

Aus dem Lübecker Institut für experimentelle Dermatologie

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. R. Ludwig

Neue Therapieoptionen der Epidermolysis bullosa acquisita durch reduzierte Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies aus Immunkomplex-aktivierten neutrophilen Granulozyten

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

- Aus der Sektion Medizin –

vorgelegt von

Katharina Schulze Dieckhoff

aus Münster in Nordrhein-Westfalen

Lübeck, 2018

1. Berichterstatter/Berichterstatterin:

Prof. Dr. med. Ralf Ludwig

2. Berichterstatter/Berichterstatterin:

Prof. Dr. Jan Rupp

Tag der mündlichen Prüfung:

20.12.2019

Zum Druck genehmigt:

Lübeck, den 20.12.2019

Promotionskommission der Sektion Medizin

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere, dass ich die Dissertation ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel verwendet habe und dass wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht worden sind. Weder vorher noch gleichzeitig habe ich andernorts einen Zulassungsantrag gestellt oder diese Dissertation vorgelegt.

Lübeck, den

Katharina Schulze Dieckhoff

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Aufbau und Funktionen der Haut	1
1.2 Bullöse Autoimmundermatosen	4
1.3 Epidermolysis bullosa acquisita – eine blasenbildende Autoimmunerkrankung	5
1.3.1 Inzidenz und klinisches Bild	5
1.3.2 Diagnostik und Therapie	6
1.3.3 Pathophysiologie der EBA - Kollagen Typ VII als Autoantigen	8
1.4 Neutrophile Granulozyten	10
1.4.1 Funktionen neutrophiler Granulozyten	10
1.4.2 Signaltransduktionen neutrophiler Granulozyten, die zur ROS-Freisetzung und EBA führen	12
1.5 Charakteristika und Anwendungsgebiete der <i>in vivo</i> verwendeten Signaltransduktionsinhibitoren (STI)	15
1.6 Zielsetzung	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Antigene, Antikörper, Seren, Reagenzien, Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	20
2.1.1 Reagenzien	20
2.1.2 Laborgeräte, Verbrauchsmaterialien und Software	21
2.1.3 Lösung und Lagerung der Inhibitoren und Aktivatoren für die <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Versuche	23
2.2 In vitro Validierung der Inhibitoren durch den ROS-Freisetzungsversuch	26
2.2.1 Gewinnung humaner neutrophiler Granulozyten aus Vollblutspenden	27
2.2.2 Vorbereitung der 96-Well-Platte	28
2.2.3 Verdünnung der Testsubstanzen	29
2.2.4 Messung der ROS-Freisetzung aus aktivierten neutrophilen Granulozyten mit Hilfe von Luminol	30
2.2.5 Kontrolle der Neutrophilenstimulation durch Immunkomplexe	31

2.2.6	Bestimmung des Reinheitsgrades isolierter neutrophiler Granulozyten mittels FACS	31
2.3	Verfahren der Tierversuche	32
2.3.1	Verfahren zur Induktion einer lokal auftretenden EBA	33
2.3.2	Aufbau der <i>in vivo</i> Versuche	33
2.4	Histologische Methoden: Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) und Direkte Immunfluoreszenz (DIF)	35
2.5	Statistik	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Beeinflussung der ROS-Freisetzung aktivierter neutrophiler Granulozyten von Substanzen mit Einfluss auf intrazelluläre Signalwege <i>in vitro</i>	38
3.2	Untersuchung der <i>in vitro</i> wirksamen Medikamente im lokalen Modell der AK-transfer-induzierten EBA in Mäusen	46
3.2.1	Positive Effekte von GDC-0941 im lokalen Modell der EBA	47
3.2.2	Effekte von Sotrastaurin im lokalen Modell der EBA am zweiten Tag nach Injektion sichtbar	50
3.2.3	Abnahme der Ohrschwellung und histologisch geringere Entzündungszeichen bei Behandlung mit PHA-665752 im lokalen Modell der EBA . .	52
3.2.4	Geringere Symptomausprägung bei Behandlung mit NU7441 im lokalen Modell der EBA	54
3.2.5	Hemmender Effekt von Propranolol HCl auf die Symptomausprägung im lokalen Modell der EBA	56
3.2.6	Hemmender Effekt von BX-795 auf die Symptomausprägung im lokalen Modell der EBA	58
3.2.7	Kaum sichtbare Effekte von EHop-016 im lokalen Modell der EBA	60
3.2.8	Kein Effekt von MK-2206 2HCl im lokalen Modell der EBA	62
3.2.9	Geringer Effekt von IC-87114 auf die Symptomausprägung der EBA im lokalen Modell	64
3.2.10	Schwach aktivierender Effekt von Nilotinib im lokalen Modell der EBA . .	66
3.2.11	Zunahme der Ohrschwellung bei Behandlung mit PH-797804 am zweiten Tag im lokalen Modell der EBA	68
3.2.12	Geringere Syptmomausprägung bei Behandlung mit Enbrel im lokalen Modell der EBA	70
4	Diskussion	71
4.0.1	Ausblick	83
5	Zusammenfassung	85

Literaturverzeichnis	117
6 Anhang	118
6.1 Medien und Puffer	118
6.2 Anträge, Bescheinigungen, Zertifikate	118
Abbildungsverzeichnis	123
Tabellenverzeichnis	124
7 Danksagung	125
8 Lebenslauf	127
9 Publikationen	128

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
AIBD	Bullöse Autoimmunerkrankungen
AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
BP	Bulloses Pemphigiod
bspw.	beispielsweise
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
CD	Cluster of differentiation
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
COL7	Kollagen Typ VII
COPD	Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung
CXCR2	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 2
DAG	Diazylglycerol
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEJ	Dermo-epidermale Junktionszone / Grenze
DIF	Direkte Immunfluoreszenz
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
EAE	experimentelle Autoimmunencephalitis
EBA	Epidermolysis bullosa acquisita
EBD	Epidermolysis bullosa dystrophica
ER	Östrogen-Rezeptor
ERK	Extrazellulär-Signal Regulierte Kinase
etc.	et cetera
evtl.	eventuell
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting <i>fluoreszenzaktivierten Zellsortierung</i>
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
G-CSF	Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor

GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor
GDP	Guanosindiphosphat
GPR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
hCOL7	humanes Kollagen Typ VII
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
SGLT2	Sodium Dependent Glucose Transporter <i>Natrium-abhängiger Glukosetransporter</i>
HSP90	Heat-Shock-Protein 90
HWZ	Halbwertszeit
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IVIG	Intravenöse Immunglobulingabe
JAK	Janus Kinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
Kap.	Kapitel
KG	Körpergewicht
Konz.	Konzentration
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
min	Minuten
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MMP	Matrix-Metalloprotease
NADPH	Nicotinsäure-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NC1	nicht-kollagene Region 1
NET	neutrophil extracellular traps
o.ä.	oder ähnliches
PAK	p21-aktivierte Kinase
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PV	Pemphigus vulgaris
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate buffered saline
PDK	Phosphoinositid-abhängige Protein Kinase
PEG	Polyethylene Glycol
PGRP-S	Peptidoglykan erkennendens Protein

PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
Pim1	Proto-Onkogen Serin/Threonin-Protein Kinase
PKA	Protein Kinase A
PKB (AKT)	Protein Kinase B
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
p.o.	per oral
PMA	Phorbol myristate acetate
PMN	Polymorphonuclear Neutrophils
PRR	Pattern Recognition Receptor <i>Mustererkennungsrezeptoren</i>
ROR	Related Orphan Receptor
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RA	Rheumatoide Arthritis
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
STI	Signaltransduktionsinhibitoren
s.c.	subcutan
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
STAT3	Signal Transducers and Activator of Transcription 3 <i>Transkriptionsfaktoren</i>
s.u.	siehe unten
SYK	Spleen Tyrosine Kinase
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
vWFA2	von-Willebrandt-Faktor A2
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1 Einleitung

„Die Umhüllende“ oder „die Bedeckende“ aus dem Indogermanischen *(s)keu(ə)* lautete die ursprüngliche Bezeichnung für das heute verwendete Wort „Haut“¹.

Diese Umhüllung dient als Schutz vor mechanischen und chemischen Einflüssen und stellt eine Barriere gegen äußere Pathogene dar. Neben exogener Schädigung der Barriere durch bspw. Verletzungen oder Verbrennungen können auch endogene Faktoren zu Läsionen der Haut führen und damit die Integrität des Schutzmantels angreifen. Unser Immunsystem, das der Aufrechterhaltung der Gesundheit dient, richtet bei Überaktivität bzw. Toleranzverlust seine Immunantwort nicht nur gegen körperfremde Pathogene, wie Bakterien, Viren, Parasiten und Pilze, sondern auch gegen körpereigene Strukturen. Wenn vom Immunsystem Antikörper (AK) gegen körpereigene Zielstrukturen, die Autoantigene, produziert werden, spricht man von einer Autoimmunerkrankung². Richten sich die Autoantikörper (Auto-AK) gegen Strukturbestandteile der Haut, so leidet deren Unversehrtheit und es entstehen Krankheitsbilder, die unter dem Namen Autoimmundermatosen zusammengefasst werden³. Bei dieser Arbeit habe ich mich mit einer bestimmten Autoimmundermatose, der Epidermolysis bullosa acquisita (EBA), beschäftigt.

1.1 Aufbau und Funktionen der Haut

In ihrer Ursprungsbezeichnung „die Umhüllende“ oder „die Bedeckende“ sind bereits wesentliche Eigenschaften der Haut beschrieben. Als mit 2m² flächenmäßig einem der größten Organe unseres Körpers hat die Haut eine Schutzfunktion vor mechanischen und chemischen Einflüssen sowie vor äußeren Pathogenen inne⁴. Mit den drei Hauptschichten Epidermis, Dermis und Subkutis bildet die Haut die Grenze zur Umwelt (s. Abb.1.1) und wirkt neben dem Schutz nach außen auch wie eine nach innen gerichtete Diffusionsbarriere, die uns vor zu starkem Wasserverlust bewahrt. Durch die Gefäßarchitektur und Schweißdrüsen als Hautanhangsgebilde wird die Körpertemperatur reguliert. Darüber hinaus ist die Haut Sitz kleiner Sinnesorgane, welche die Wahrnehmung unterschiedlicher Reize aus der Umwelt ermöglichen. Die vielfältigen Funktionen machen die Haut zu einem für uns lebenswichtigen Organ, dessen Beschädigung in Folge von Erkrankungen, Verletzungen oder Verbrennungen lebensbedrohlich sein kann^{5;6}.

Neben der rein mechanischen Barriere bieten dem Immunsystem zugehörige Zellen, wie die Langerhanszellen, in den oberen Hautschichten Schutz vor Infektionen^{5;7}. Zusätzliche Abwehrzellen können über das Gefäßsystem in die Haut transportiert werden.

In einem dynamischen, etwa 4 Wochen dauernden Prozess werden aus epidermalen Stammzellen im Stratum basale der Epidermis Keratinozyten erschaffen, die bei ihrer Wanderung in die oberen Zellschichten einen Verhornungsprozess durchlaufen. Je nach Differenzierungsgrad und Funktion bilden die Zellen unterscheidbare Schichten, die von basal nach apikal folgendes Schichtbild der Epidermis ergeben: Das Stratum basale (sitzt direkt auf der Basalmembran, der Grenzschicht zwischen Epidermis und Dermis), darüber das Stratum spinosum (Zellzusammenhalt durch zahlreiche Desmosomen gewährleistet), darüber das Stratum granulosum und als äußerste Zone der Epidermis das Stratum corneum (Hornschicht)⁵. Die ständige Erneuerung gewährleistet die Aufrechterhaltung der vielfältigen Funktionen der Haut.

