einfluss hat. So konnte die Migration von PMN und die Sekretion von ROS und Elastase inhibiert werden. Im Gefrierschnittmodell spiegeln sich diese Ergebnisse wider, weil die dermo-epidermale Spaltbildung

unter Einfluss des JAK2-Inhibitors ausblieb. Die Erkenntnisse dieser Arbeit könnten auf weitere Autoimmunerkrankungen mit ähnlichem Pathomechanismus übertragen werden und eine weitere Therapieoption darstellen.

4.2 Funktionen von PMN und Wichtigkeit in der Pathogenese der EBA

Für die Entstehung einer dermo-epidermalen Spaltbildung bei dem entzündlichen Typ der EBA sind aktivierte PMN essentiell. Weder in der Arbeit von Sitaru et al. noch in dieser Arbeit war die alleinige Inkubation mit IgG-Antikörpern im Gefrierschnittmodell ausreichend für eine DES. Bei der nichtentzündlichen mechanobullösen Form der EBA sind kaum PMN im Hautgewebe nachzuweisen. Hier ist eine äußere Manipulation der Haut nötig für eine Blasenbildung.

PMN gehören zum unspezifischen angeborenen Immunsystem. Sie sind ein wichtiger Bestandteil in der ersten Verteidigungslinie gegen bakterielle Infektionen, Pilzinfektion und Protozoen. Die PMN haben einen Anteil von 50 bis 70 % der zirkulierenden Leukozyten. Täglich werden im Knochenmark bis zu 10^{11} PMN produziert und ihre Anzahl kann bei Infektionen bis zu 10^{12} gesteigert werden (Edwards, 2005). PMN überleben lediglich 8-12 Stunden im Blutkreislauf, jedoch nach Aktivierung und Wanderung ins Interstitium steigt die Lebensdauer auf ein bis zwei Tage. Sie besitzen die Fähigkeit, zum Ort der Infektion zu migrieren, Pathogene zu erkennen und sie durch verschiedene Mechanismen zu eliminieren. Zu diesen zählen neben der Phagozytose die Sekretion antimikrobakterieller Peptide, Enzyme, Proteasen und reaktiver Sauerstoffspezies sowie die Austreibung nukleärer Inhalte - die sogenannten neutrophilen extrazellulären Fallen (Kumar und Sharma, 2010; Mayadas et al., 2014), die nach Aktivierung freigesetzt werden. Die für die Abtötung von Pathogenen benötigten Substanzen sind in den Granula des Zytoplasmas enthalten. Die Granula werden in azurophile (primäre), spezifische (sekundäre) und Gelatinase (tertiäre) Granula unterteilt (Segal, 2005).

4.2.1 Der Weg zur Aktivierung von PMN

Durch das Binden der IgG-Autoantikörper an das Kollagen Typ VII in der DEJ entsteht ein Immunkomplex, an den PMN über Fcγ-Rezeptoren an deren Zellmembranaußenseite eine Bindung eingehen. In Mausmodellen konnte ein Krankheitsausbruch von EBA durch Blockierung des FcγR IV verhindert werden (Kasperkiewicz et al., 2012).

Der weitere Signalweg bewirkt über die Aktivierung der Src-Tyrosinkinase eine Phosphorylierung der zytoplasmatischen ITAMS (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs). Die phosphorylierten ITAMS dienen als Bindestelle für die SH2 Domäne der Syk-Tyrosinkinase, die verschiedene Signalwege aktiviert. Die Signaltransduktion läuft daraufhin über p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen (p38 MAPK) und extrazelluläre regulierende Kinasen (ERK1/2) (Lowell, 2011; Mócsai et al., 2010). Auch wurde eine intrazelluläre Ca⁺⁺-Freisetzung und Öffnung von Ca⁺⁺-Kanälen beschrieben (Bei et al., 1998). Weitere Signalwege beinhalten unter anderem die Phosphatidylinositid-3-Kinase (PI3K/Akt) und JAK/STAT (Fortin et al., 2007). Die eigentlich zum Schutz des eigenen Organismus bestimmten Mechanismen destruieren in diesem Fall, nach Aktivierung der PMN, die dermo-epidermale Junctionszone und haben eine Blasenbildung zur Folge.

4.2.2 Einfluss der Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren auf PMN

Chemische Botenstoffe wie Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren haben einen modulierenden Einfluss auf die Funktion von PMN. Dabei ist sie der Ort der Synthese und dient gleichzeitig als Zielstruktur der proinflammatorischen Substanzen. Zum Beispiel werden die Zytokine IFN-γ und GM-CSF von PMN sekretiert und binden zugleich wieder an deren Rezeptoren (Witko-Sarsat et al., 2000; Yamada et al., 2011). Diese chemischen Botenstoffe verstärken einige Funktionen der PMN, wie die Adhärenz zu den Endothelzellen, ROS Produktion, Degranulation und Migration. Die Sekretion folgt nach Immunkomplexbkontakt, und/oder nach Bindung von Zytokinen an die Tyrosinrezeptoren an den Membranoberflächen. Zu den Aktivatoren von PMN gehören unter anderem:

Tumornekrosefaktor α , GM-CSF, G-CSF, IFN γ und IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 (Cassatella, 1999; Schroder et al., 2004).

4.2.1 Reaktive Sauerstoffspezies

Ein Mechanismus von PMN zur Abwehr von Pathogenen stellen reaktive Sauerstoffspezies dar. Die Freisetzung erfolgt nach Aktivierung der PMN in einer Reaktionskaskade, dem oxydativen Burst (Chen und Junger, 2012).

Nicht nur der Kontakt zum Pathogen verursacht Degranulation und die Produktion von ROS, sondern auch der Kontakt über den Fc γ -Rezeptor zum Fc-Fragment eines am Antigen gebundenen Antikörpers (Wright et al., 2010). Das Vorhandensein von GM-CSF potenziert die ROS-Freisetzung auf PMN (Dang et al., 1999). Die Aktivierung der membranständigen NADPH-Oxidase bewirkt einen Elektronentransfer aus dem Zellplasma durch die Zellmembran, wodurch aus Sauerstoff das Superoxidanion O $_2^-$ entsteht. Sowohl spontan oder auch mit Hilfe des Katalysators Superoxyd-Dismutase entstehen weitere lytische Sauerstoffradikale, wie Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikale, monomolekularer Sauerstoff und Stickstoffmonoxid. Durch Schädigung von DNA und Oxidation von Proteinen, Lipiden und Lipoproteinen wirken die Sauerstoffradikale bakterizid (Clark, 1999; Nauseef, 2007; Rasheed, 2008).

Der oxydative Stress schädigt nicht nur Pathogene, sondern wirkt auch gewebeschädigend auf den Wirt. So wurde bereits die Rolle von ROS in der Pathogenese von rheumatoider Arthritis beschrieben (Cedergren et al., 2007).

Chiriac et al. haben die Bedeutung von ROS in der Entstehung von EBA betrachtet. So zeigten Mäuse ohne funktionsfähige NADPH-Oxidase nach passivem Transfer von Antikörpern gegen Kollagen Typ VII keine typischen Blasen der Haut. Ex vivo Experimente auf Gefrierschnitten mit medikamentöser Hemmung der NADPH-Oxidase bestätigten diese Annahme (Chiriac et al., 2007).

4.2.2 Migration

Die Migration oder Leukodiapedese beinhaltet die Fähigkeit von Immunzellen, wie die PMN, der Durchwanderung von Gefäßendothel in die extrazelluläre Matrix zum Ort der Entzündung. Bei der EBA stellt es die dermo-epidermale Junctionszone dar. Es ist ein komplexer Prozess aus Interaktionen zwischen Zytokinen, Zelladhäsionsmolekülen des Endothels und der Chemokine (Downey et al., 2009). Die bei einer Entzündung beteiligten Gewebsmakrophagen, dendritische Zellen und PMN sekretieren verschiedene Zytokine. Diese bewirken eine Lockerung der Zell-Zell-Verbindungen und die Expressierung von Selektinen am Endothel. PMN binden vorübergehend an Selektinen der Endotheloberfläche, was eine entschleunigende, rollende Adhäsion zur Folge hat. Die starke Adhäsion ist durch die Integrine des Endothels vermittelt. Die Durchwanderung durch das Gefäßendothel kann sowohl trans- als auch parazellulär verlaufen. Die PMN folgen dem chemotaktischen Gradienten in Richtung inflammatorischen Gewebes (Wright et al., 2010).

4.2.3 Elastase

Elastase gehört zu der Familie der Serinproteasen und wird von PMN nach Aktivierung aus den azurophilen Granula sekretiert. Weitere Serinproteasen in PMN sind Proteinase 3 und Cathepsin G. Proteasen sind im allgemeinen Enzyme, die das Teilen von Proteinen in kleinere Peptide oder Aminosäuren katalysieren (Korkmaz et al., 2010). Die neutrophile Elastase ist eines der Schlüsselmoleküle des angeborenen Immunsystems und hat potente antimikrobakterielle Wirkung gegen gram-negative Bakterien, Spirochäten und Pilze (Belaouaj et al., 1998; Garcia et al., 1998; Tkalcevic et al., 2000). Aufgrund der unspezifischen Wirkung der Elastase, spaltet diese neben den Pathogenen auch körpereigenes Gewebe. Hierzu zählen Proteoglykane, Fibronectin, Fibrin und viele Arten des Kollagens (Travis, 1988). Bei der EBA wird Kollagen Typ VII, das Bindeglied zwischen Dermis und Epidermis, proteolytisch gespalten, was eine Spaltbildung zur Folge hat. Verdeutlicht wird dieser Effekt bei dem autosomal-rezessiv vererbten Alpha-1-Antitrypsin-Mangel. Antitrypsin inhibiert physiologisch die Elastase, wodurch es

bei einem Mangel zu einer Überaktivität kommt und ein Lungenemphysem zur Folge hat. Auch eine chronische Entzündung, wie z.B. die chronisch obstruktive Lungenerkrankung, hat eine Überaktivität der Elastase zur Folge und führt häufig zu Lungenemphysemen (Sandhaus und Turino, 2013). Weitere Funktionen der Elastase ist die Modellierung der Entzündungsreaktion und es hat die Fähigkeit, die Freisetzung von Zytokinen, wie z.B. IL-8 und GM-CSF aus Epithelzellen zu stimulieren (Bédard et al., 1993).