An die Basalmembran der Epidermis grenzt in der Tiefe die Dermis, mit der sie über die dermo-epidermale Junktionszone (DEJ) fest und gleichzeitig elastisch verankert ist, wodurch die Haut ihre mechanische und elastische Widerstandsfähigkeit erhält⁵. Die Dermis lässt sich in das direkt unter der Basalmembran gelegene Stratum papillare mit lockerem Bindegewebe, vielen Zellen, wie Fibroblasten und Abwehrzellen (Mastzellen und Makrophagen), und freien Nervenendigungen, die u.a. Schmerz- und Juckempfindungen vermitteln, und das Stratum reticulare, bestehend aus straffem, geflechtartigem Bindegewebe unterteilen. Im Gegensatz zur Epidermis ist die Dermis von Gefäßen durchzogen sowie Sitz von Haarfollikeln, kleinen Muskeln und verschiedenen Drüsen⁵.

Die Subkutis verbindet die oberhalb liegenden Hautschichten mit den darunter liegenden Strukturen und Organen. Durch lockeres Bindegewebe und Fettanteile fungiert sie je nach Körperregion als Druckpolster, Energiespeicher oder Wärmeisolator⁵.

Eine bereits erwähnte, für die Widerstandsfähigkeit und den Zusammenhalt der Hautschichten wichtige Komponente, ist die Basalmembran. Als DEJ bezeichnet, bildet sie die Verankerungspunkte zwischen Epidermis und Dermis. Ultrastrukturell lässt sich eine weitere Teilung der Basalmembran in Basallamina, gebildet aus Lamina lucida und Lamina densa, und Sublamina densa (Lamina fibroreticularis) erkennen^{5;8}, in denen die für die Haftkomplexe (Hemidesmosomen) unerlässlichen Strukturproteine liegen (s. Abb.1.1). Während der Zusammenhalt der Keratinozyten innerhalb der Basalmembran durch desmosomale Verbindungen gewährleistet ist, werden sie mit der Dermis über Hemidesmosomen verankert. Extrazelluläre Hemidesmosomenanteile der Keratinozyten ragen in die Lamina lucida hinein, in der weitere Ankerfibrillen und Adhäsionsmoleküle zu finden sind. Die Lamina densa sorgt mit einem geflechtartigen Netzwerk aus Kollagen Typ IV, Laminin, Fibronectin und Proteoglykanen für vielfältige Verbindungs- und Stabilisationspunkte zwischen den Ankerfibrillen und Adhäsionsmolekülen der Lamina lucida und Sublamina densa. Hauptbestandteil der Verankerungsfibrillen der zuletzt genannten Schichten ist das Kollagen Typ VII (COL7). Es verankert die Basalmembran mit den Kollagenfasern der darunterliegenden dermalen Matrix^{5;9;10}. Das Zusammenwirken

dieser Strukturproteine bildet die Grundlage für die Integrität und Stabilität der Haut und ist gleichzeitig die Zielstruktur für verschiedene autoreaktive AK. Folgen der Autoimmunreaktion können blasenbildende Autoimmundermatosen (AIBD) sein.

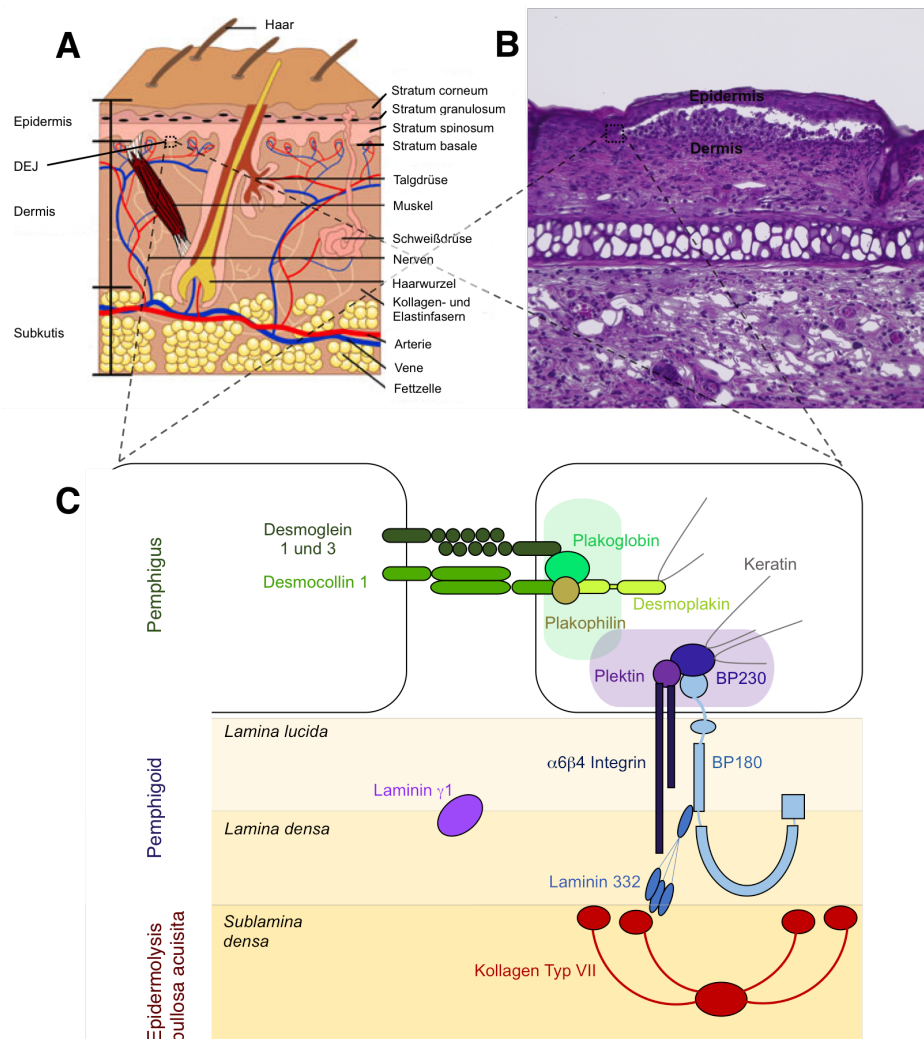


Abbildung 1.1 Schematischer Aufbau der Haut (Querschnitt) und ihrer Strukturproteine - Zielantigene bullöser Autoimmundermatosen (Ref.^{11;12}, modifiziert)

A) Dreischichtung der Haut in Epidermis, Dermis und Subkutis. **Epidermis** mit Untergliederung in Stratum corneum, Stratum granulosum, Stratum spinosum und Stratum basale. **Dermis** mit dem Stratum papillare mit eigenen Kapillarschlingen und freien Nervenendigungen und dem Stratum reticulare mit dicken Kollagenfasern und elastischen Fasern. Die **Subkutis** besteht zu großen Teilen aus Fettgewebe. **B)** Die histologische Abbildung, mit Darstellung pathologischer Blasenbildung, zeigt Epidermis und Dermis mit dazwischen liegender Basalmembran/DEJ. **C)** Die epithelialen Keratinozyten sind über **desmosomale** Cadherine (Desmoglein 1 und 3 und Desmocollin 1) und Plaque-Proteine (Plakoglobin, Desmoplakin, Plakophilin) miteinander verbunden. Diese Haftproteine sind Zielantigene bei Pemphiguserkrankungen. **Hemidesmosomen** bilden in der DEJ als Zell-Matrix-Kontakte die Verankerungspunkte zwischen den basalen Keratinozyten der Epidermis (BP230, Plektin) und den Verankerungsfibrillen der papillären Dermis. Das transmembranöse BP180 und $\alpha 6 \beta 4$ -Integrin interagiert mit Laminin 332, welches wiederum mit COL7 in Verbindung steht. Werden Auto-AK gegen die hemidesmosomalen Bestandteile gerichtet, wird von pemphigoiden Erkrankungen gesprochen, zu denen auch die EBA zählt¹³.

1.2 Bullöse Autoimmundermatosen

Blasenbildende, auch bullös genannte Autoimmundermatosen stellen eine Gruppe zwar seltener, jedoch schwerwiegender, chronischer, schwierig zu behandelnder Autoimmunerkrankungen der Haut dar. Gekennzeichnet sind sie durch gewebsgebundene Auto-AK gegen Strukturproteine der Haut. Die Bindung der Auto-AK an entsprechende Antigene führt zu Veränderungen bzw. Verlusten der Funktionalität⁹. Der Zell-Zell-Kontakt zwischen Keratinozyten bzw. die Adhäsion von Epidermis und Dermis^{13;14} ist nicht mehr gewährleistet, sodass Blasenbildung und schwerwiegende Schädigungen der Haut und/oder Schleimhaut die Folgen sind^{15–17}.

Anhand der Zielstrukturen, gegen die sich die Auto-AK richten, lassen sich zwei große Untergruppen voneinander unterscheiden (s. Abb. 1.2 und 1.1). Bei den Pemphiguserkrankungen richten sich die AK gegen desmosomale Proteine. Die Immunkomplexbindung führt zum Kontaktverlust zwischen den epithelialen Keratinozyten, woraus intraepithelial gelegene Blasen resultieren. Pemphigus vulgaris (PV) (Auto-AK gegen Desmoglein 1 und 3), Pemphigus foliaceus (Auto-AK gegen Desmoglein 1) und das IgA-Pemphigus (Auto-AK gegen Desmocollin 1 und Desmoglein 3) gehören zu dieser Gruppe. Auf der anderen Seite stehen die Pemphigoiderkrankungen, bei denen sich die AK gegen hemidesmosomale Bestandteile oder deren Ankerfibrillen richten und damit die Verankerung von Epidermis und Dermis an der DEJ auflösen. Die Ausbildung subepidermaler Blasen ist in diesen Fällen die Konsequenz^{9;13;17}. In der Gruppe der subepidermalen Autoimmundermatosen finden sich das bullöse Pemphigoid (BP) (Auto-AK gegen BP180, BP230) und das Schleimhautpemphigoid (Auto-AK gegen BP180, BP230, $\alpha 6\beta 4$ Integrin, Laminin5) mit Auto-AK gegen hemidesmosomale Proteine sowie EBA mit Auto-AK gegen COL7 wieder.

Erkrankung	Zielantigene
Pemphigus	
Pemphigus vulgaris	Desmoglein 1, Desmoglein 3
Pemphigus foliaceus	Desmoglein 1
IgA-Pemphigus	Desmocollin 1, Desmoglein 3
Pemphigoide	
Bullöses Pemphigoid	BP180, BP230
Pemphigoid gestationis	BP180, BP231
lineare IgA-Dermatose	LAD-1, (BP180)
Schleimhautpemphigoid	BP180, BP230, Laminin 5, $\alpha 6\beta 4$ -Integrin
Lichen planus pemphigoid	BP180, BP230
Anti-Laminin γ 1/p200 Pemphigoid	Laminin γ 1
Epidermolysis bullosa acquisita	COL7

Abbildung 1.2 Klassifikation bullöser Autoimmunerkrankungen (Ref. ^{9;13} modifiziert)

Dargestellt sind bullöse Autoimmundermatosen, die anhand der Zielantigene in zwei Hauptgruppen unterteilt werden. Je nach Lage des Antigens in der Haut kommt es zu intraepidermaler (Pemphigus-Erkrankungen) oder zu subepidermaler Spaltbildung (Pemphigoid-Erkrankungen) (s. auch 1.1).

Im Folgenden soll das Augenmerk auf die Autoimmundermatose EBA gerichtet werden.