4.3 Funktion der Januskinase 2

Alle intrazellulären Signaltransduktionen werden durch Phosphorylierung von Kinasen weitergeleitet (Constantinescu, 2009). Menschen exprimieren mehr als 500 verschiedene Proteinkinasen, die typischerweise Tyrosin, Serin oder Threonin auf zytosolischer Seite phosphorylieren. Januskinase 2 ist ein Mitglied der Familie von Tyrosinkinasen, die auch JAK1, JAK3 und Tyk2 beinhaltet (Campbell und Green, 2006). Januskinasen werden für Signaltransduktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren benötigt, wobei meist nicht eine JAK für einen Liganden spezifisch ist. Bei den meisten liegt eine Überlappung von Familienmitgliedern der Januskinasen bei Signaltransduktionen vor. Ausnahmen sind einige Wachstumsfaktoren wie Erythropoetin und Thrombopoetin, die nur JAK2 nutzen. Das erklärt, weshalb JAK2-knockout-Mausembryonen bis zum 12. Lebenstag aufgrund von mangelnder Erythropoese sterben (Verstovsek, 2009).

4.3.1 Tyrosinkinasen bei myeloproliferierenden Syndromen

Die Entdeckung der aktivierenden Tyrosinkinase Mutation JAK2V617F in den myeloproliferierenden Syndromen wie Polycythämia Vera, essentielle Thrombozythämie, primäre Myelofibrose hat das Interesse auf JAK2 gelenkt. Durch spezifische Blockierung der Kinase sollte eine Verbesserung des Krankheitsbildes erzielt werden (James et al., 2005). Diese Mutation geht mit einer Hypersensitivität auf hämatopoetische Zytokine einher, die eine abnormale Proliferation der Stammzellen zur Folge haben (Jones et al., 2009). Da diese Mutation nicht bei allen Erkrankten des myeloproliferierenden Syndroms gefunden

werden konnte, geht man davon aus, dass JAK2V617F nicht die Ursache, sondern dass es eine Rolle als Risikofaktor bei der Krankheitsgenese spielt (Kralovics et al., 2006). Durch die Erkenntnisse in der Pathogenese der myeloproliferierenden Erkrankungen wurde intensiv an einem selektiven JAK2-Inhibitor geforscht. Seit der Entdeckung des BCR-ABL-Kinase-Inhibitors Imatinib, eingesetzt bei chronischer myeloischer Leukämie und weiteren malignen Erkrankungen, gab es große Fortschritte in der Entwicklung von potenten und selektiven Kinaseinhibitoren. Durch ATP-ähnliche, kleinmolekulare Inhibitoren, wie CEP-33779, konnte der Signalweg der JAK2 unterbrochen werden (Kumar et al., 2009). Bei therapierefraktären Patienten wurden JAK2-Inhibitoren bereits in klinischen Studien eingesetzt. So konnte das körperliche Empfinden verbessert und die für das myeloproliferierende Syndrom typische Splenomegalie reduziert werden (Bhagwat et al., 2014).

4.3.2 Januskinase-2-Inhibitor CEP-33779 in vorangegangenen Studien

Die Erkenntnisse über die Signalwege der Tyrosinkinase erweitern die möglichen Anwendungsgebiete. So inhibieren JAK2-Inhibitoren neben STAT5, der neben proinflammatorischen Eigenschaften vor allem für die Zellreifung und Proliferation zuständig ist, auch STAT1, STAT3 und STAT4. Über die drei Letztgenannten laufen entzündungsmodulierende Signalwege (John J. O'Shea und Murray, 2008). Die Erkenntnisse über den Einfluss vom JAK2-Signalweg im Entzündungsgeschehen führten zur Erprobung dieser in Autoimmunerkrankungen. Der Hemmer des Signalwegs kam in Form von CEP-33779, einem potenten, oral absorbierbaren und kleinmolekularen Januskinase 2 Inhibitor, in Mausmodellen beim systemischen Lupus erythematodes (SLE) und rheumatoider Arthritis zum Einsatz. Bei der rheumatoiden Arthritis konnte durch Behandlung mit CEP-33779 eine Reduktion der Gewebeerstörung bei Mäusen beobachtet werden (Stump et al., 2011). Mäuse mit SLE entwickelten unter Therapie seltener eine Nephritis und der JAK2-Inhibitor wirkte lebensverlängernd (Lu et al., 2011). In beiden Versuchsmodellen wurde mit verschiedenen Konzentrationen bis 100mg/kg getestet und es zeigten sich jeweils signifikante Ergebnisse ab einer Konzentration von 55mg/kg.

4.4 Der inhibitorische Effekt des CEP-33779 auf die Freisetzung von ROS aus PMN

Im ROS-Assay wird in dieser Arbeit der Einfluss des JAK2-Inhibitors auf die Freisetzung von ROS beleuchtet. Es konnte gezeigt werden, dass der Immunkomplex aus hCol7 und IgG1-Antikörpern ein stark aktivierendes Potenzial auf die PMN hat. Die Menge der von PMN freigesetzten ROS der Positivkontrolle mit fMLP ergab keinen signifikanten Unterschied zu der Gruppe mit dem Immunkomplex. Somit konnte die Bildung von ROS durch das Binden von Antikörpern am Kollagen Typ VII bestätigt werden. Der ROS-Assay zeigt eine dosisabhängige Reduktion von ROS durch CEP-33779. Eine signifikante Hemmung trat bei 75 ng/ml im Vergleich zur Kontrolle ein. Der hier vorliegende Wirkmechanismus beruht am wahrscheinlichsten auf der sofortigen Blockade von aktivierenden Zytokinen in PMN (Cassatella, 1999; Kisseleva et al., 2002). So konnte bereits gezeigt werden, dass GM-CSF durch die Phosphorylierung der NADPH-Oxidasekomponente p47^{phox} die ROS-Produktion in PMN potenziert (Dang et al., 1999). Interferon- γ ist mit GM-CSF ein weiterer Ligand, der über den JAK2/STAT-Signalweg die Freisetzung von ROS induziert (Wright et al., 2010). Die Messung erfolgte umgehend nach Zusammenführung der Testkammern mit den Granulozyten, im Gegensatz zu den weiteren Versuchen in dieser Arbeit, bei denen der Inhibitor drei Stunden mit den Granulozyten inkubierte. Nach dem Binden der PMN über den Fc γ -Rezeptor am Immunkomplex kommt es zur Degranulation und Ausschüttung von ROS. Die freigesetzten Enzyme bewirken eine Verstärkung der PMN-Funktion, die durch JAK2-Inhibitoren zum Teil unterbrochen wird (Witko-Sarsat et al., 2000). Eine weitere Möglichkeit besteht in einer, in der Literatur noch nicht beschriebenen, direkten Interaktion zwischen aktivierenden Fc γ -Rezeptoren und des JAK2/STAT-Signalwegs. Die fehlende ROS-Produktion bei den Konzentrationen von 250 ng/ml und 500 ng/ml kann durch toxische Wirkung auf PMN bei höheren Konzentrationen erklärt werden. Die hier vorgestellten Daten basieren auf den Ergebnissen, die anhand einer Aktivierung humaner PMN mit Immunkomplexen mit rekombinanten IgG1 erhoben wurden. Aufgrund der geringen Verfügbarkeit humaner Serumproben wurden die Versuche mit dem rekombinanten IgG durchgeführt.

4.5 Der Einfluss von CEP-33779 auf die Migrationseigenschaften von PMN

Die im Blut zirkulierenden PMN haben die Möglichkeit, die Blutbahnen zu verlassen, um zum Ort einer Infektion zu gelangen (Ridley et al., 2003). Hierzu interagieren die PMN mit Selektinen des Gefäßendothels und rollen an der Innenseite entlang. Durch Bindung mit Integrinen entsteht daraufhin eine starke Adhäsion. Die Zytokine und Chemokine TNF- α , GM-CSF, IFN- γ und IL-8 können bei PMN in diesem Zustand eine Diapedese durch das Endothel induzieren. Der Durchtritt durch das Gefäßendothel kann sowohl trans- als auch parazellulär verlaufen und die PMN folgen daraufhin dem chemotaktischem Gradienten in Richtung des inflammatorischen Gewebes (Schroder et al., 2004; Wright et al., 2010; Yong, 1996). In dieser Arbeit wird der Einfluss von CEP-33779 auf die Migration von IL-8 aktivierten PMN betrachtet. Es konnte belegt werden, dass IL-8 stark chemotaktisch wirkt (Kawa et al., 1997). Die Positivkontrolle ohne Inhibitor erzielte im Migrations-Assay die meisten migrierten PMN. Bereits ab einer JAK2-Inhibitor-Konzentration von 25 ng/ml konnte eine signifikante Verminderung der Migration durch die Polycarbonatmembran erreicht werden.

Der Effekt beruht am wahrscheinlichsten auf der Blockade des Signalwegs von Zytokinen und Chemokinen der PMN. Neben der chemotaktischen Wirkung auf PMN, führt IL-8 zur Degranulation und Freisetzung von Enzymen (Baggiolini und Clark-Lewis, 1992). Zu den freigesetzten Stoffen, welche die Migration der umliegenden PMN verstärken, zählen zum Beispiel GM-CSF und IFN- γ . Die PMN gehen eine Adhäsion mit der Polycarbonatmembran ein und unter Einfluss von Chemokinen, wie die oben genannten IL-8, IFN- γ und GM-CSF, werden diese zur Migration angeregt (Hamilton, 1993; Schroder et al., 2004).

Interleukin 8 bindet an die G-Protein vermittelten CXC-Rezeptoren 1 und 2 und löst eine Signaltransduktionskaskade aus (Baggiolini und Clark-Lewis, 1992). CEP-33779, der die JAK2/STAT-Signalwege über den Tyrosinrezeptor beeinflusst, hat demnach keinen bekannten direkten Effekt auf die IL-8 induzierte Migration. So kommen am ehesten Zytokine in Frage, die durch IL-8-Stimulation von PMN freigesetzt werden und weitere PMN zur Migration anregen, wie GM-CSF und IFN- γ (Hamilton, 1993; Schroder et al., 2004). Eine weitere Möglichkeit wäre eine noch nicht beschriebene Interaktion des IL-8 Rezeptor-Signalwegs mit der STAT 1, 3, oder 5 des JAK2-Transduktionswegs.