1.3 Epidermolysis bullosa acquisita – eine blasenbildende Autoimmunerkrankung

Vor mehr als 100 Jahren beschrieb Elliot erstmals Fälle von blasenbildenden Erkrankungen der Haut mit Beginn im Erwachsenenalter, die sich in ihren Symptomen der bereits im Kindesalter auftretenden Epidermolysis bullosa dystrophica (EBD) ähnelten¹⁸. Während bei der EBD ein genetischer Defekt des COL7 vorliegt, konnte EBA als eine Autoimmunerkrankung identifiziert werden, bei der COL7 das Autoantigen darstellt¹⁹. COL7 bildet den Hauptanteil der Verankerungsfibrillen zwischen der Lamina densa, Sublamina densa und dem Kollagen der dermalen Matrix^{19–21} (s. Abb. 1.1). Bei einem Funktionsverlust des COL7 wird die Verankerung gelöst und es bilden sich subepidermale Blasen.

1.3.1 Inzidenz und klinisches Bild

Mit lediglich etwa 0,2 bis 0,5 Neuerkrankungen auf eine Million Menschen pro Jahr, und damit zehnmals seltener vorkommend als das BP, ist die EBA eine sehr seltene Autoimmunerkrankung^{15;16;22–24}. In der Regel manifestiert sich die Erkrankung in einem mittleren Alter von 47 Jahren^{23;25–27}, jedoch sind in Ausnahmefällen auch Kinder betroffen^{27–30}.

In Assoziation mit EBA steht der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC), speziell das humane Leukzyten-Antigen (HLA) DR2³¹. Vor allem bei dunkelhäutigen Menschen afrikanischen Ursprungs, die das HLA-DRB1*15:03 Allel tragen, scheint das Risiko an EBA zu erkranken erhöht³² und das Manifestationsalter ist geringer^{23;25;27;32}.

Klinisch eröffnet sich bei EBA-Patienten ein sehr heterogenes Erkrankungsbild. Phänotypisch lassen sich jedoch zwei Gruppen unterscheiden: die nicht-entzündliche und die entzündliche EBA. Einige Patienten vereinen Merkmale beider Formen als Mischtyp in sich^{21;23}. Die klassische mechanobullöse, auch nicht-entzündliche EBA wurde erstmals von Roenigk 1971 definiert³³ und geht mit extrem anfälliger Haut und Blasenbildung bevorzugt an den Streckseiten der Extremitäten bzw. an exponierten, mechanisch beanspruchten Stellen, wie den Ellbogen, Knien, Hand- und Fußrücken sowie den Zehen einher. Repetitive kleine Traumata bedingen die Entstehung subepidermaler, praller, flüssigkeitsgefüllter oder hämorrhagischer Blasen, deren Aufplatzen Hautläsionen in Form von Entzündungen und Verkrustungen hervorrufen. Sie können unter Narben- und Milienbildung abheilen^{21;23;33}.

Anders als bei der inflammatorischen Form ist bei der klassischen Form häufiger eine Schleimhautbeteiligung des Rachenraums und Ösophagus zu beobachten, was mit Komplikationen wie einer Ösophagusstenose einhergehen kann^{15;16;34}. Auch die Schleimhautepithelien von Lippen, Wange, Zunge, Vagina und Analkanal können von Blasenbildung betroffen sein³⁵. Das Auftreten von Nageldystrophien und Haarverlust ist bei beiden Formen bekannt. Eine zusätzliche Beteiligung des Auges bzw. der Kornea, im schlimmsten Falle mit darauf folgender

Erblindung, ist selten und nur bei schweren Formen der Erkrankung zu verzeichnen^{36;37}.

In etwa 66% der Fälle liegt die inflammatorische Form der EBA vor, die sich in ihren Symptomen anderen bullösen Autoimmundermatosen, wie dem BP, der linearen IgA-Dermatose oder dem Schleimhautpemphigoid ähnelt. Bei diesen Patienten sind die Blasen typischerweise über den gesamten Körper, stamm- und extremitätenbetont verteilt^{23;25;27;32} und heilen meist ohne das Zurückbleiben von Narben ab.

Als eine Erkrankung des Autoimmunsystems geht die EBA aufgrund einer möglichen Synthese überlappender Auto-AK mit anderen autoimmun bedingten Krankheiten einher^{38;39}. Der Systemische Lupus Erythematoses (SLE) beispielsweise geht in seinem Verlauf vermehrt mit bullösen Hauterscheinungen einher, die wie bei EBA durch IgG-Auto-AK gegen COL7 ausgelöst werden. Daneben wurde über eine Häufung SLE-verwandter AK in Seren von EBA Patienten berichtet^{36;38–45}. Eine Assoziation von EBA mit entzündlichen Darmerkrankungen wurde in der Literatur ebenfalls dokumentiert, was durch den Nachweis von COL7 im Colon⁴⁶ und durch erhöhte Auto-AK gegen COL7 in Seren von Morbus Crohn-⁴⁷ und Colitis ulcerosa-Patienten^{33;48} erklärt werden kann.

Eine rein klinische eindeutige Unterscheidung zwischen EBA und anderen autoimmun-assoziierten bullösen Hauterkrankungen ist nicht möglich. Allerdings macht die direkte Immunfluoreszenz (DIF) die Differenzierung der Auto-AK in ihrer Gruppenzugehörigkeit möglich. Beim bullösen SLE oder bei entzündlichen Darmerkrankungen werden vor allem Auto-AK der IgG2- und IgG3-Untergruppe produziert, wohingegen bei der EBA IgG1- und IgG4-AK gebildet werden^{49;50}.

1.3.2 Diagnostik und Therapie

Als diagnostisches Instrument der EBA und anderer bullöser Autoimmundermatosen wird die DIF verwendet, mit deren Hilfe die an die Strukturproteine gebundenen AK sichtbar gemacht werden können. Als Kriterium der EBA gilt die lineare Ablagerung von IgG-AK an der DEJ^{51;52}. In einigen Fällen lagern sich auch Komplementkomponenten oder IgA ab^{21;23;53;54}. Im Gegensatz zu anderen bullösen Autoimmundermatosen, bei denen sich in der DIF das Bild einer n-Verzahnung ergibt, binden die Immunglobuline bei EBA in Form einer u-Verzahnung, was sich durch die in der Sublamina densa gelegenen Autoantigene erklären lässt²⁷. Neben den gebundenen können auch im Serum zirkulierende AK mittels ELISA detektiert werden²³. Histopathologische Analysen geschädigter Hautstellen zeigen oft subepidermale Blasenbildung, jedoch lassen sich keine pathognomonischen Parameter für die EBA festlegen. Dafür können in der Immunelektronenmikroskopie EBA-spezifische Immunzellendepots unter der Lamina densa im Bereich der Ankerfibrillen detektiert werden²³.

Die Therapie der EBA konzentriert sich v.a. auf allgemein wirksame Immunsuppressiva, die mit anderen, z.T. spezifischer wirksamen Therapieoptionen kombiniert werden können (s.u.).

Die Effizienz der Therapie ist bestimmt durch den Phänotyp und den klinischen Schweregrad der Erkrankung. Neben allgemein supportiven Maßnahmen zur Wundversorgung, der Vermeidung von Traumata und der Verwendung von Sonnencreme, um der Verschlechterung oder dem Neuauftreten von Hautläsionen bei längerer Sonnenexposition vorzubeugen, sind keine speziellen Therapieleitlinien zur EBA herausgegeben worden^{16;23}. Wie auch andere Autoimmunerkrankungen kann EBA mit hochdosierten Glukokortikoiden behandelt werden^{15;16;55}. Um Langzeitnebenwirkungen, wie Infektionen, dem Cushing-Syndrom, Diabetes mellitus, Hypertension und Osteoporose vorzubeugen, wird die Therapie meist mit anderen Immunsuppressiva wie Ciclosporin A, Azathioprin, Mycophenolat Mofetil, Methotrexat, Cyclophosphamid oder Rituximab kombiniert^{56–58}. Als Erstlinientherapie wird heute Colchicin als Monotherapie in hoher Dosis eingesetzt, da es mit geringeren Nebenwirkungen (Diarrhoen) als die Gabe von Steroiden einhergeht^{16;23}.

Eine weitere Option, vor allem bei therapieresistenten Patienten, bietet die intravenöse Gabe von Immunglobulinen (IVIG), welche die zirkulierenden Auto-AK neutralisieren^{59 60}. Nachteil dieser Therapie ist der kurze Therapieeffekt, der immer wiederkehrende Behandlungszyklen nach sich zieht¹⁵. Rituximab erweist sich ebenfalls als hilfreiche und steroideinsparende Therapieoption^{57;58}. Es ist gegen das auf B-Zellen exprimierte CD20-Oberflächenmolekül (Cluster of differentiation) gerichtet und reduziert auf diese Weise zirkulierende B-Zellen, was letztendlich zu verminderter AK-Produktion führt. Außerdem können die Auto-AK mit Hilfe von Plasmapherese oder Immunadsorption aus dem Blut entfernt werden⁶¹. Obwohl zu dieser Behandlungsmethode derzeit nur wenige Fallberichte zur Verfügung stehen, könnte es sich um eine vielversprechende Anwendung gerade bei therapieresistenten Patienten handeln.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unterschiedliche Therapieansätze zur Behandlung der EBA existieren. Es handelt sich dabei allerdings um keine speziell auf die EBA zugeschnittenen Algorithmen, sodass nicht immer zufriedenstellende Behandlungsergebnisse erzielt werden können. Um neue, spezifischere therapeutische Zielstrukturen identifizieren zu können, sollte die Aufklärung des Pathomechanismus der EBA weiter vorangetrieben werden. Das Wissen über die Bindungsdomänen der Auto-AK am COL7 kann beispielsweise die Entwicklung einer Therapie mit rekombinanten COL7 Fragmenten fördern, welche die Bindung zirkulierender Auto-AK bereits vor deren Bindung an der DEJ bewirken¹⁶. Weitere Annäherung an neue Therapieziele besteht in der genaueren Aufklärung der extra- und intrazellulären Signaltransduktionswege der neutrophilen Granulozyten, die zur Freisetzung von ROS und Matrix-Metalloproteasen (MMP) führen. Wirkstoffe, welche die gezielte Aktivierung von Kinasen und Rezeptoren in diesen Signalkaskaden unterdrücken, könnten möglicherweise die Entstehung von Blasen verhindern.

1.3.3 Pathophysiologie der EBA - Kollagen Typ VII als Autoantigen

Warum es überhaupt bei einigen Menschen zu einem Zusammenbruch oder zumindest zu einer Störung der Immuntoleranz und damit zur Produktion von Auto-AK kommt, oder was genau der Auslöser der Entstehung von Autoimmunerkrankungen ist, ist bisher noch nicht vollständig verstanden^{62;63}. Grundsätzlich ist die Balance zwischen regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) und autoreaktiven T-Zellen bei der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz bedeutsam⁶⁴ (s. Abb. 1.4). Kommt es beispielsweise durch Mutationen oder Infektionen getriggert zu einer Verschiebung dieses Gleichgewichts hin zu den autoreaktiven T-Zellen, können Autoimmunerkrankungen entstehen⁶⁴.

In der initialen Phase der EBA kommt es zum Toleranzverlust gegenüber COL7. Das HLA-DR2 der MHC Klasse-II, welches für die Antigenpräsentation des extrazellulär gelegenen Kollagens auf der Zelloberfläche zuständig ist, ist bei EBA-Patienten gehäuft präsent³¹. Autoreaktive CD4 T-Zellen erkennen das präsentierte Antigen und verhelfen anschließend den B-Zellen zur Auto-AK-Synthese^{62;65-67} (s. Abb. 1.4).