4.6 Das Gefrierschnittmodell

4.6.1 Versuchsprinzip des Gefrierschnittmodells

Von den 6 µm dünnen Präparaten aus humaner Vorhaut werden je drei Stück auf einem Superfrost Plus Objektträger platziert und bei -80 °C gelagert. Bei sorgfältiger Durchführung bleiben die Struktur der Haut und die durch die elastischen Fasern resultierende Spannung erhalten. Durch den Prozess der Aktivierung von PMN durch den Immunkomplex und nachfolgender Degranulation entsteht eine DES. Das ist zu erklären durch die Destruktion der Ankerfibrillen und darauf das folgende Restringieren der Haut (Sitaru, 2007).

4.6.2 Der Effekt des Januskinase-2-Inhibitors auf die DES

Um die Pathogenese der EBA aus mehreren Blickwinkeln zu betrachten, ist das Gefrierschnittmodell aufgrund der einfachen und schnellen Durchführung gut geeignet. Dabei wird *ex vivo* am Modell der humanen Haut die Aktivierung von PMN durch den Immunkomplex zwischen Antikörper und dem Kollagen Typ VII gezeigt. Die verursachte DES kann nach Färbung histologisch nachgewiesen werden (Sitaru, 2007). Ursächlich für die Separation der Epidermis von der Dermis sind unter anderem die PMN, die durch den Immunkomplex zur dermo-epidermalen Junctionszone rekrutiert werden und dort unter mikroskopischer Betrachtung gehäuft vorzufinden sind (Sitaru et al., 2002). Die PMN setzen reaktive Sauerstoffspezies frei, die durch das Enzym NADPH-Oxidase katalysiert werden. Der Effekt von ROS auf die Spaltbildung wurde in Studien belegt. (Chiriac et al., 2007). So wie ROS, sind die durch PNM sekretierten Elastasen ein wichtiger Teil der Immunantwort auf zum Beispiel gramnegative Keime (Papayannopoulos et al., 2010). Der Einfluss von neutrophiler Elastase auf die DES konnte gezeigt werden (Shimanovich et al., 2004).

In dieser Arbeit wurde die Inhibition des CEP-33779 auf PMN und somit auf die dermo-epidermale Spaltbildung mittels Gefrierschnittmodell untersucht. Es konnte eine signifikante Reduktion der DES beobachtet werden. Zu erklären ist dieser Effekt durch eine noch nicht beschriebene direkte Hemmung der Signalwege von

aktivierenden Fc γ -Rezeptoren durch den JAK2-Inhibitor. Darüber hinaus aktivieren sich PMN nach Immunkomplexbildung gegenseitig durch Zytokine, dessen Signaltransduktion über den STAT 1, 3 oder 5 vermittelt wird, die ebenfalls durch JAK2 gehemmt werden (Cassatella, 1999; O'Shea et al., 2002; Schindler et al., 2004; Witko-Sarsat et al., 2000;). Zum Beispiel bewirkt GM-CSF eine Potenzierung der ROS Freisetzung aus PMN (Dang et al., 1999). Das Resultat der Inhibierung wäre eine Reduktion proteolytischer Enzyme und ROS, welche ansonsten, wie bei der Positivkontrolle, zur DES führen.

Die Versuchsbedingungen sind soweit wie möglich dem in menschlichen Körper nachempfunden. Es wurden aus Vollblut gesunder Donatoren PMN separiert. Die Gefrierschnitte aus humaner Vorhaut wurden mit Kaninchen-anti-human-Antikörpern gegen Kollagen Typ VII beimpft, um so einen Immunkomplex entstehen zu lassen. Die Inkubation der Präparate erfolgte stets bei 37 °C. Aufgrund dieser Versuchsbedingungen kann auf die Pathogenese in vivo beim Menschen geschlossen und Therapieansätze unter kontrollierten und gut reproduzierbaren Voraussetzungen untersucht werden. Jedoch nicht alle Aspekte der Pathogenese, wie zum Beispiel die Migration der PMN aus dem Gefäßsystem zum Entzündungsgeschehen, können mit diesem Modell beleuchtet werden. Dieser Schritt wird mit dem direkten Auftragen der Zellen auf das Präparat übergegangen. Deshalb wird dieser Teil in einem weiteren Versuch, dem Migrations-Assay, behandelt. Durch die Separation der PMN aus dem Vollblut werden alle anderen Bestandteile ausgewaschen, wie das Komplementsystem, dem in der Pathogenese eine mögliche Rolle zugesprochen wird und weitere Zellen des Immunsystems, die mit den PMN interagieren.

Bei Versuchsdurchläufen, in denen die Positivkontrolle keine Spaltbildung aufwies, sind verschiedenste Ursachen möglich. Im Vergleich zu den anderen Methoden dieser Arbeit, wie ROS-Assay und Migration-Assay, konnte im Kryosektion-Modell in diesen Fällen keine ausreichende Aktivierung der PMN erfolgen, die dann zu einer dermo-epidermalen Spaltbildung führt. Die Gründe hierfür sind letztlich nicht bekannt. Möglich ist zum Beispiel, dass die ROS-Freisetzung lediglich einen Aspekt der PMN-Aktivierung erfasst. Zur Induktion der dermo-epidermalen Spaltbildung sind jedoch mindestens drei Schritte notwendig; beginnend mit der Bindung an die dermo-epidermale Junctionszone, der ROS- und der Proteasen-Freisetzung. Somit ist diese Methode sehr wahrscheinlich auf eine deutlichere

Aktivierung der PMN angewiesen, und daher auch wesentlich weniger sensitiv als die beiden anderen Testverfahren. Eine weitere denkbare Fehlerursache könnte ein im Herstellungsprozess des Kryostatschnittes entstandener Defekt oder während des Experimentes durch manuelle Schädigung in der Vorbereitung oder des Waschens der Präparate sein, wodurch eine Auswertung nicht möglich wäre. Zusammenfassend beschrieben, ist das Gefrierschnittmodell eine häufig reproduzierbare und schnelle Möglichkeit, eine Substanz im Hinblick auf den Einfluss in der Pathogenese der EBA zu untersuchen. Der in dieser Arbeit verwendete CEP-33779 konnte mit diesem Modell nach Beseitigung der Fehlerquellen signifikante Ergebnisse erzielen. Es konnte gezeigt werden, dass bereits geringe Konzentrationen eine deutliche Reduktion der Spaltbildung zur Folge hatten und in höheren Dosierungen die DES vollständig ausblieb. Obwohl nicht bekannt ist, mit welchen humanen Fc γ -Rezeptoren Kaninchen-IgG interagieren, zeigen die Daten aus dem Gefrierschnitt-Assay, dass dies zu einer Aktivierung der PMN führt. In Zusammenschau mit den weiter erhobenen Daten in dieser Arbeit legt dies dennoch den Schluss nahe, dass JAK2 an der Aktivierung von PMN über aktivierende Fc γ -Rezeptoren beteiligt ist.

4.7 Der inhibitorische Effekt von CEP-33779 auf die Freisetzung von Elastase aus aktivierten PMN

Im Elastase-Assay-Modell konnten die Auswirkungen einer JAK2-Blockade auf die Elastasefreisetzung aus PMN gezeigt werden. Ähnlich wie bei dem ROS-Assay konnten durch einen Immunkomplex aus hCol7 und IgG1 die PMN aktiviert werden und eine Elastasefreisetzung gemessen werden. In den Versuchsreihen aus Immunkomplex, PMN und CEP-33779 konnte eine dosisabhängige Reduktion der Elastase beobachtet werden. Eine signifikante Inhibition trat bei einer Konzentration von 25 ng/ml ein. Dieser Effekt ist durch die Inhibition von Zytokinen des JAK/STAT 1, 3, 4, 5 Signalwegs durch den CEP-33779 zu erklären. Nach der Bindung der PMN über Fc γ -Rezeptoren am Immunkomplex kommt es zur Degranulation und Freisetzung von Zytokinen und Enzymen. Elastase befindet sich in den azurophilen Granula der PMN und wird nach Aktivierung freigegeben (Korkmaz et al., 2010). Zytokine wie GM-CSF und IFN- γ aktivieren wiederum über den JAK2-Rezeptor die PMN (Cassatella, 1999; Schroder et al., 2004). Die

Unterbrechung der Autostimulation hemmt die Granulozytenaktivierung. Als weiteren Mechanismus käme eine direkte Interaktion des JAK/STAT-Signalwegs mit der Fc γ -Rezeptoren-Transduktion in Frage. Ein solcher Zusammenhang wurde noch nicht beschrieben.

4.8 In vivo Mausexperimente mit JAK2 bei passiv induzierter EBA

Basierend auf den Daten dieser Arbeit wurde die Wirksamkeit des CEP-33779 in vivo an Mäusen im passiven Modell untersucht. Die Versuchsmäuse erhielten sechs subkutane Injektionen von Kaninchen-anti-human-COL7-IgG, um die EBA zu induzieren. Gleichzeitig wurden mehrere Testreihen durchgeführt, bei denen 5, 10 und 15 mg/kg des CEP-33779 oral verabreicht wurden. Ein klinischer Score wurde berechnet, indem der prozentuale Anteil der bullös veränderten Hautläsionen von der Gesamtkörperoberfläche ermittelt wurde. Nach 4, 8 und 12 Tagen wurde erneut geprüft. Aus diesen Daten wurde AUC (Area under the Curve) berechnet und mit der Krankheitsschwere gleichgestellt. Bereits 5 mg/kg hatten eine signifikante Verminderung der Krankheitsschwere zur Folge. Bei der Maximaldosis von 15 mg/kg war nur ein geringer Unterschied zu 10 mg/kg zu beobachten.