Unverzichtbarer Bestandteil der EBA ist neben den frei zirkulierenden oder gewebegebundenen AK das Autoantigen COL7. Die Geninformation für das 290 kDa große Protein liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 3. Es besteht aus drei α -Ketten, die sich jeweils aus einer zentralen 145 kDa schweren kollagenen Domäne, einer angrenzenden 145 kDa schweren amino-terminalen nicht-kollagenen (NC1) Domäne und einer angrenzenden 34 kDa schweren carboxy-terminalen nicht-kollagenen (NC2) Domäne zusammensetzen^{54;68-70} (s. Abb. 1.3). Studien mit EBA-Patientenseren zeigten, dass die Auto-AK in den meisten Fällen an Epitope im Bereich der NC1 Domäne binden^{54;72}. Nur selten wurden Berichte von Patienten mit AK gegen die kollagene⁷³ oder die NC2 Domäne⁷⁴ veröffentlicht.

Sobald die AK das COL7 in der DEJ erreicht haben, binden sie daran und aktivieren sowohl über den klassischen Weg (direkte Immunkomplexbindung an C1q⁷⁵) als auch über den alternativen Weg⁷⁶ das Komplementsystem^{63;66;77;78}. Die Spaltung der Komplementfaktoren C3 und C5 führt zur Freisetzung von C3a und C5a, welche wiederum eine wesentliche Rolle bei der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten inne haben^{76;79}. Die bedeutende Rolle der Komplementaktivierung und -wirkung konnte anhand C5-defizienter Mäuse gezeigt werden, die vollständig vor Blasenbildung bei induzierter EBA geschützt waren⁸⁰. Auch ein Mangel des für den alternativen Weg bedeutsamen Faktors B führte zu geringerer Krankheitsaktivität⁷⁶.

Neben der Rekrutierung durch das Komplementsystem werden Neutrophile über proinflammatorisch und chemotaktisch wirksame Zytokine, wie GM-CSF, CXCL1/2, IL1 α/β und TNF α ⁸¹⁻⁸⁴, zur verstärkten Migration in die Haut bewegt. Über Oberflächenmoleküle wie β 2-Integrin⁸⁵ oder Bindung ihres Fc γ -Rezeptors an den Fc-Teil der immobilisierten IgG Auto-AK^{86;87} werden die neutrophilen Granulozyten aktiviert, wobei unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden in Gang gesetzt werden. Die Bedeutung des Fc γ -Rezeptors zeigte sich in Tierversuchen, bei denen der Verlust des Rezeptors bei mit COL7 immunisierten Mäusen zu einem Schutz vor

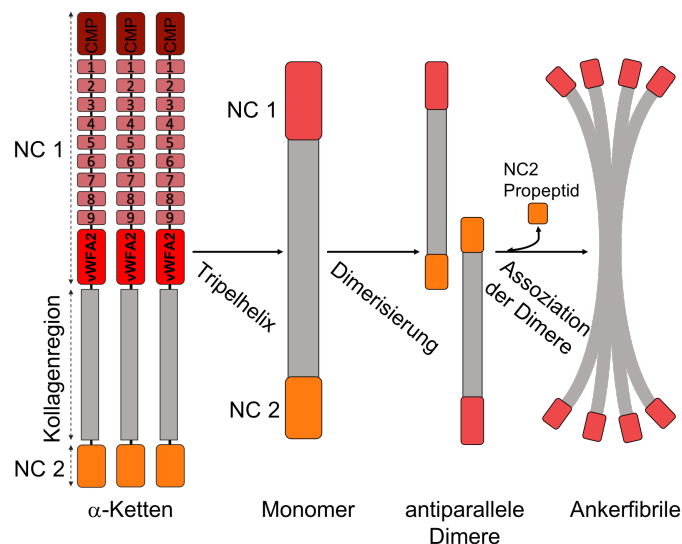


Abbildung 1.3 Aufbau von COL7 und der COL7-Ankerfibrillen (Ref. ^{23;71} modifiziert)

Eine einzelne COL7 α -Kette besteht aus einer zentralen Kollagenregion, die von einer nicht-kollagenen-(NC)1-Domäne über eine von-Willebrandt-Faktor-A2(vWFA2)-Domäne am Amino-Ende und einer NC2-Domäne am Carboxyl-Ende flankiert wird. Drei identische Ketten lagern sich zu einem helikalen Monomer zusammen. Disulfidbrückenbindungen an sich überlappenden Carboxyl-Enden führen zur Bildung von antiparallelen Dimeren, die sich wiederum zu COL7-Ankerfibrillen zusammenlagern.

Erkrankungssymptomen führte^{86;87}. Auch die Unterdrückung von $\text{TNF}\alpha$ führte *in vivo* zu einem Schutz vor Hautläsionen^{88;89}. Folge der Neutrophilenaktivierung ist neben der Freisetzung von MMP auch die Auslösung des sogenannten „respiratory burst“^{60;85;90;91} (s. Abb. 1.4).

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die den respiratory burst ausmachen, sind ausschlaggebend an der Krankheits- bzw. Symptomentstehung der EBA, der Spaltung der Epidermis von der Dermis, beteiligt. Die Neutrophilen, die ROS freisetzen und die Mehrzahl der in die Hautschichten infiltrierten Leukozyten darstellen, gelten daher auch als Haupteffektorzellen der EBA^{79;92}.

Neben den Neutrophilen werden auch andere Zellen, wie Keratinozyten, Makrophagen oder Mastzellen aktiviert^{62;78;89;93}, die über Zytokinfreisetzung⁹⁴ die Entzündungsreaktion aufrechterhalten. T-Zellen scheinen ebenfalls z.T. in der Effektorphase an der Krankheitsausprägung beteiligt zu sein⁹⁵. Sie aktivieren über Zytokine B-Zellen, die dann zur Produktion der Auto-AK beitragen^{62;63;66}.

Das Flightlessprotein I (Flii) wurde kürzlich als potenzielle neue Zielstruktur zur Behandlung der EBA identifiziert. Bei *in vivo* Versuchen mit Mäusen wurde bei starker Expression des Proteins, das an der Wundheilung beteiligt ist, ein klinisch schwererer Phänotyp der EBA ausgebildet. Die pharmakologische Blockade von Flii resultierte in einem weniger stark ausgeprägten Krankheitsbild^{96–98}.

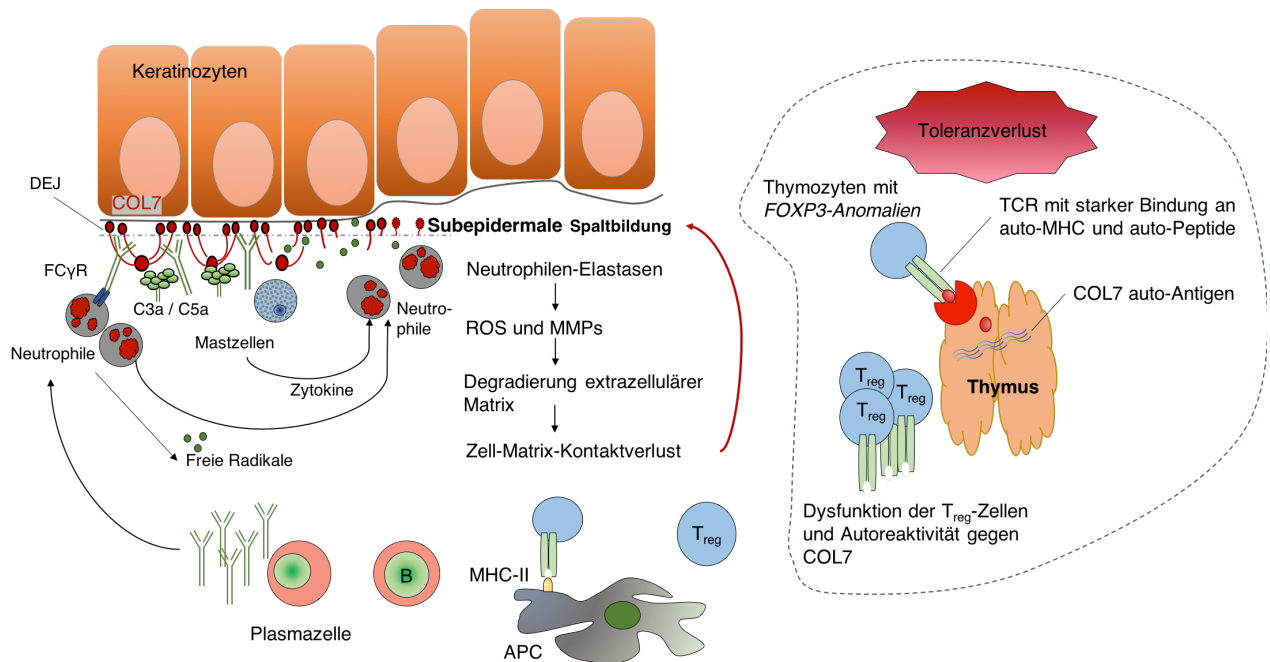


Abbildung 1.4 Schematische Darstellung pathologischer Mechanismen bei EBA (Ref. ⁶³, modifiziert) Toleranzverlust im Thymus gegen COL7 führt zur Genese autoreaktiver T-Zellen, die B-Zellen zur Auto-AK-Synthese verhelfen. Die Auto-AK binden an der DEJ an COL7 und aktivieren neutrophile Granulozyten über den Fc γ -Rezeptor. Das Komplementsystem wird aktiviert, weitere Immunzellen wie Mastzellen setzen Zytokine frei, die wiederum zu verstärkter Neutrophilenaktivierung führen. Freie Radikale degradieren extrazelluläre Matrix, sodass es zum Kontaktverlust zwischen Dermis und Epidermis mit der Folge von subepidermaler Blasenbildung kommt. TCR, T-Zell-Rezeptor; B, B-Zelle; APC, Antigenpräsentierende Zellen.

1.4 Neutrophile Granulozyten

1.4.1 Funktionen neutrophiler Granulozyten

Die neutrophilen Granulozyten, auch polymorphkernige Leukozyten (PMN), sind dem zellulären, angeborenen Immunsystem zugehörig⁹⁹. Sie sind während der frühen Abwehrphase wesentlich an der Erkennung, Abtötung und Elimination körperfremder Mikroorganismen beteiligt. Im Knochenmark, dem wichtigsten hämatopoetischen Organ, reifen die neutrophilen Granulozyten aus der Reihe der Leukozyten heran und unterscheiden sich durch ihre Färbeeigenschaften und Kernmorphologien von anderen Leukozyten⁹⁹. Die Granulozyten selbst lassen sich wiederum anhand ihres stab- oder segmentförmigen Kerns und anhand ihrer unterschiedlich gefärbten Granula klassifizieren^{100;101}. Den größten Teil ihrer Lebenslaufzeit verbringen die Granulozyten während der Ausreifung im Knochenmark. Die reifen Zellen werden in die Blutbahn geschwemmt, wo sie mit einer Lebenshalbwertszeit von 10-12 Stunden, bei Migration in entsprechendes Gewebe von 1-2 Tagen, verbleiben¹⁰⁰. In einem dynamischen Prozess werden täglich etwa 120 Mrd., etwa 1-2%¹⁰² aller Neutrophilen, in das Gefäßsystem eingeschwemmt und herausgefiltert. Der Großteil der reifen Neutrophilen verbleibt als Reser-

ve im Knochenmark⁹⁹.