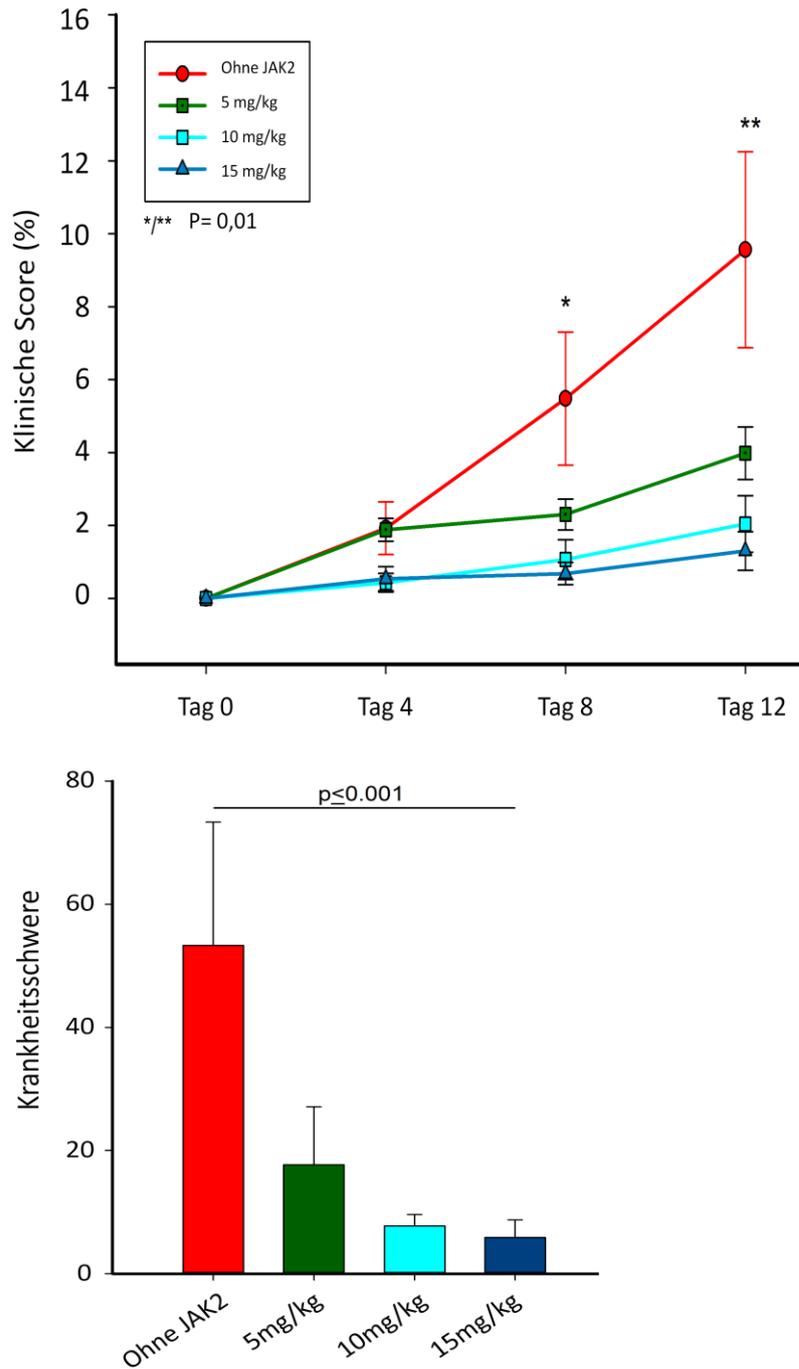


Abbildung 21: Der Krankheitsverlauf ist abhängig von der Konzentration des CEP-33779. Auf dem oben abgebildeten Diagramm ist der prozentuale Anteil der von EBA befallenen Haut der verschiedenen Versuchsreihen vom 1. bis 12. Tag aufgetragen. Auf dem unten abgebildeten Diagramm ist die Krankheitsschwere der einzelnen Versuchsreihen gegenübergestellt. Es konnte bereits bei der niedrigsten Konzentration von 5 mg/kg eine signifikante Reduktion der Krankheitsschwere beobachtet werden.

4.9 Potentielle Nebenwirkungen des CEP-33779

Bei Betrachtung der Zytokine, deren Signaltransduktion überwiegend über JAK2 und STAT 1, 3, 4 und 5 laufen, liegen neben immunmodulierenden vor allem myelosuppressive Nebenwirkungen nahe. Aufgrund der Blockade von Erythropoetin, Thrombopoetin und dem Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) könnten Anämien, Leukozytopenien und Thrombozytopenien auftreten.

Zum heutigen Stand (2015) sind noch keine JAK2-Inhibitoren zugelassen. Jedoch befinden sich einige in den klinischen Phasen zur Therapie der Myelofibrose. Pacritinib, das vorwiegend die JAK2 inhibiert, befindet sich in der klinischen Phase III (Hatzimichael et al., 2014). Das Nebenwirkungsprofil wurde an 24 Freiwilligen randomisiert in niedrigen oralen Dosen von 100 und 200 mg sowie 400 mg getestet. Pacritinib wurde gut toleriert; hauptsächlich sind gastrointestinale Beschwerden wie Diarrhö, Übelkeit und Erbrechen aufgetreten. Im Verlauf haben 191 Patienten mit Myelofibrose in klinischen Studien teilgenommen. Es sind in 19,4 % der Fälle eine behandlungsabhängige Thrombozytopenie und in 25,6 % eine Anämie aufgetreten. Bei einer durch die Myelofibrose bedingten Thrombozytopenie war keine Dosisreduktion erforderlich. Weitere Nebenwirkungen wie Fatigue, periphere Ödeme, Pruritus, Dyspnoe, Husten, Kopfschmerz und Schlafstörungen wurden vereinzelt berichtet (Verstovsek et al., 2013).

Um systemische Nebenwirkungen zu minimieren, ist bei der EBA die Möglichkeit gegeben, den Wirkstoff topisch auf die befallenen Hautareale aufzutragen. Mit der geeigneten Trägersubstanz könnte der CEP-33779 am Ort des Entzündungsgeschehens wirken.

Die direkte schädigende Wirkung von CEP-33779 wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt und zeigte keine signifikante Zytotoxizität des Inhibitors oder des Lösungsmittels gegenüber PMN.

4.10 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neuer Therapieansatz für die EBA in Form eines JAK2-Inhibitors untersucht. Die durchgeführten Experimente repräsentieren verschiedene Ebenen in der Pathogenese der dermo-epidermalen Spaltbildung in der EBA, wie die ROS- und Elastasefreisetzung aus PMN und die Migration der PMN zum Ort des Entzündungsgeschehens. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Hemmung dieser PMN-Funktionen schon bei niedrigen Konzentrationen des JAK-2-Inhibitors CEP-33779. Im Gefrierschnittmodell konnte eine signifikante Reduktion der dermo-epidermale Spaltbildung ex vivo erreicht werden.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass CEP-33779 die Aktivierung der PMN verhindert. In allen Experimenten - ausgenommen die Testung der Migrationseigenschaften - wurden die PMN mit einem Immunkomplex aus humanen Kollagen Typ VII und IgG1-Antikörpern stimuliert, was nach der Bindung über den Fcγ-Rezeptoren eine Aktivierung zur Folge hat. Jedoch ist eine Interaktion der Fcγ-Rezeptoren-Signaltransduktion und des JAK2/STAT-Signalwegs noch nicht beschrieben. Eine mögliche Erklärung wäre, dass nach initialer Aktivierung der PMN proinflammatorische Enzyme wie z.B. IFN-γ und GM-CSF freigesetzt werden, der Signalweg jedoch durch den CEP-33779 blockiert und somit eine Potenzierung der Aktivierung von PMN verhindert wird. Mögliche Wechselbeziehungen der beiden Signalwege könnten in Folgeexperimenten untersucht werden. Eine weitere Möglichkeit wäre eine zytotoxische Wirkung des CEP-33779 oder des Lösungsmittels DMSO auf die PMN, welche eine Hemmung der Aktivierung in den Versuchsergebnissen imitieren könnte. Diese mögliche Toxizität wurde mittels Durchflusszytometrie und spezieller Färbung ausgeschlossen.

Die signifikanten Ergebnisse der in vitro Experimente wurden in in vivo Mausversuchen bestätigt. Hier zeigte sich eine Reduktion der bullös veränderten Hautläsionen bereits bei einer Dosis von 5 mg/kg. Somit könnte eine Erprobung vom CEP-33779 bei EBA-Patienten in Betracht gezogen werden. Ein Problem könnte die niedrige Prävalenz der EBA und somit die niedrigen Fallzahlen sein. Eine Inhibition des JAK2/STAT-Signalwegs hat jedoch nicht nur einen entzündungsmodulierenden Einfluss. Häufig treten auch myelosuppressive

Nebenwirkungen auf. Da EBA nur das Organ Haut betrifft, könnten Experimente mit topischer Anwendung eines JAK2-Inhibitors folgen, um die systemischen Nebenwirkungen umgehen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erste Anhaltspunkte für eine neue Möglichkeit der Behandlung der EBA. Der CEP-33779 bewirkte bereits bei einer Monotherapie in Mausversuchen eine Reduktion der Hautläsionen. Möglich wäre eine Testung eines bereits in der klinischen Phase befindlichen Januskinase-2-Inhibitors, wie z.B. der Wirkstoff Pacritinib, bei EBA-Patienten. Obwohl der CEP-33779 durch eine spezifische Hemmung der Januskinase 2 zu einer Inhibition der PMN-Funktionen führt, sind weitreichende Nebenwirkungen wie Thrombozytopenien, Anämie und Leukozytopenien zu erwarten.