Bei Entzündungsprozessen kommt es zu einem massiven Anstieg zirkulierender neutrophiler Granulozyten. Dabei kommt dem Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF), der die Granulopoese bzw. die Menge an peripher zirkulierenden Neutrophilen bis auf das 10fache steigern kann^{103;104}, eine essentielle Bedeutung zu. Außerdem werden pro-inflammatorische Zytokine, wie der Tumornekrosefaktor (TNF) und Interferon (IFN), sowie Chemokine, wie IL-8 oder IL-1 β , aktivierte Komponenten des Komplementsystems (C5a), Leukotriene (LTB₄) oder bakterielle Peptide (fMLP) frei, welche zum Recruitment der Neutrophilen beitragen und sie an den Ort des Entzündungsprozesses leiten^{102;105–107}. Die Transmigration aus dem Gefäßsystem in das umliegende Gewebe, auch Diapedese genannt, wird durch Oberflächenantigene der Neutrophilen über IL-1 stimulierte Adhäsion an das Endothel der Gefäße ermöglicht¹⁰⁸. Von Bedeutung bei diesem sogenannten Rolling- und anschließenden Migrationsprozess sind durch Zytokine aktivierte Endothelzellen, die auf ihrer Oberfläche P- und E-Selektine¹⁰⁹ sowie die Adhäsionsmoleküle ICAM1 und ELAM1¹¹⁰ exprimieren. Zudem sind die auf der Granulozytenoberfläche exprimierten Glykoproteine der CD18/CD11 Familie, L-Selektine und β 2-Integrine an der Diapedese beteiligt^{101;111}. Untersuchungen zeigten, dass AK gegen CD18 die Migration verhindern,⁸⁵ nicht jedoch AK gegen LECAM1, was auf eine stärkere Bedeutung von LECAM1 bei der reinen Adhäsion an das Endothel und auf eine stärkere Bedeutung von CD18 bei der Diapedese hindeutet¹⁰⁸.

Treffen neutrophile Granulozyten nach der Migration im Gewebe auf (immobilisierte) Immunkomplexe, binden sie mit ihrem Oberflächenrezeptor Fc γ den Fc-Teil des im Immunkomplex fixierten AK. Darüber werden unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden der Neutrophilen aktiviert, die zu Immunantworten führen, welche der Abtötung und Elimination von Pathogenen dienen. Neben den Fc γ -Rezeptoren werden auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten auch sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (PRR (Pattern Recognition Receptor)), einschließlich der Familie der Toll-like Rezeptoren (TLR), exprimiert, welche das Erkennen von Pathogenen oder geschädigtem Gewebe anhand charakteristischer Muster ermöglichen.

Die Bindung und Aktivierung der Rezeptoren ruft in den Neutrophilen unterschiedliche Effektorfunktionen hervor. Dazu zählt u.a. die Generierung extrazellulärer Fasernetzwerke (NETs: neutrophil extracellular traps)¹¹². Bestehend aus DNA und Histonen, ausgestattet mit Granulaproteinen, wie Myeloperoxidase, neutrophiler Elastase, MMP9 oder Peptidoglykan erkennenden Proteinen (PGRP-S), besitzen sie die Fähigkeit Fremdkörper zu erkennen, zu binden und zu vernichten¹¹². Eine gesteigerte NET-Bildung kann bei Infektionen, aber auch bei Autoimmunerkrankungen wie Psoriasis, Vaskulitiden, Antiphospholipid-Syndrom, rheumatoider Arthritis (RA) und SLE beobachtet werden¹¹³. Sie könnten als Ziel zur Erforschung neuer Biomarker und Therapiemöglichkeiten von Autoimmunerkrankungen wie EBA ebenfalls in den Fokus rücken¹¹³.

Eine substanzielle Bedeutung kommt im Prozess der Neutrophilenaktivierung außerdem der Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat- (NADPH) Oxidase zu, welche für die Synthe-

se von Superoxidanionen (O_2^-), als Vorstufe anderer ROS verantwortlich ist^{105;114}. Die Myeloperoxidase katalysiert die Reaktion von Wasserstoffperoxid mit Chloridionen zu Hypochlorit-Ionen (ClO^-), welche wiederum zur Oxidation verschiedener Biomoleküle beitragen, sodass apoptotisches Material für Phagozyten erkenntlich gemacht wird¹¹⁵.

Neben der Zerstörung fremder Organismen und apoptotischen Materials kommt der NADPH-Oxidase und ihrer Generierung von ROS eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Gewebeschädigungen des eigenen Körpers zu, wie es bei EBA und anderen Autoimmunerkrankungen der Fall ist⁸⁵.

1.4.2 Signaltransduktionen neutrophiler Granulozyten, die zur ROS-Freisetzung und EBA führen

Die Phosphorylierung von Proteinen spielt im metabolischen Regulationsmechanismus eine wichtige Rolle¹¹⁶. So wird auch bei der Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch Bindung von Faktoren an unterschiedliche Rezeptoren die Phosphorylierung verschiedener Proteine ausgelöst, was wiederum zur Aktivierung einer Reihe unterschiedlicher Signalkaskaden mit unterschiedlichen Effektorfunktionen führt.

Bei der EBA spielt neben einer verstärkten Neutrophilenfreisetzung vor allem deren Aktivierung und der damit einhergehende „respiratory burst“ bei der Destruktion der Hautintegrität eine bedeutende Rolle. Dabei können unterschiedliche Reize und Rezeptoren die Signalkaskaden stimulieren, die letztendlich, getriggert durch die aktivierte NADPH-Oxidase, zur ROS-Freisetzung führen.

Bei Immunkomplexbindung an den $\text{Fc}\gamma$ -Rezeptor werden beispielsweise der Src-Familie zugehörige Tyrosinkinasen, wie Hck, Fgr und Lyn^{23;118} phosphoryliert, welche wiederum die PI3K β (Phosphoinositid-3-Kinase), p38 MAPK (Mitogen-aktivierte Protein Kinase), AKT und ROR α (Related Orphan Receptor) stimulieren^{55;119;120}. Letztendlich wird so durch Immunkomplexbindung an den $\text{Fc}\gamma$ -Rezeptor die Freisetzung von MMPs und ROS bewirkt^{60;85;91}. In Kooperation mit dem C3-Rezeptor aktiviert der $\text{Fc}\gamma$ -Rezeptor auf der einen Seite den für die Phagozytose notwendigen Signalweg der Aktinpolymerisation und auf der anderen Seite die NADPH-Oxidase, wodurch ROS freigesetzt wird¹²¹.

Die Beteiligung der Src-Tyrosinkinasen an der ROS-Freisetzung konnte an mutierten Mausstämmen, Hck^{-/-}, Fgr^{-/-} und Lyn^{-/-}, gezeigt werden, die bei AK-Injektion im systemischen Modell der EBA vollständig vor der Erkrankung geschützt waren¹¹⁸. Die Phosphorylierung der Src-Kinasen führt zur Aktivierung der nachgeschalteten SYK (Spleen Tyrosin Kinase)^{122;123}, bei deren Blockade bzw. Fehlen die ROS-Freisetzung deutlich reduziert wurde¹¹⁷.

Sobald die Neutrophilen aktiviert werden, wird die PI3K aus dem Plasma in die Zellmembran

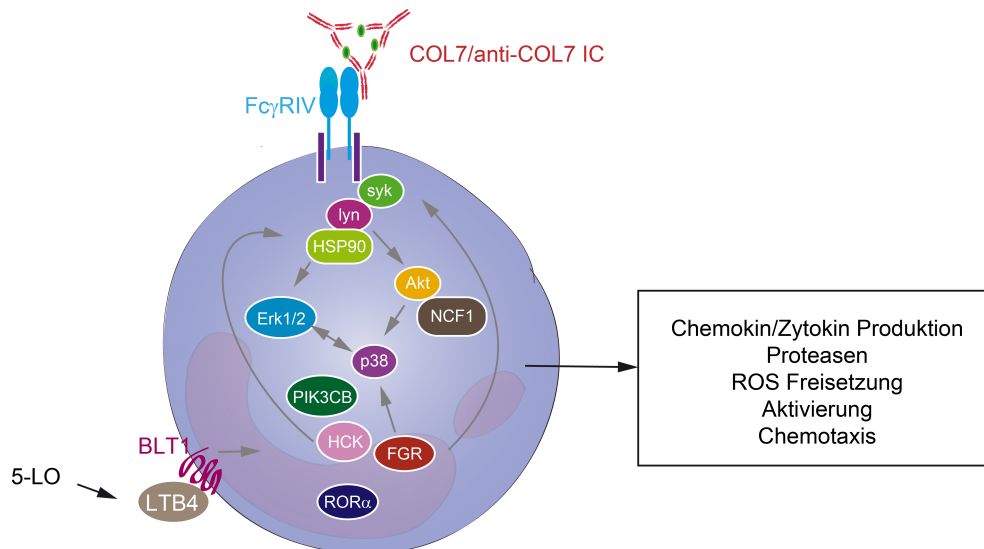


Abbildung 1.5 Beispielhafte Signalkaskade zur Freisetzung von ROS aus aktivierten neutrophilen Granulozyten (Ref.⁶⁰ modifiziert nach¹⁰⁷)

Die in die Haut migrierten Neutrophilen binden über Fc γ -Rezeptoren an die gewebegebundenen COL7-anti-COL7-Immunkomplexe. Durch die Rezeptorbindung werden Signaltransduktionswege getriggert, in die Kinasen der Src-Familie, SYK, ERK, AKT und p38 MAPK involviert sind^{60;117}. Neben der Aktivierung über den Fc γ -Rezeptor wurde kürzlich die Bedeutung von LTB₄ und seinem Rezeptor BLT1 bei der Rekrutierung und Migration der Neutrophilen in durch Auto-AK entzündetes Gewebe erkannt¹⁰⁷. Die Aktivierung der Signalkaskaden führt letztendlich zur Freisetzung von Mediatoren wie den ROS, die in der Pathogenese der EBA eine essentielle Rolle spielen. Außerdem werden Chemokine, Zytokine und Proteasen synthetisiert und freigesetzt, die zur Verstärkung der (Selbst-)Aktivierung und Rekrutierung der Neutrophilen beitragen.

transloziert. Es kommt zur Aktivierung einer Signalkaskade, welche über Phosphorylierung weiter abwärts liegende Effektoren, wie die Protein Kinase B (PKB), auch bekannt als AKT, aktiviert^{124;125}. Diese führt auf einem Ras-Raf-unabhängigen Weg zur Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Kinasen ERK1 und ERK2¹²⁶. Die pharmakologische Blockade der Phosphorylierung von PKC (Protein Kinase C), PI3K, AKT, p38 MAPK oder ERK1/2 *in vitro* verringerte die ROS-Freisetzung aktivierter neutrophiler Granulozyten^{23;127}. Die Inhibition von p38 MAPK oder ERK1/2 führte *in vivo* zu verringerter dermo-epidermaler Blasenbildung²³.

Der Tumornekrosefaktor α (TNF α) spielt bei der Aktivierung neutrophiler Granulozyten und deren Freisetzung von ROS ebenfalls eine Rolle. Über die Aktivierung von Serin/Threonin Protein Kinasen werden über MEKK und MEK1 verschiedene ERKs (Extrazellulär-Signal Regulierte Kinase) innerhalb des MAPK-Signalweges aktiviert¹²⁸. TNF α kann auch durch MAPK unabhängige Signalwege über die PI3K zur Zellaktivierung und ROS-Freisetzung führen¹²⁷.

Ein weiterer Signalweg umfasst die Phosphorylierung der Phospholipase C γ (PLC), welche einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und die Produktion von Diacylglycerol (DAG) zur Folge hat. DAG stimuliert die PKC, deren Inhibition zu einer verringerten Freisetzung von Superoxidanionen führt, was ihre Bedeutung in der Generierung des „respiratory burst“ verdeutlicht^{122;129}.

Der NADPH-Oxidase kommt bei der ROS-Freisetzung, wie bereits erwähnt, eine bedeutende Rolle zu. Über die Phosphorylierung einer 48 kDa schweren Untereinheit¹³⁰ p47^{phox}, mit homologen Domänen zu Tyrosin Kinasen der Src-Familie, kann die NADPH-Oxidase aktiviert werden. Sowohl die PKC als auch die Protein Kinase A (PKA) oder p38MAPK und ERK2 können die Aktivierung der Oxidase steuern^{131–134}.

Auch eine Reihe GTP-bindender Proteine, die an Regulationsmechanismen verschiedener Zellantworten beteiligt sind, können in Neutrophilen die Aktivität der NADPH-Oxidase und damit die ROS-Freisetzung beeinflussen. In zellfreien Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Phosphorylierungszustand der zur Rho-Familie zugehörigen Rac-Proteine, in Assoziation mit GTP bzw. GDP, zum An- oder Ausschalten der NADPH-Oxidase von Bedeutung ist¹⁰⁵. In Korrelation dazu steht die Beobachtung der absoluten Notwendigkeit von GTP zur Aktivierung der NADPH-Oxidase^{105;135}. Außerdem stehen Rac-GTPasen in Leukozyten mit p21-aktivierten Kinasen (PAKs) in Verbindung, die wiederum den „resiratory burst“ modulieren¹³⁶.

Kürzlich konnte ROR α als ein weiterer bedeutender Mitspieler bei der Synthese bzw. Freisetzung von ROS identifiziert werden. Bei Behandlung mit einem ROR α -Inhibitor setzten humane neutrophile Granulozyten *in vitro* weniger ROS frei¹²⁰.

Zur Aktivierung der Neutrophilen scheint auch das Chaperon HSP90 (Heat-Shock-Protein 90) entscheidend beizutragen¹³⁷, da die pharmakologische Blockade zu einer reduzierten ROS-Freisetzung führte¹³⁸. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte die HSP90-Blockade vor Hautschädigungen schützen^{60;138;139}.

Die ROS-Freisetzung aus Neutrophilen ist entscheidend für die Ausprägung der EBA Symptome. Dennoch werden über viele weitere Signalkaskaden weitere Funktionen und Mechanismen, wie beispielsweise eine gesteigerte Freisetzung der Neutrophilen aus dem Knochenmark, die Migration und Rekrutierung in entsprechende Gewebe, die Ausbildung von NETs oder die Freisetzung von Granula gesteuert. Bei der Migration Neutrophiler aus dem Gefäßsystem werden Signale von β 2-Integrinen und TNF-Rezeptoren mit Hilfe der Pyk2 integriert. Die Neutrophilen setzen daraufhin Granula und gewebsschädigende Substanzen, wie die ROS, frei. Die Bedeutung von Src-Tyrosinkinasen (Fgr und Hck) bei diesem Regulationsprozess zeigte Mocsai in seiner Studie mit Hck^{-/-} Zellen, die keine Granula freisetzen¹⁴⁰.

In dieser Arbeit konzentriere ich mich allerdings auf die Signalkaskaden, die zur Freisetzung von ROS aus den Neutrophilen führen.

1.5 Charakteristika und Anwendungsgebiete der *in vivo* verwendeten Signaltransduktionsinhibitoren (STI)

Sotrastaurin (AEB071) ist ein nicht selektiver PKC-Inhibitor, der neben der θ -Untereinheit (IC_{50} 0,22 nM) in höheren Konzentrationen auch die α -, β und δ -Untereinheit (IC_{50} 0,6 - 2,1 nM) blockiert¹⁴¹. Die PKC ist im Signaltransduktionsweg relativ zu Beginn gelegen¹²¹, wird durch DAG beeinflusst, calciumabhängig aktiviert^{142;143} und kommt mit ihren Subformen in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark ausgeprägt vor. Auch in Zellen des Blut- und Immunsystems, wie den Monozyten¹⁴⁴, den T- und B-Zellen¹⁴⁵⁻¹⁴⁹ und den neutrophilen Granulozyten¹⁵⁰⁻¹⁵², wird die PKC exprimiert. Die T-Zell-Proliferation kann mit einem IC_{50} von 90 nM blockiert werden¹⁴⁶. Sotrastaurin ist mit Nebenwirkungen gastrointestinaler Art, wie Durchfall, Obstipation, Übelkeit und Erbrechen sowie Anämien und Tachykardien^{153;154} ein einigermaßen gut verträgliches oral verabreichbares Medikament. Durch die Blockade der PKC konnte bei nieren- und lebertransplantierten Patienten in klinischen Studien der Phase II eine kurzfristige Wirksamkeit gegen Abstoßungsreaktionen durch verringerte T-Zellaktivierung und damit einhergehender verringerter Immunantwort gezeigt werden¹⁵⁴⁻¹⁵⁶.

GDC-0941 blockiert verschiedene Untereinheiten der PI3-Kinase, insbesondere $p110\alpha$ und $p110\delta$ (IC_{50} 3 nM)¹⁵⁷. Seine günstigen pharmakokinetischen und toxikologischen Eigenschaften¹⁵⁷ sind Voraussetzung für die Verwendung von GDC-0941 in *in vivo* Modellen und klinischen Studien. Sowohl präklinische Versuche mit Xenograft-Modellen für HER2-positive Tumoren oder das Medulloblastom bei Mäusen¹⁵⁸⁻¹⁶⁰ als auch klinische Phase I und II Studien zu „soliden“¹⁶¹ oder Östrogenrezeptor-positiven Tumoren¹⁶² wiesen bei täglicher oraler Behandlung mit GDC-0941 eine antiproliferative Wirkung des PI3K-Inhibitors auf. In der Kancerogenese stellt der PI3K/AKT Signalweg einen entscheidenden Aspekt bezüglich Proliferation, Migration und Angiogenese dar^{158;160}. Dieser Signalweg wird auch bei Immunkomplexbindung über den $Fc\gamma$ -Rezeptor auf neutrophilen Granulozyten aktiviert und sorgt für die Bereitstellung von ROS zur Abwehr fremder Organismen¹²¹.

Bei Autoimmunerkrankungen, wie z.B. der kollageninduzierten Arthritis, wirken andere PI3K-Inhibitoren, wie **IC-87114** (IC_{50} 0,5 μ M¹⁶³), abmildernd auf den Krankheitsverlauf^{164;165}. Beschrieben wurde eine deutliche Reduktion der Anzahl zirkulierender AK, der Produktion proinflammatorischer Zytokine, der Zellmigration und der Schwellungen, ausgehend von der Blockade des PI3K/Akt-Signalweges durch IC-87114 in B-Zellen¹⁶⁶. In einem Mausmodell zur allergischen Immunantwort in der Haut führte die Gabe von IC-87114 dosisabhängig zu einer reduzierten Mastzelldegranulation und damit zu einer geringer ausgeprägten Immunantwort¹⁶⁷.

Über die PI3K wird im weiteren Verlauf der Signalkaskade AKT aktiviert. Dafür ist die Phosphoinositid-abhängige Protein Kinase 1 (PDK1) notwendig¹⁶⁸, die durch **BX-795** inhibiert wird¹⁶⁹.

(IC₅₀ 6 nM¹⁶⁹). Bisher wurde die PDK1-Blockade therapeutisch v.a. bei tumorös wachsenden Zellen untersucht, da diese häufig eine Überexpression der PDK1 aufweisen¹⁷⁰ und die Behandlung mit PDK1-Inhibitoren *in vitro* zu reduziertem Tumorwachstum führte^{168;170}.

BX-795 blockiert in Folge der PDK1-Inhibierung auch die Phosphorylierung nachgeschalteter Kinasen, wie PKC und AKT¹⁷¹. Im Endeffekt resultiert daraus die Funktionseinschränkung einer an der Migration von Neutrophilen und Makrophagen und an der Aktivierung und Proliferation von T- und B-Zellen^{172;173} beteiligten Signalkaskade. Bei Untersuchungen zu PDK1-abhängigen Regulationsmechanismen in neutrophilen Granulozyten konnte eine Abhängigkeit zwischen PDK1 und der neutrophilen Chemotaxis, nicht jedoch zwischen PDK1 und der ROS-Freisetzung festgestellt werden. PDK1-knock-out Neutrophile zeigten keine Alteration der ROS-Freisetzung¹⁷¹. In Experimenten mit multiplen Myelomzellen stellte man darüber hinaus sogar einen Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies bei Behandlung mit einem PDK1-Inhibitor (Dichloracetat) fest¹⁷⁴.

PH-797804 ist ein Inhibitor der p38 α MAPK (IC₅₀ 26 nM¹⁷⁵). Die MAPK-Signalkaskade, die ebenfalls der PI3K nachgeschaltet ist, kann durch proinflammatorische Mediatoren, wie TNF- α und IL-1 β , aktiviert werden und nimmt bei der Entwicklung von entzündlichen Erkrankungen, beispielsweise Morbus Crohn, Psoriasis und RA, eine entscheidende Rolle ein^{176;177}. Aufgrund der stark selektiven Wirkung auf p38 α , der guten pharmakokinetischen Eigenschaften nach oraler Gabe und der deutlich antiinflammatorischen Wirksamkeit in Tierversuchen nach Endotoxingabe oder bei RA¹⁷⁵ besitzt PH-797804 hohes Potential bezüglich seiner Anwendung am Menschen.

Während bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen häufig überaktive B- und T-Zellen und proinflammatorische Milieus mit Aktivierung von Immunzellen sowie Freisetzung proinflammatorischer Zytokine im Vordergrund stehen¹⁷⁵, konzentriert sich diese Arbeit auf neutrophile Granulozyten und ihren Beitrag zum Pathomechanismus der EBA. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Migration Neutrophiler in Lungengewebe und Sputum von COPD-Patienten nach LPS-Inhalation durch orale Gabe von PH-797804 minimiert werden kann¹⁷⁸. Auch die ROS-Freisetzung aus Neutrophilen und die damit einhergehende Spaltbildung der Haut an der DEJ kann MAPK-abhängig reguliert werden⁵⁵.

MK-2206 hat durch die Blockade von AKT1/2/3 (IC₅₀ 8 nM/ 12 nM/ 65 nM¹⁷⁹) bereits seine Wirksamkeit auf unterschiedliche Tumoren *in vitro*, *in vivo* sowie in klinischen Studien gezeigt¹⁸⁰. Der AKT-Signalweg hat neben seiner Bedeutung bei Tumorwachstum auch auf Regulationsmechanismen des Immunsystems Einfluss. Zellantworten neutrophiler Granulozyten, Makrophagen, dendritischer Zellen und T-Zellen können über diesen Weg verändert werden^{181;182}. So ist AKT in Signalkaskaden involviert, die bei Entzündungsprozessen in Neutrophilen zur Synthese proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, zur Zellrekrutierung und zur NADPH gesteuerten ROS Generierung beitragen¹⁸¹.

Die Rac-GTPase, genauer die Rac1- und Rac3-GTPase, die durch **EHop-016** inhibiert wird¹⁸³ (IC_{50} 1,1 μM ¹⁸³), liegt in der Signalkaskade ebenfalls der PI3K nachgeschaltet. Die Migration und Invasion von Krebszellen konnte durch EHop-016-Gabe in *in vitro* und *in vivo* minimiert werden^{183;184}. Untersuchungen zur Aktivierung der NADPH-Oxidase wiesen vor allem auf eine Beteiligung der Isoform Rac2 und weniger der von EHop-016 spezifisch blockierten Isoformen Rac1 und Rac2 hin¹⁸⁵.