5 Zusammenfassung

Die Epidermolysis bullosa acquisita gehört zu den blasenbildenden Autoimmundermatosen und stellt sich klinisch mit körperstammbetonten vesikobullösen Erosionen dar, die mit Schmerzen und Pruritus einhergehen. Die Pathogenese erfolgt durch eine Immunantwort nach Autoantikörperbildung gegen das Kollagen Typ VII. Die Autoantikörper bilden mit der Zielstruktur einen Immunkomplex, an den sich PMN über Fc γ -Rezeptoren binden und dort aktiviert werden. Es folgt die Sekretion von Elastase, Gelatinase B, reaktive Sauerstoffspezies sowie verschiedene Zytokine wie z.B. GM-CSF und Interferon- γ . Es entsteht eine Verstärkung der Entzündungsreaktion und eine krankheitstypische dermo-epidermale Spaltbildung. Die zur Verfügung stehende Therapie beschränkt sich auf Immunsuppressiva und Kortikosteroide. Jedoch sind häufige Rezidive beschrieben. Aufgrund der aktuell frustranen Behandlungsmöglichkeiten werden neue Therapieansätze getestet. In dieser Arbeit ein denkbarer Ansatz mit dem JAK2-Inhibitor CEP-33779 überprüft. Bei der Pathogenese spielen die PMN die entscheidende Rolle. In dieser Arbeit wurde der Einfluss der CEP-33779 auf die Funktionen der PMN im Hinblick auf die Krankheitsentstehung experimentell untersucht. Sie beinhaltet die Auswirkung auf Sekretion von Elastase und reaktiver Sauerstoffspezies, auf die Migration durch eine dem Epithel nachempfundenen Membran und Untersuchungen am Gefrierschnittmodell. Der CEP-33779 ist ein Januskinase-2-Inhibitor, welcher die Signaltransduktion einiger proinflammatorischen Zytokine, wie z.B. GM-CSF und γ -Interferon, blockiert und somit die Aktivierung der PMN verhindert. Bei dem Elastase- und ROS-Versuchsmodell wurden PMN mit einem Immunkomplex aus humanem COL7 und dem von Mäusen gewonnenen anti-human-IgG gegen hCOL7 aktiviert und in unterschiedlichen Konzentrationen des CEP-33779 inkubiert. Der Effekt auf die Sekretion wurde mit einem ELISA-Plattenlesegerät ermittelt. Im Migrationsmodell wurden PMN mit IL-8 aktiviert und die Anzahl der durch eine Polycarbonatmembran migrierten Zellen bei verschiedenen CEP-33779-Konzentrationen gemessen. Beim Gefrierschnittmodell werden ex vivo menschliche Gewebsschnitte mit IgG-Antikörpern gegen COL7 und PMN-Suspension inkubiert. Infolge der Aktivierung freigesetzter Proteasen und ROS

entsteht in der DEJ eine Spaltbildung, deren Ausprägung unter verschiedenen CEP-33779-Konzentrationen beobachtet werden konnte. Die DES wurde nach HE-Färbung mittels Mikroskop beurteilt und in Relation zu den intakten Arealen gesetzt. Mithilfe dieser Modelle konnte die Auswirkung des JAK2-Inhibitors auf die Sekretion der Elastase und ROS sowie die Migration aus den Blutgefäßen zum Ort der Entzündung simuliert werden. Durch das Gefrierschnittmodell konnten ex vivo Bedingungen im menschlichen Körper nachempfunden und die Wirkung des CEP-33779 auf die DES beobachtet werden. In allen oben aufgeführten Experimenten konnte eine signifikante, dosisabhängige Inhibierung der getesteten Granulozytenfunktionen sowie eine Hemmung der dermo-epidermalen Separation im Gefrierschnittmodell beobachtet werden. Um eine Zytotoxizität des JAK2-Inhibitors und dessen Lösungsmittel DMSO auf PMN auszuschließen, wurden PMN mit den Konzentrationen des CEP-33779 und der maximalen Inkubationsdauer aus den vorangegangenen Versuchen behandelt. Mittels spezieller Färbung konnten apoptotische und nekrotische Zellen mittels Durchflusszytometrie identifiziert werden.

6 Literaturverzeichnis

- Arbuckle, M.R., McClain, M.T., Rubertone, M.V., Scofield, R.H., Dennis, G.J., James, J.A., Harley, J.B., (2003). Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* 349, 1526–1533.
- Baggiolini, M., Clark-Lewis, I., (1992). Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett.* 307, 97–101.
- Bédard, M., McClure, C.D., Schiller, N.L., Francoeur, C., Cantin, A., Denis, M., (1993). Release of interleukin-8, interleukin-6, and colony-stimulating factors by upper airway epithelial cells: implications for cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 9, 455–462.
- Bei, L., Hu, T., Qian, Z.M., Shen, X., (1998). Extracellular Ca²⁺ regulates the respiratory burst of human neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1404, 475–483.
- Belaouaj, A., McCarthy, R., Baumann, M., Gao, Z., Ley, T.J., Abraham, S.N., Shapiro, S.D., (1998). Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nat. Med.* 4, 615–618.
- Berg, J.M., Stryer, L., Tymoczko, J.L., (2003). Biochemie. *Spektrum Akad. Verl, Heidelberg* [etc.]. S. 499-451
- Bernard, P., Vaillant, L., Labeille, B., Bedane, C., Arbeille, B., Denoeux, J.P., Lorette, G., Bonnetblanc, J.M., Prost, C., (1995). Incidence and distribution of subepidermal autoimmune bullous skin diseases in three French regions. *Bullous Diseases French Study Group. Arch. Dermatol.* 131, 48–52.
- Bhagwat, Neha, Priya Koppikar, Matthew Keller, Sachie Marubayashi, Kaitlyn Shank, Raajit Rampal, Jun Qi, u.a (2014). Improved targeting of JAK2 leads to increased therapeutic efficacy in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 123, Nr. 13: 2075–83
- 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.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., Howard, J.C., (1997). CELLULAR RESPONSES TO INTERFERON- γ . *Annu. Rev. Immunol.* 15, 749–795.
- Bommhardt, U., Beyer, M., Hünig, T., Reichardt, H.M., (2004). Molecular and cellular mechanisms of T cell development. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 61, 263–280.

- Borradori, L., Sonnenberg, A., (1999). Structure and Function of Hemidesmosomes: More Than Simple Adhesion Complexes. *J. Invest. Dermatol.* 112, 411–418.
- Braun-Falco, Otto, Gerd Plewig, Helmut Heinrich Wolff, und Walter Burgdorf. (2000) *Dermatology*. Springer Science & Business Media,. S. 3-5
- Buijsrogge, J.J.A., Diercks, G.F.H., Pas, H.H., Jonkman, M.F., (2011). The many faces of epidermolysis bullosa acquisita after serration pattern analysis by direct immunofluorescence microscopy. *Br. J. Dermatol.* 165, 92–98.
- Burgeson, R.E., (1993). Type VII Collagen, Anchoring Fibrils, and Epidermolysis Bullosa. *J. Invest. Dermatol.* 101, 252–255.
- Burgeson, R.E., Christiano, A.M., (1997). The dermal—epidermal junction. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 651–658.
- Campbell, I.K., Rich, M.J., Bischof, R.J., Hamilton, J.A., (2000). The colony-stimulating factors and collagen-induced arthritis: exacerbation of disease by M-CSF and G-CSF and requirement for endogenous M-CSF. *J. Leukoc. Biol.* 68, 144–150.
- Campbell, P.J., Green, A.R., (2006). The Myeloproliferative Disorders. *N. Engl. J. Med.* 355, 2452–2466.
- Cassatella, M.A., (1999). Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv. Immunol.* 73, 369–509.
- Cedergren, J., Forslund, T., Sundqvist, T., Skogh, T., (2007). Intracellular oxidative activation in synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis but not from other arthritis patients. *J. Rheumatol.* 34, 2162–2170.
- Chen, M., Kim, G.H., Prakash, L., Woodley, D.T., (2012). Epidermolysis Bullosa Acquisita: Autoimmunity to Anchoring Fibril Collagen. *Autoimmunity* 45, 91–101.
- Chen, M., Marinkovich, M.P., Jones, J.C.R., O’Toole, E.A., Li, Y.-Y., Woodley, D.T., (1999). NC1 Domain of Type VII Collagen Binds to the β 3 Chain of Laminin 5 Via a Unique Subdomain Within the Fibronectin-Like Repeats. *J. Invest. Dermatol.* 112, 177–183.
- Chen, M., Marinkovich, M.P., Veis, A., Cai, X., Rao, C.N., O’Toole, E.A., Woodley, D.T., (1997). Interactions of the Amino-terminal Noncollagenous (NC1) Domain of Type VII Collagen with Extracellular Matrix Components A POTENTIAL ROLE IN EPIDERMAL-DERMAL ADHERENCE IN HUMAN SKIN. *J. Biol. Chem.* 272, 14516–14522.
- Chen, Y., Junger, W.G., (2012). Measurement of Oxidative Burst in Neutrophils, in: Ashman, R.B. (Ed.), *Leucocytes, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, S. 115–124.

- Chiriac, M., Roesler, J., Sindrilaru, A., Scharffetter-Kochanek, K., Zillikens, D., Sitaru, C., (2007). NADPH oxidase is required for neutrophil-dependent autoantibody-induced tissue damage. *J. Pathol.* 212, 56–65.
- Clark-Lewis, I., Schumacher, C., Baggiolini, M., Moser, B., (1991). Structure-activity relationships of interleukin-8 determined using chemically synthesized analogs. Critical role of NH₂-terminal residues and evidence for uncoupling of neutrophil chemotaxis, exocytosis, and receptor binding activities. *J. Biol. Chem.* 266, 23128–23134.
- Clark, R.A., (1999). Activation of the Neutrophil Respiratory Burst Oxidase. *J. Infect. Dis.* 179, S309–S317.
- Constantinescu, S.N., (2009). A new era for small molecule screening: from new targets, such as JAK2 V617F, to complex cellular screens. *J. Cell. Mol. Med.* 13, 212–214.
- Cook, N., Dexter, T.M., Lord, B.I., Cragoe, E.J., Whetton, A.D., (1989). Identification of a common signal associated with cellular proliferation stimulated by four haemopoietic growth factors in a highly enriched population of granulocyte/macrophage colony-forming cells. *EMBO J.* 8, 2967–2974.
- Cunningham, B.B., Kirchmann, T.T.T., Woodley, D., (1996). Colchicine for epidermolysis bullosa acquisita. *J. Am. Acad. Dermatol.* 34, 781–784.
- Cusick, M.F., Libbey, J.E., Fujinami, R.S., (2012). Molecular mimicry as a mechanism of autoimmune disease. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 42, 102–111.
- Dang, P.M.-C., Dewas, C., Gaudry, M., Fay, M., Pedruzzi, E., Gougerot-Pocidallo, M.-A., Benna, J.E., (1999). Priming of Human Neutrophil Respiratory Burst by Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor (GM-CSF) Involves Partial Phosphorylation of p47 phox. *J. Biol. Chem.* 274, 20704–20708.
- Davidson, A., Diamond, B., (2001). Autoimmune Diseases. *N. Engl. J. Med.* 345, 340–350.
- D’Cruz, D., (2000). Autoimmune diseases associated with drugs, chemicals and environmental factors. *Toxicol. Lett.* 112-113, 421–432.
- Downey, D.G., Bell, S.C., Elborn, J.S., (2009). Neutrophils in cystic fibrosis. *Thorax* 64, 81–88.
- Edwards, S.W., (2005). Biochemistry and Physiology of the Neutrophil. *Cambridge University Press.* 4-18
- Engineer, L., Ahmed, A.R., (2001). Emerging treatment for epidermolysis bullosa acquisita. *J. Am. Acad. Dermatol.* 44, 818–828.