Der PI3K-Signalweg steht neben der Aktivierung nachgeschalteter Kaskaden, wie PKC und AKT, auch mit c-Met, dem Tyrosin Kinase Rezeptor für den HGF-Signalweg (Hepatocyte Growth Factor), in Verbindung¹⁸⁶. Der über den HGF/SF Liganden aktivierte Rezeptor war als Onkogen und Zielmolekül v.a. in der onkologischen Forschung von Bedeutung. Seine Blockade durch orale Gabe von **PHA-665752** (IC_{50} 9nM¹⁸⁷) mit anschließend geringerer Phosphorylierung nachgeschalteter Mediatoren, einschließlich Gab1, ERK1/2, PI3K, AKT, PLC γ und STAT3^{186–188} führte zur dosisabhängigen Volumenreduktion von Tumoren^{187;189;190}.

Neben der direkten Wirkung auf Tumorzellen hat der c-Met Signalweg auch eine immunregulatorische Funktion¹⁹¹. Die c-Met gesteuerte Signalkaskade steigert bei Aktivierung *in vivo* die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark sowie die transendotheliale Migration bei Tumorgeschehen¹⁹². Demgegenüber stehen Untersuchungen, die der Aktivierung des c-Met Signalweges durch den HGF Liganden eine immunprotektive Wirkung im Sinne einer Antigen-toleranz dendritischer Zellen und Hochregulation antiinflammatorischer Zytokine zuschreiben¹⁹¹.

NU7441 hemmt die DNA-PK (IC_{50} -Wert 14 nM¹⁹³) und wurde bisher ebenfalls v.a. als therapeutische Option bei kanzerösen Prozessen erforscht, da die Blockade der DNA-PK zu erhöhter Zytotoxizität und Sensitivität gegenüber Radiotherapie führte^{194;195}. Die schlechte Wasserlöslichkeit und orale Bioverfügbarkeit von NU7441 schränkten jedoch weitere klinische Forschungen ein^{194;196;197}. Neben der Bedeutung in der Tumorentstehung scheint die DNA-PK auch immunregulatorische Funktionen zu besitzen. Pathogene virale oder bakterielle Proteine und DNA sowie körpereigene veränderte oder geschädigte DNA-Bestandteile kann die DNA-PK über die PAMPS (pathogen-associated molecular patterns) erkennen. Die Aktivierung der DNA-PK nach Entdeckung solcher Muster ruft durch Induktion von IFN β , Zytokinen und Chemokinen eine Immunantwort hervor¹⁹⁸.

Propranolol ist ein β -Adrenorezeptoren blockierendes Medikament (IC_{50} 12 nM¹⁹⁹) und wird heutzutage im klinischen Alltag bereits häufig eingesetzt. Neben den herzspezifischen β_1 -Rezeptoren bindet Propranolol auch an β_2 -Rezeptoren, nicht jedoch an β_3 -Rezeptoren und gehört damit zur Gruppe der nicht herzselektiven Betablocker. Kardiale Erkrankungen^{200–203}, Hämangiome^{204–206} und Migräne sind Krankheiten, die mit diesem Betablocker behandelt werden²⁰⁷. Allgemein gilt Propranolol als sehr gut verträgliches Medikament mit unspezifischen

Nebenwirkungen, wie Übelkeit, Erbrechen, Diarrhö, Müdigkeit, Schwindel oder Kopfschmerzen sowie z.T. Bradykardien, Hypotensionen und Hypoglykämien^{200;208}.

Die Bindung an β -Rezeptoren resultiert in der über G-Proteine gekoppelten Aktivierung unterschiedlicher Signalkaskaden wie beispielsweise der Adenylatzyklase (AC), die mit erhöhten cAMP-Spiegeln einhergeht und so die zellulären Mechanismen reguliert²⁰⁹. Agonisten der β 2-Rezeptoren führen zur Aktivierung der Src-Tyrosin Kinasen, Ras und MAPK^{209;210}. Diese haben wiederum die Aktivierung verschiedener Signalwege wie Raf/MEK/ERK und PI3K/AKT zur Folge, wodurch Transkriptionsfaktoren aktiviert werden und Zellproliferation und -überleben reguliert wird²¹¹. Die Behandlung mit dem β 2-Antagonisten Propranolol führte bei infantilen Hämangiomen zu einer Reduktion der Angiogenese durch verringerte Expression des Wachstumsfaktors VEGF (reviewed²⁰⁶) und bei Krebszellen zu einer verminderten Freisetzung von MMP²¹¹. Gerade die verminderte Freisetzung von MMP ist in der Betrachtung für EBA ein interessanter Effekt, da sie neben ROS zur Schädigung des Gewebes beitragen²³.

Nilotinib fand mit seiner Fähigkeit das Bcr-Abl Fusionsprotein zu blockieren ($IC_{50} < 30 \text{ nM}$ ²¹²) besonders in der onkologischen Forschung an leukämischen Zellen Aufmerksamkeit²¹³. Die hinter Bcr-Abl gelegenen aktivierten Signalwege, wie PI3K/ AKT/mTor, führen zu verlängertem Zellüberleben, sodass die Blockade von Bcr-ABL nach vielen klinischen Phase I, II und III Studien nun therapeutisch genutzt wird²¹⁴. Der c-Abl Teil des Fusionsproteins wird auch von Zellen des Immunsystems exprimiert und kann über verschiedene Signalwege, beispielsweise über Eingriff in den NF- κ B Signalweg, T- und B-Zellen regulieren^{121;215;216}. Auch Neutrophile können durch c-Abl-Blockade in ihrer β -Integrin-abhängigen Migration gehemmt werden²¹⁷.

Neben den Rezeptoren und intrazellulär gelegenen Kinasen stellt $TNF\alpha$ einen Parameter im Serum dar, der bei Entzündungen vermehrt vorkommt und der bei der Regulation der Immunantwort auf entzündliche Prozesse eine Schlüsselrolle einnimmt^{89;218}. Bei Patienten mit AIBD sind $TNF\alpha$ -Serumlevel erhöht^{219;220}. Im EBA-Mausmodell konnten erhöhte Spiegel von $TNF\alpha$ in den Hautläsionen, nicht aber im Mausserum gefunden werden⁸⁹. Etanercept (ETA) (**Enbrel**), Adalimumab, Golimumab und Infliximab sind $TNF\alpha$ -Inhibitoren, die bei vielen entzündlichen Erkrankungen, wie RA²²¹ und Autoimmundermatosen^{222–225} eingesetzt werden. Während Studien zu Etanercept bei RA im Vergleich zur Placebobehandlung keine stärker ausgeprägten Nebenwirkungen identifizierten²²¹, sehen andere Studien einen Zusammenhang zwischen Etanercept und der Entstehung kutaner Vaskulitis²²⁶ und Morbus Crohn²²⁷.

1.6 Zielsetzung

Als Haupteffektorzellen stellen neutrophile Granulozyten in der Pathogenese der EBA einen entscheidenden Faktor dar. Über ihre Aktivierung und die damit verbundene, über verschiedene Signalkaskaden getriggerte Freisetzung von ROS rufen sie Symptome wie Hautschädigung und Blasenbildung hervor. Die Behandlung dieser Erkrankung gestaltet sich bislang noch schwierig, da die zur Therapie eingesetzten immunsuppressiv, jedoch wenig spezifisch wirkenden Medikamente mit schwerwiegenden Nebenwirkungen einhergehen^{23;228}. Darüber hinaus besitzen sie keine kurative Wirkung im Sinne einer ursächlich wirkenden Behandlung. Übergeordnetes Ziel meiner Arbeit ist es potentielle neue medikamentöse Ansätze zur Therapie der EBA zu finden. Durch eine spezifischere Wirkungsweise, als allgemein wirkende Immunsuppressiva sie besitzen, sollen neue Therapien die Patienten von geringeren Nebenwirkungen profitieren lassen. Das längerfristige, über meine Arbeit hinausreichende Ziel ist die Identifikation eines vorzugsweise topisch wirksamen Medikaments. Diese Applikationsart geht in der Regel mit deutlich geringeren Nebenwirkungen einher.

Um ein Medikament mit spezifischerem Angriffspunkt zu finden, muss der Fokus näher auf den Pathomechanismus der EBA und die Signalkaskaden der Immunkomplex-aktivierten neutrophilen Granulozyten gerichtet werden.

Meine Untersuchungen konzentrieren sich auf Substanzen, die in einem vorangegangenen Projekt unserer Arbeitsgruppe mit z.T. noch unveröffentlichten Daten aus einer Sammlung von Medikamenten ausgewählt wurden und die in den Signalweg der neutrophilen Granulozyten eingreifen.

Die Validierung der Wirkung der Medikamente auf die ROS-Freisetzung und die damit einhergehende Möglichkeit eines neuen Therapieansatzes wurde auf zwei Arbeitsschritte aufgeteilt:

1. Durch einen *in vitro* ROS-Freisetzungsversuch sollte die hemmende Wirkung verschiedener Medikamente auf die ROS-Freisetzung durch Immunkomplex-aktivierte, humane neutrophile Granulozyten getestet werden.
2. In *in vivo* Untersuchungen mit einer lokal induzierten EBA Erkrankung bei Mäusen sollte die Fähigkeit der *in vitro* wirksamen Medikamente in Bezug auf eine geringere Krankheitsausprägung der EBA überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Antigene, Antikörper, Seren, Reagenzien, Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Antigene und Antikörper

Spezifität	Konzentration oder Unit	Hersteller, Firmensitz
hCOL7 E-F	0,7 mg/ml	AG Recke, Uni Lübeck ⁴⁹ , Deutschland
anti-hCOL-IgG1	0,984 mg/ml	AG Recke, Uni Lübeck ⁴⁹ , Deutschland
FITC conjugated Goat IgG Fraction to Mouse Complement C3	4 mg/ml	MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland
Anti-humanes CD16 (Pacific Blue) Clone 3G8	0,5 mg/ ml	Biolegend, San Diego, USA
FITC conjugated Donkey anti-Rabbit IgG	0,5 mg	Jackson Immuno Research, Cambridge, UK
Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP	1 ml	Agilent-Dako, Santa Clara, USA

2.1.1 Reagenzien

Tabelle 2.1 verwendete Reagenzien und Chemikalien

Reagenzien/Chemikalien	Hersteller, Firmensitz
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	SIGMA-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Aceton	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Aqua dest. (<i>Aqua ad iniectabilia</i>)	Fresenius Kabi France, Hamburg, Deutschland
Albumin Fraktion V, biotinfrei	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Albumin Fraktion V, M - 66000 g/mol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dialyseschlauch Visking, Cellulose Typ 36/32 inch. Wandst. 0,020 mm, B 44 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dimethyl Sulphoxide (DMSO)	SIGMA-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol 70% vergällt	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd solution 4%	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 2.1 (Fortsetzung)