- Fine, J.D., Tyring, S., Gammon, W.R., (1989). The presence of intra-lamina lucida blister formation in epidermolysis bullosa acquisita: possible role of leukocytes. *J. Invest. Dermatol.* 92, 27–32.
- Fortin, C.F., Lesur, O., Fulop, T., (2007). Effects of TREM-1 activation in human neutrophils: activation of signaling pathways, recruitment into lipid rafts and association with TLR4. *Int. Immunol.* 19, 41–50.
- Fuhler, G.M., Blom, N.R., Coffey, P.J., Drayer, A.L., Vellenga, E., (2007). The reduced GM-CSF priming of ROS production in granulocytes from patients with myelodysplasia is associated with an impaired lipid raft formation. *J. Leukoc. Biol.* 81, 449–457.
- Gammon, W.R., Heise, E.R., Burke, W.A., Fine, J.D., Woodley, D.T., Briggaman, R.A., (1988). Increased frequency of HLA-DR2 in patients with autoantibodies to epidermolysis bullosa acquisita antigen: evidence that the expression of autoimmunity to type VII collagen is HLA class II allele associated. *J. Invest. Dermatol.* 91, 228–232.
- Gammon, W.R., Murrell, D.F., Jenison, M.W., Padilla, K.M., Prisayanh, P.S., Jones, D.A., Briggaman, R.A., Hunt, S.W., (1993). Autoantibodies to Type VII Collagen Recognize Epitopes in a Fibronectin-Like Region of the Noncollagenous (NC1) Domain. *J. Invest. Dermatol.* 100, 618–622.
- Garcia, R., Gusmani, L., Murgia, R., Guarnaccia, C., Cinco, M., Rottini, G., (1998). Elastase Is the Only Human Neutrophil Granule Protein That Alone Is Responsible for In Vitro Killing of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 66, 1408–1412.
- Ghohestani RF, Nicolas JF, Rousselle P, Claudy AL, (1997). Diagnostic value of indirect immunofluorescence on sodium chloride-split skin in differential diagnosis of subepidermal autoimmune bullous dermatoses. *Arch. Dermatol.* 133, 1102–1107.
- Godaly, G., Proudfoot, A.E., Offord, R.E., Svanborg, C., Agace, W.W., (1997). Role of epithelial interleukin-8 (IL-8) and neutrophil IL-8 receptor A in *Escherichia coli*-induced transuroepithelial neutrophil migration. *Infect. Immun.* 65, 3451–3456.
- Goris, A., Liston, A., (2012). The Immunogenetic Architecture of Autoimmune Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4
- Grimaldi, C.M., Hill, L., Xu, X., Peeva, E., Diamond, B., (2005). Hormonal modulation of B cell development and repertoire selection. *Mol. Immunol.* 42, 811–820.
- Gupta, R., Woodley, D.T., Chen, M., (2012). Epidermolysis Bullosa Acquisita. *Clin. Dermatol.* 30, 60–69.

- Hamilton, J.A., (1993). Colony stimulating factors, cytokines and monocyte-macrophages-some controversies. *Immunol. Today* 14, 18–24.
- Hanada, Toshitkatsu, und Akihiko Yoshimura. (August 2002) Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 13, Nr. 4–5: 413–21.
- Hardy, R.R., Hayakawa, K., (2001). B Cell Development Pathways. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 595–621.
- Hashimoto, T., Ishii, N., Ohata, C., Furumura, M., (2012). Pathogenesis of epidermolysis bullosa acquisita, an autoimmune subepidermal bullous disease. *J. Pathol.* 228, 1–7.
- Hatzimichael, E., Tsolas, E., Briasoulis, E., (2014). Profile of pacritinib and its potential in the treatment of hematologic disorders. *J. Blood Med.* 5, 143–152.
- Ishii, N., Hamada, T., Dainichi, T., Karashima, T., Nakama, T., Yasumoto, S., Zillikens, D., Hashimoto, T., (2010). Epidermolysis bullosa acquisita: what's new? *J. Dermatol.* 37, 220–230.
- Ishii, N., Yoshida, M., Hisamatsu, Y., Ishida-Yamamoto, A., Nakane, H., Iizuka, H., Tanaka, T., Hashimoto, T., (2004). Epidermolysis bullosa acquisita sera react with distinct epitopes on the NC1 and NC2 domains of type VII collagen: study using immunoblotting of domain-specific recombinant proteins and postembedding immunoelectron microscopy. *Br. J. Dermatol.* 150, 843–851.
- James, C., Ugo, V., Le Couédic, J.-P., Staerk, J., Delhommeau, F., Lacout, C., Garçon, L., Raslova, H., Berger, R., Bennaceur-Griscelli, A., Villeval, J.L., Constantinescu, S.N., Casadevall, N., Vainchenker, W., (2005). A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434, 1144–1148.
- Jones, A.V., Chase, A., Silver, R.T., Oscier, D., Zoi, K., Wang, Y.L., Cario, H., Pahl, H.L., Collins, A., Reiter, A., Grand, F., Cross, N.C.P., (2009). JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat. Genet.* 41, 446–449.
- Jones, D.A., Hunt, S.W. 3rd, Prisayanh, P.S., Briggaman, R.A., Gammon, W.R., (1995). Immunodominant autoepitopes of type VII collagen are short, paired peptide sequences within the fibronectin type III homology region of the noncollagenous (NC1) domain. *J. Invest. Dermatol.* 104, 231–235.
- Kanitakis, J., (2002). Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur. J. Dermatol.* 12, S. 390–401.

- Kasperkiewicz, M., Nimmerjahn, F., Wende, S., Hirose, M., Iwata, H., Jonkman, M.F., Samavedam, U., Gupta, Y., Möller, S., Rentz, E., Hellberg, L., Kalies, K., Yu, X., Schmidt, E., Häsler, R., Laskay, T., Westermann, J., Köhl, J., Zillikens, D., Ludwig, R.J., (2012). Genetic identification and functional validation of FcγRIV as key molecule in autoantibody-induced tissue injury. *J. Pathol.* 228, 8–19.
- Kawa, S., Kimura, S., Hakomori, S., Igarashi, Y., (1997). Inhibition of chemotactic motility and trans-endothelial migration of human neutrophils by sphingosine 1-phosphate. *FEBS Lett.* 420, 196–200.
- Keene, D., Sakai, L., Lunstrum, G., Morris, N., Burgeson, R., (1987). Type VII collagen forms an extended network of anchoring fibrils. *J. Cell Biol.* 104, 611–621.
- Kerl, H., Garbe, C., Cerroni, L., Wolff, H., (2003). *Histopathologie der Haut*, s. 43–50. Springer DE.
- Kim, J.H., Kim, S.-C., (2013). Epidermolysis bullosa acquisita. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* 27, 1204–1213.
- Kim, S., Kim, J., Kim, Y., (2011). Epidermolysis Bullosa Acquisita: A Retrospective Clinical Analysis of 30 Cases. *Acta Derm. Venereol.* 91, 307–312.
- Kirtschig G, Murrell D, Wojnarowska F, Khumalo N, (2002). Interventions for mucous membrane pemphigoid/cicatricial pemphigoid and epidermolysis bullosa acquisita: A systematic literature review. *Arch. Dermatol.* 138, 380–384.
- Kisseleva, T., Bhattacharya, S., Braunstein, J., Schindler, C.W., (2002). Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 285, 1–24.
- Kopecki, Z., Arkell, R.M., Strudwick, X.L., Hirose, M., Ludwig, R.J., Kern, J.S., Bruckner-Tuderman, L., Zillikens, D., Murrell, D.F., Cowin, A.J., (2011). Overexpression of the Flii gene increases dermal-epidermal blistering in an autoimmune ColVII mouse model of epidermolysis bullosa acquisita. *J. Pathol.* 225, 401–413.
- Kopecki, Z., Ruzehaji, N., Turner, C., Iwata, H., Ludwig, R.J., Zillikens, D., Murrell, D.F., Cowin, A.J., (2013). Topically applied flightless I neutralizing antibodies improve healing of blistered skin in a murine model of epidermolysis bullosa acquisita. *J. Invest. Dermatol.* 133, 1008–1016.
- Korkmaz, B., Horwitz, M.S., Jenne, D.E., Gauthier, F., (2010). Neutrophil Elastase, Proteinase 3, and Cathepsin G as Therapeutic Targets in Human Diseases. *Pharmacol. Rev.* 62, 726–759.

- Kralovics, R., Teo, S.-S., Li, S., Theoharides, A., Buser, A.S., Tichelli, A., Skoda, R.C., (2006). Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. *Blood* 108, 1377–1380.
- Kumar, C., Purandare, A.V., Lee, F.Y., Lorenzi, M.V., (2009). Kinase drug discovery approaches in chronic myeloproliferative disorders. *Oncogene* 28, 2305–2313.
- Kumar, V., Sharma, A., (2010). Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *Int. Immunopharmacol.* 10, 1325–1334.
- Lam, C., Vleugels, R.A., (2013). Epidermolysis Bullosa Acquisita. *N. Engl. J. Med.* 368, e17.
- Lapiere, J.C., Woodley, D.T., Parente, M.G., Iwasaki, T., Wynn, K.C., Christiano, A.M., Uitto, J., (1993). Epitope mapping of type VII collagen. Identification of discrete peptide sequences recognized by sera from patients with acquired epidermolysis bullosa. *J. Clin. Invest.* 92, 1831–1839.
- Libbey, J.E., McCoy, L.L., Fujinami, R.S., (2007). Molecular mimicry in multiple sclerosis. *Int. Rev. Neurobiol.* 79, 127–147.
- Lowell, Clifford A. (März 2011): Src-family and Syk Kinases in Activating and Inhibitory Pathways in Innate Immune Cells: Signaling Cross Talk. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3, Nr. 3.
- Ludwig, R.J., (2013). Clinical Presentation, Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment of Epidermolysis Bullosa Acquisita. *ISRN Dermatol.* 2013, 1–25.
- Lu, L.D., Stump, K.L., Wallace, N.H., Dobrzanski, P., Serdikoff, C., Gingrich, D.E., Dugan, B.J., Angeles, T.S., Albom, M.S., Mason, J.L., Ator, M.A., Dorsey, B.D., Ruggeri, B.A., Seavey, M.M., (2011). Depletion of autoreactive plasma cells and treatment of lupus nephritis in mice using CEP-33779, a novel, orally active, selective inhibitor of JAK2. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 187, 3840–3853.
- Manz, R.A., Hauser, A.E., Hiepe, F., Radbruch, A., (2005). Maintenance of Serum Antibody Levels. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 367–386.
- Mayadas, T.N., Cullere, X., Lowell, C.A., (2014). The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annu. Rev. Pathol.* 9, 181–218.
- McQualter, J.L., Darwiche, R., Ewing, C., Onuki, M., Kay, T.W., Hamilton, J.A., Reid, H.H., Bernard, C.C.A., (2001). Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor. *J. Exp. Med.* 194, 873–882.
- Megahed, M., Scharffetter-Kochanek, K., (1994). Epidermolysis bullosa acquisita--successful treatment with colchicine. *Arch. Dermatol. Res.* 286, 35–46.

- Mihai, S., Sitaru, C., (2007). Immunopathology and molecular diagnosis of autoimmune bullous diseases. *J. Cell. Mol. Med.* 11, 462–481.
- 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.
- Mul, F.P.J., Zuurbier, A.E.M., Janssen, H., Calafat, J., Wetering, S. van, Hiemstra, P.S., Roos, D., Hordijk, P.L., (2000). Sequential migration of neutrophils across monolayers of endothelial and epithelial cells. *J. Leukoc. Biol.* 68, 529–537.
- Nauseef, W.M., (2007). How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol. Rev.* 219, 88–102.
- Nieboer, C., Boorsma, D.M., Woerdeman, M.J., Kalsbeek, G.L., (1980). Epidermolysis bullosa acquisita. Immunofluorescence, electron microscopic and immunoelectron microscopic studies in four patients. *Br. J. Dermatol.* 102, 383–392.
- Noe, M.H., Chen, M., Woodley, D.T., Fairley, J.A., (2008). Familial epidermolysis bullosa acquisita. *Dermatol. Online J.* 14, 2.
- O’Shea, J.J., Gadina, M., Schreiber, R.D., (2002). Cytokine Signaling in 2002: New Surprises in the Jak/Stat Pathway. *Cell* 109, S121–S131.
- O’Shea, J.J., Kontzias, A., Yamaoka, K., Tanaka, Y., Laurence, A., (2013). Janus kinase inhibitors in autoimmune diseases. *Ann. Rheum. Dis.* 72 Suppl 2, 111–115.
- O’Shea, J.J., Murray, P.J., (2008). Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity* 28, 477–487.
- Papayannopoulos, V., Metzler, K.D., Hakkim, A., Zychlinsky, A., (2010). Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 191, 677–691.
- Parganas, E., Wang, D., Stravopodis, D., Topham, D.J., Marine, J.-C., Teglund, S., Vanin, E.F., Bodner, S., Colamonici, O.R., van Deursen, J.M., Grosveld, G., Ihle, J.N., (1998). Jak2 Is Essential for Signaling through a Variety of Cytokine Receptors. *Cell* 93, 385–395.
- Prüßmann, J., Prüßmann, W., Recke, A., Rentzsch, K., Juhl, D., Henschler, R., Müller, S., Lamprecht, P., Schmidt, E., Csernok, E., Görg, S., Stöcker, W., Zillikens, D., Ibrahim, S.M., Ludwig, R.J., (2014). Co-occurrence of autoantibodies in healthy blood donors. *Exp. Dermatol.* 23, 519–521.

- Rasheed, Z., (2008). Hydroxyl radical damaged immunoglobulin G in patients with rheumatoid arthritis: biochemical and immunological studies. *Clin. Biochem.* 41, 663–669.
- Recke, A., Sitaru, C., Vidarsson, G., Evensen, M., Chiriac, M.T., Ludwig, R.J., Zillikens, D., (2010). Pathogenicity of IgG subclass autoantibodies to type VII collagen: induction of dermal-epidermal separation. *J. Autoimmun.* 34, 435–444.
- Rieger, A.M., Nelson, K.L., Konowalchuk, J.D., Barreda, D.R., (2011). Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *J. Vis. Exp. JoVE.*
- Ridley, Anne J., Martin A. Schwartz, Keith Burridge, Richard A. Firtel, Mark H. Ginsberg, Gary Borisy, J. Thomas Parsons, und Alan Rick Horwitz. (2003) Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. *Science* 302, Nr. 5651. 1704–9.
- Rombouts, Y., Ewing, E., van de Stadt, L.A., Selman, M.H.J., Trouw, L.A., Deelder, A.M., Huizinga, T.W.J., Wuhler, M., van Schaardenburg, D., Toes, R.E.M., Scherer, H.U., (2015). Anti-citrullinated protein antibodies acquire a pro-inflammatory Fc glycosylation phenotype prior to the onset of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 74, 234–241.
- Rose, N.R., Bona, C., (1993). Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol. Today* 14, 426–430.
- Rose, N.R., Mackay, I.R., (2006). Prospectus: The Road to Autoimmune Disease, in: Rose, N.R., Mackay, I.R. (Eds.), *The Autoimmune Diseases* (Fourth Edition). *Academic Press, St. Louis*, pp. 19–25
- Ross, M.H., Pawlina, W., (2006). Histology, s. 443-452. *Lippincott Williams & Wilkins.*
- Saleh, M.A., Ishii, K., Kim, Y.-J., Murakami, A., Ishii, N., Hashimoto, T., Schmidt, E., Zillikens, D., Shirakata, Y., Hashimoto, K., Kitajima, Y., Amagai, M., (2011). Development of NC1 and NC2 domains of type VII collagen ELISA for the diagnosis and analysis of the time course of epidermolysis bullosa acquisita patients. *J. Dermatol. Sci.* 62, 169–175.
- Samavedam, U.K.S.R.L., Iwata, H., Müller, S., Schulze, F.S., Recke, A., Schmidt, E., Zillikens, D., Ludwig, R.J., (2014). GM-CSF Modulates Autoantibody Production and Skin Blistering in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita. *J. Immunol.* 192, 559–571.
- Sandhaus, R.A., Turino, G., (2013). Neutrophil Elastase-Mediated Lung Disease. COPD *J. Chronic Obstr. Pulm. Dis.* 10, 60–63.
- Schindler, C., Levy, D.E., Decker, T., (2007). JAK-STAT Signaling: From Interferons to Cytokines. *J. Biol. Chem.* 282, 20059–20063.

- Schmidt, E., Zillikens, D., (2011). The Diagnosis and Treatment of Autoimmune Blistering Skin Diseases. *Deutsches. Ärzteblatt Int.* 108, 399–405.
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., Hume, D.A., (2004). Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75, 163–189.
- Schwartz, R.H., (2003). T Cell Anergy*. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 305–334.
- Schwegler, J.S., Lucius, R., (2011). Der Mensch - Anatomie und Physiologie, s. 161. *Georg Thieme Verlag.*
- Segal, A.W., (2005). How Neutrophils Kill Microbes. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 197–223.
- Shimanovich, I., Mihai, S., Oostingh, G.J., Ilenchuk, T.T., Bröcker, E.-B., Opdenakker, G., Zillikens, D., Sitaru, C., (2004). Granulocyte-derived elastase and gelatinase B are required for dermal-epidermal separation induced by autoantibodies from patients with epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid. *J. Pathol.* 204, 519–527.
- Shi, Y., Liu, C.H., Roberts, A.I., Das, J., Xu, G., Ren, G., Zhang, Y., Zhang, L., Yuan, Z.R., Tan, H.S.W., Das, G., Devadas, S., 2006. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. *Cell Res.* 16, 126–133.
- Sitaru, C., (2007). Experimental models of epidermolysis bullosa acquisita. *Exp. Dermatol.* 16, 520–531.
- Sitaru, C., Kromminga, A., Hashimoto, T., Bröcker, E.B., Zillikens, D., (2002). Autoantibodies to type VII collagen mediate Fc γ -dependent neutrophil activation and induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. *Am. J. Pathol.* 161, 301–311.
- Sitaru, C., Mihai, S., Otto, C., Chiriac, M.T., Hausser, I., Dotterweich, B., Saito, H., Rose, C., Ishiko, A., Zillikens, D., (2005). Induction of dermal-epidermal separation in mice by passive transfer of antibodies specific to type VII collagen. *J. Clin. Invest.* 115, 870–878.
- Sitaru, C., Zillikens, D., (2005). Mechanisms of blister induction by autoantibodies. *Exp. Dermatol.* 14, 861–875.
- Smoller, B.R., Woodley, D.T., (1992). Differences in direct immunofluorescence staining patterns in epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid. *J. Am. Acad. Dermatol.* 27, 674–678.

- Stump, K.L., Lu, L.D., Dobrzanski, P., Serdikoff, C., Gingrich, D.E., Dugan, B.J., Angeles, T.S., Albom, M.S., Ator, M.A., Dorsey, B.D., Ruggeri, B.A., Seavey, M.M., (2011). A highly selective, orally active inhibitor of Janus kinase 2, CEP-33779, ablates disease in two mouse models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 13, R68.
- Thorsby, E., Lie, B.A., (2005). HLA associated genetic predisposition to autoimmune diseases: Genes involved and possible mechanisms. *Transpl. Immunol., Clinical Immunogenetics and cell therapy* 14, 175–182.
- Tkalcevic, J., Novelli, M., Phylactides, M., Iredale, J.P., Segal, A.W., Roes, J., (2000). Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G. *Immunity* 12, 201–210.
- Travis, J., (1988). Structure, function, and control of neutrophil proteinases. *Am. J. Med.* 84, 37–42.
- Trigo-Guzmán, F.X., Conti, A., Aoki, V., Maruta, C.W., (2003). Epidermolysis Bullosa Acquisita in Childhood *The Journal of Dermatology*, 226–229.
- Vallejo, A.N., Davila, E., Weyand, C.M., Goronzy, J.J., (2004). Biology of T lymphocytes. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 30, 135–157.
- van Eeden, S.F., Klut, M.E., Walker, B.A.M., Hogg, J.C., (1999). The use of flow cytometry to measure neutrophil function. *J. Immunol. Methods* 232, 23–43.
- Verstovsek, S., (2009). Therapeutic potential of JAK2 inhibitors. *ASH Educ. Program Book* 2009, 636–642.
- Verstovsek, S., Machida, C., Dean, J.P., Myint, H., (2013). Pacritinib. Inhibitor of tyrosine-protein kinase JAK2, inhibitor of FLT-3, treatment of myelofibrosis. *Drugs Future* 38, 375. d
- Vodegel, R. m., Jonkman, M. f., Pas, H. h., De Jong, M. c. j. m., (2004). U-serrated immunodeposition pattern differentiates type VII collagen targeting bullous diseases from other subepidermal bullous autoimmune diseases. *Br. J. Dermatol.* 151, 112–118.
- Weisbart, R.H., Kwan, L., Golde, D.W., Gasson, J.C., (1987). Human GM-CSF primes neutrophils for enhanced oxidative metabolism in response to the major physiological chemoattractants. *Blood* 69, 18–21.
- Wentworth, P., McDunn, J.E., Wentworth, A.D., Takeuchi, C., Nieva, J., Jones, T., Bautista, C., Ruedi, J.M., Gutierrez, A., Janda, K.D., Babior, B.M., Eschenmoser, A., Lerner, R.A., (2002). Evidence for Antibody-Catalyzed Ozone Formation in Bacterial Killing and Inflammation. *Science* 298, 2195–2199.

- Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., Halbwachs-Mecarelli, L., (2000). Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects. *Lab. Invest.* 80, 617–653.
- Woodley, D.T., Briggaman, R.A., O’Keefe, E.J., Inman, A.O., Queen, L.L., Gammon, W.R., (1984). Identification of the Skin Basement-Membrane Autoantigen in Epidermolysis Bullosa Acquisita. *N. Engl. J. Med.* 310, 1007–1013.
- Woodley, D.T., Burgeson, R.E., Lunstrum, G., Bruckner-Tuderman, L., Reese, M.J., Briggaman, R.A., (1988). Epidermolysis bullosa acquisita antigen is the globular carboxyl terminus of type VII procollagen. *J. Clin. Invest.* 81, 683–687.
- Woodley, D.T., O’Keefe, E.J., McDonald, J.A., Reese, M.J., Briggaman, R.A., Gammon, W.R., (1987). Specific affinity between fibronectin and the epidermolysis bullosa acquisita antigen. *J. Clin. Invest.* 79, 1826–1830.
- Wright, H.L., Moots, R.J., Bucknall, R.C., Edwards, S.W., (2010). Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology* 49, 1618–1631.
- Wysocki, A.B., (1999). Skin anatomy, physiology, and pathophysiology. *Nurs. Clin. North Am.* 34, 777–797.
- Yamada, M., Gomez, J.C., Chugh, P.E., Lowell, C.A., Dinauer, M.C., Dittmer, D.P., Doerschuk, C.M., (2011). Interferon- γ Production by Neutrophils during Bacterial Pneumonia in Mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183, 1391–1401.
- Yamashiro, S., Kamohara, H., Wang, J.-M., Yang, D., Gong, W.-H., Yoshimura, T., (2001). Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses. *J. Leukoc. Biol.* 69, 698–704.
- Yamazaki, T., Kawai, C., Yamauchi, A., Kuribayashi, F., (2011). A highly sensitive chemiluminescence assay for superoxide detection and chronic granulomatous disease diagnosis. *Trop. Med. Health* 39, 41–45.
- Yaoita, H., Briggaman, R.A., Lawley, T.J., Provost, T.T., Katz, S.I., (1981). Epidermolysis Bullosa Acquisita: Ultrastructural and Immunological Studies. *J. Invest. Dermatol.* 76, 288–292.
- Yong, K.L., (1996). Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) increases neutrophil migration across vascular endothelium independent of an effect on adhesion: comparison with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *Br. J. Haematol.* 94, 40–47.

- Zillikens, D., Wever, S., Roth, A., Weidenthaler-Barth, B., Hashimoto, T., Bröcker, E.B., (1995). Incidence of autoimmune subepidermal blistering dermatoses in a region of central Germany. *Arch. Dermatol.* 131, 957–958.
- Zumelzu, C., Le Roux-Villet, C., Loiseau, P., Busson, M., Heller, M., Aucouturier, F., Pendaries, V., Lièvre, N., Pascal, F., Brette, M.-D., Doan, S., Charron, D., Caux, F., Laroche, L., Petit, A., Prost-Squarcioni, C., (2011). Black patients of African descent and HLA-DRB1*15:03 frequency overrepresented in epidermolysis bullosa acquisita. *J. Invest. Dermatol.* 131, 2386–2393.

7 Anhang

7.1 Voten der Ethikkommission

Die hiesige Ethikkommission bewilligte im Voraus alle hier durchgeführten Experimente, in denen menschliche Materialien verwendet wurden. Hier aufgelistet sind die Aktenzeichen mit dem dazugehörigem Datum des Genehmigungsschreibens: Nr. 04-061 (11.05.2004), 04- 144 (28.10.2004), und 05-56 (21.04.2005).

7.2 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Abbildung 1: Schematische Darstellung des Kollagen Typ VII..... | 6 |
| Abbildung 2: Blasenbildende Autoimmundermatosen mit den dazugehörigen Autoantigenen..... | 7 |
| Abbildung 3: Zielantigene der Antikörper bei Autoimmundermatosen..... | 8 |
| Abbildung 4: Klinisches Bild der EBA..... | 12 |
| Abbildung 5: Mikroskopisch vergrößerte Photographie von U-Zacken in der direkten Immunfluoreszenz..... | 14 |
| Abbildung 6 Janus kinase Inhibitoren blocken den Zytokinsignalweg..... | 19 |
| Abbildung 7: Schematische Darstellung der Pathogene der EBA. Markierungen und experimentelle Vorlagen zur Testung der Wirkung von CEP-33779..... | 22 |
| Abbildung 8: Schematische darstellung der entstandenen Zellbanden nach Zentrifugation von EDTA-Vollblut in Polymorphprep in einem 15ml Röhrchen..... | 28 |
| Abbildung 9: Pipettierschema der 96 Kammer ELISA-Platte im ROS-Assay..... | 31 |
| Abbildung.10: Schematische Darstellung der durch den Percoll Konzentrationsgradienten entstandenen Zellbanden nach Zentrifugation in einem 15ml Röhrchen..... | 33 |

| | |
|--|-----------|
| Abbildung 11: Pipettierschema und Prinzip des Migrations-Assays..... | 35 |
| Abbildung 12: Prinzip des Gefrierschnittmodells..... | 37 |
| Abbildung 13: Ein Beispiel der Quantifizierung von Apoptose und Nekrose von PMN mittels Durchflusszytometrie..... | 43 |
| Abbildung 14: JAK2 ist essentiell für die Aktivierung | 46 |
| Abbildung 15: JAK2 hemmt die Migration durch Polycarbonatmembranen..... | 47 |
| Abbildung 16: Der Einfluss des JAK2 Inhibitors CEP-33779 auf die dermo epidermale Separation..... | 49 |
| Abbildung 17: Die Auswirkung des JAK2 Inhibitors CEP-33779 auf die dermo epitheliale Spaltbildung..... | 50 |
| Abbildung 18: Der JAK2 Inhibitor CEP-33779 hemmt dosisabhängig die Elastasefreisetzung aus PMN..... | 51 |
| Abbildung 19: Die dosisabhängige Auswirkung des JAK2-Inhibitors CEP-33779 auf PMN..... | 52 |
| Abbildung 20: Der zytotoxische Effekt des JAK2-Inhibitors CEP-33779 auf PMN..... | 53 |
| Abbildung 21: Der Krankheitsverlauf ist abhängig von der Konzentration des CEP-33779..... | 67 |

8 Danksagung

Einen besonderen Dank möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Ralf Ludwig aussprechen für die Überlassung des Themas, die enge persönliche Betreuung, die vielen guten Ratschläge und die vorbildliche Unterstützung für die Durchführung dieser Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. med. D. Zillikens, dem Direktor der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Universität zu Lübeck, danke ich für die Bereitstellung des dermatologischen Forschungslabors sowie der Materialien, die für die Vorbereitung und Durchführung der Versuche in dieser Dissertation nötig waren. Mein großer Dank gilt auch meinem Betreuer Dr. rer. nat. Unni Samavedam, der mir bei Fragen stets hilfsbereit zur Seite stand und mich gut eingearbeitet hat in Hinblick auf die Experimente dieser Arbeit.

Des Weiteren möchte ich allen Labormitarbeitern des Instituts für experimentelle Dermatologie für deren Unterstützung und die allgemeine Einarbeitung in die Labortätigkeit danken, sowie für die große Bereitschaft zu Blutspenden, die für die Durchführung der Experimente nötig waren.

Insbesondere danke ich meinen Eltern, bei denen ich stets viel Verständnis und motivierende Impulse gefunden habe, für die Ermöglichung dieses Studiums und der jahrelangen Unterstützung währenddessen.

9 Lebenslauf

Persönliche Angaben: Jarno Till Scheuber

geboren am 15.10.1984 in
Bad Oldesloe,
Schleswig-Holstein



Schulabschluss: 2004 Abitur

Hochschulstudium:

10/2009 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck

09/2011 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

11/2012 - 01/2016 Experimentelle Doktorarbeit im Bereich Dermatologie und Venerologie: Die Effekte einer Inhibition der Janus Kinase 2 in *in vitro* Modellen der Epidermolysis bullosa acquisita

10/2014 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

11/2015 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Beendigung des Medizinstudiums

Praktisches Jahr:

11/2014 - 09/2015

1. Tertial des Praktischen Jahres an der Universität zu Lübeck im Fachbereich Neurologie
2. Tertial des Praktischen Jahres an der Universität zu Leipzig in der Inneren Medizin. Gastroenterologie, Kardiologie und Angiologie
3. Tertial des Praktischen Jahres am Westküstenklinikum in Heide im Bereich Chirurgie

Tätigkeit vor dem Studium

09/2005 - 02/2009

Rettungsassistentenausbildung am Bildungszentrum Schlump in Hamburg und Tätigkeit als hauptamtlicher Rettungsassistent beim DRK und der JUH in Lübeck

Aktuell:

Seit 02/2016

Assistenzarzt in der Inneren Medizin am Diakonissenkrankenhaus Flensburg