HEPES Bufer solution 1M	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Histofix 4% säurefrei (pH 7)-phosphatgepufferte Formaldehydlösung 4%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Injektionsspritzen (Injekt-F 1 ml)	B Braun, Melsungen, Deutschland
Injektionsspritzen (Omnican F 1 ml)	B Braun, Melsungen, Deutschland
Ketamin	SIGMA-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Luminol (<i>5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione free acid</i>)	SIGMA-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumcarbonat Na_2CO_3 , M = 105.99 g/mol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid >99,8%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat >99,5% , p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat NaHCO_3 , M = 84.01 g/mol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaCl 0.9% (steril und endotoxinfrei)	Fresenius Kabi France, Hamburg, Deutschland
Phosphate Buffered Saline (PBS) (1x) w/o CaCl_2 , w/o MgCl_2	GIBCO by life technologies, Waltham, USA
ortho.Phosphorsäure 85%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Polyethyleneglycol (PEG) BioUltra 400	SIGMA-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Polymorphprep	Fresenius Kabi Norge AS, Oslo, Norwegen
Propyleneglycol, Kosher	SIGMA-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Protein G Resin Säule (Cat.No. L00209 5 ml; Lot No. C40071501)	GenScript, Piscataway, USA
RPMI 1640 w L-Glutamine, w 25mM Hepes	Lonza, Basel, Schweiz
RPMI 1640 w Glutamine, w/o Glukose, w/o Phenol red, w 2.0g/L NaCHO_3	Genaxxon bioscience GmbH, Ulm, Deutschland
Salzsäure (2N), 2 mol/l	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate)	SIGMA-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tween 80	SIGMA-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tissue-Tek	
Xylazin	SIGMA-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phorbol myristate acetate (PMA)	SIGMA-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Beschichtungspuffer	s. Anhang 6.1
Bindungspuffer	s. Anhang 6.1
CL-Medium	s. Anhang 6.1

2.1.2 Laborgeräte, Verbrauchsmaterialien und Software

Tabelle 2.2 verwendete Laborgeräte, Verbrauchsmaterialien und Software

Laborgeräte und Verbrauchsmaterial	Hersteller, Firmensitz
Amicon Ultra-15 (Zentrifugations)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
96 Deep-Well Platte (non-treated)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
96 well Microplatte (high binding)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Butterfly, Safety-Multifly 21G 200 mm lang	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Combitips advanced 5 ml, 10 ml	eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Cutasept F Hautdesinfizienz	Bode, Hamburg, Deutschland
EDTA S-Monovette 9 ml K3E	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Gewebeinfiltrationsautomat Leica ASP300 S	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Glaseindeckautomat für HE-Histologie Leica CV5030	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, La Jolla, USA
Elektronische Analysenwaage (Analytical Plus)	OHAUS, Greifensee, Schweiz
Elektrophorese-Netzgerät PEQPOWER 250	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
ELISA-Tips: 2-200 µl; 20-300 µl	eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Filtropur V50, V20 Filter	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Fluoreszenz-Mikroskop BZ-9000	Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland
Glaskapillaren: End-to-End Kapillare 20 µL K2E	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Hoods: LaminarAir HB 2448 Biowizard	Heraeus, Hanau, Deutschland Kojair, Vilppula, Finnland
Klebefolie, optisch klar	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Kryostat Leica CM3040S	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Kühlraum	Viessmann Kühle Systeme GmbH, Allendorf, Deutschland
LaTeX	LaTeX Project (Leslie Lamport), Mainz, Deutschland
MACSQuant Analyzer 10	Miltenyi Biotec, Auburn, USA
Mikrotom Leica RM2255	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Neubauer Zählkammer Improved, 0,100 mm Tiefe, 0,0025 mm ²	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Nitrocellulose Blotting Membrane 0,45 µm	GE Healthcare Life science
Multikanalpipetten: 0,5-10 µl; 10-100 µl; 30-300 µl	eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Multipipetten PLUS ("Stepper")	eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Office 365	Microsoft, Redmond, USA
Pasteur-Glaspipetten ISO 7712, 230 mm	Hecht-Assistent GmbH & Co KG, Rhön, Deutschland
Pasteur-Plastikpipetten 1 ml/Einmal-Pipette	BioSigma, Cona, Italy
pH-Meter pH562	WTW, Weilheim, Deutschland
Pipetten Research: 0,5-10 µl; 2-20 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl	eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Pipetus-Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Pipettenspitzen: 10 µl; 100 µl; 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Röhren 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 2.2 (Fortsetzung)

SafeSeal Gefäße 1.5 ml, 2.0 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Skalpell (Feather Disposable)	Feather
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Septoderm alkoholisches Hautdesinfizienz	Schumacher GmbH
Texmaker - original LaTeX Editor	Pascal Brachet,
Thickness dial gauge/spring-loaded micrometer	Mitutoyo, Neuss, Deutschland
Tischzentrifuge	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
Ultra Low Temperature Freezer C660 Premium	New Brunswick Scientific, Edison, USA
VICTOR ³ Multilabel Reader	PerkinElmer, Waltham, USA
Vortexer Bio-Vortex V1 Vortex-Genie 2 Reac 2000 Vortex	Hassa-Laborbedarf, Lübeck, Deutschland Scientific Industries, New York, USA Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Wägebapier (MN 226, 90x115mm)	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Wärme-Wasserbad	Köttermann GmbH & Co. KG, Uetze, Deutschland
Wilovert S Mikroskop	Helmut Hund GmbH, Wetzlar, deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0R (<i>für Neutrophilenaufreinigung</i>)	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Centrifuge 5804 (<i>für Neutrophilenaufreinigung, für Aufkonzentrierung von IgG</i>) R	eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland

2.1.3 Lösung und Lagerung der Inhibitoren und Aktivatoren für die *in vitro* und *in vivo* Versuche

Für die *in vitro* Untersuchungen wurden die Substanzen in unterschiedlichen Trägersubstanzen, zur besseren Vergleichbarkeit möglichst in DMSO, in einer Konzentration von 10 mM gelöst (s. Tabelle 2.3). Bei nicht in DMSO löslichen Substanzen wurden die vom Hersteller angegebenen Lösungsmittel verwendet und die Kontrollen dementsprechend angepasst. In gelöster Form wurden die Substanzen, wenn nicht anders angegeben, in 25 μ l-Aliquots bei -80°C gelagert. Die Testung der gelösten Substanzen fand innerhalb von drei Monaten statt, sodass die vom Hersteller angegebene Haltbarkeit von sechs Monaten nicht überschritten wurde. Bei Substanzen mit geringerer Haltbarkeit von einer Woche (Lyn Peptide Inhibitor, GP-CR GPR119 peptide, Ras inhibitory peptide und Hck Antibody blocking peptide) wurde die Testung innerhalb der folgenden vier Tage durchgeführt.

Tabelle 2.3 Lösung und Konzentration ausgewählter Substanzen für die *in vitro*-Testung ihres Einflusses auf die Signaltransduktion zur ROS-Freisetzung in aktivierten neutrophilen Granulozyten

Name	Ziel	Lösungsmittel	Konzentration	Hersteller, Firmensitz	IC ₅₀
BIBR 1532	Telomerase	DMSO	10 mM	Selleckchem, München, Deutschland	100 nM
BIRB 796	p38 α MAPK	DMSO	10mM	Selleckchem, München, Deutschland	38nM
BX-759	PDK1	DMSO	10 mM	Selleckchem, München, Deutschland	111 nM
CCG 1423	RhoA	DMSO	10 mM	Selleckchem, München, Deutschland	1,5 μ M
Cryptotanshinone	STAT3	DMSO	10 mM	Selleckchem, München, Deutschland	4,6 μ M
Dapagliflozin	hSGLT2	DMSO	10 mM	Selleckchem, München, Deutschland	1,1 nM
R59 949	DAG-Kinase	DMSO	10 mM	EnzoLifeScience, Lörrach, Deutschland	0,3 μ M
EHop-016	Rac GTPase	DMSO	10 mM	Selleckchem, München, Deutschland	1,1 μ M
Fulvestrant	ER	DMSO	10 mM	Selleckchem, München, Deutschland	0,29 nM
GDC-0994	ERK1/2	DMSO	10 mM	Selleckchem, München, Deutschland	1,1/0,3 nM
GSK1292263	GRP119	DMSO	10 mM	Selleckchem, München, Deutschland	>30 μ M
GPCR GPR119 peptide	GPR119	PBS, 0,12 % BSA, 0,02% NaN ₃	0,5 mg/ml	Abcam, Cambridge, UK	
HCK Antibody Blocking Peptide	HCK	A.dest	1 mg/ml	Abgent, San Diego, USA	
IC-87114	PI3K δ	DMSO	10 mM	Selleckchem, München, Deutschland	0,5 μ M
Iniparib (BSI-201)	PARP1	DMSO	10 mM	Selleckchem, München, Deutschland	40-128 μ M
Lyn Peptide Inhibitor	Lyn	A.dest.	10 mg/ml	Abcam, Cambridge, UK	
Mirabegron	β 3-Rezeptor	DMSO	10 mM	Selleckchem, München, Deutschland	22,4 nM
MK-2206	AKT1/2/3	DMSO	10 mM	Selleckchem, München, Deutschland	8/12/65 nM
Nilotinib	Bcr-Abl	DMSO	10 mM	Selleckchem, München, Deutschland	<30 nM
NU7441	DNA-PK	DMSO	10 mM	Selleckchem, München, Deutschland	14 nM

Tabelle 2.3 (Fortsetzung)

NVP-BEP800	HSP90 β	Ethanol (100%)	10 mM	Selleckchem, München, Deutschland	58 nM
PH797804	p38 α	DMSO	10mM	Selleckchem, München, Deutschland	26 nM
PHA-665752	c-Met	DMSO	10 mM	Selleckchem, München, Deutschland	9 nM
Propranolol HCl	β -Rezeptor	DMSO	10 mM	Selleckchem, München, Deutschland	12 nM
PRT062607 HCl	SYK	DMSO	10 mM	Selleckchem, München, Deutschland	1 nM
Ras inhibitory peptide	Ras	A.dest	1 mg/ml	EnzoLifeScience, Lörrach, Deutschland	
SMI-4a	Pim1	DMSO	10 mM	Selleckchem, München, Deutschland	17 nM
Sotrastaurin	pan-PKC	DMSO	10 mM	Selleckchem, München, Deutschland	0,22 nM
SR3335	ROR α	DMSO	10 mM	Biomol, Hamburg, Germany	480 nM
TGX-221	PI3K β	DMSO	10 mM	Selleckchem, München, Deutschland	5 nM
U0126	MEK1/2	DMSO	10 mM	Selleckchem, München, Deutschland	0,07 μ M
U73122	PLC γ	DMSO	5 mM	Selleckchem, München, Deutschland	1,0-2,1 μ M
XL019	JAK2	DMSO	10 mM	Selleckchem, München, Deutschland	2,2 nM

Für die *in vivo* Versuche wurden die Medikamente in den in Tabelle 2.4 angegebenen Trägersubstanzen und Dosierungen gelöst. BX-795, MK-2206 2HCl, PH797804, Propranolol und Sotrastaurin wurden in unserem Labor selbst in Lösung gebracht. Die übrigen in der Tabelle aufgeführten Substanzen wurden von der Firma Selleckchem in den passenden Dosierungen gelöst. Die von mir gelösten Medikamente wurden jeweils am Vorabend des Versuchsbeginns vorbereitet und für die Versuchsdauer von vier Tagen bei 4°C gelagert, mit Ausnahme von Sotrastaurin, das bei Raumtemperatur (RT) und in Dunkelheit gelagert wurde. Die von der Firma Selleckchem gelieferten Substanzen wurden drei Tage vor Versuchsbeginn geliefert und ebenfalls bei 4°C aufbewahrt.

Tabelle 2.4 Trägersubstanzen und Dosierungen der Medikamente für die *in vivo* Versuche

Name	Trägersubstanzen	Dosierung	Applikation	Häufigkeit
BX-759	30% Polyethylenglycol 400 (PEG400) 0.5% Tween 80 5% Propylene glycol	15 mg/kg	p.o.	2x tgl.
EHop-016	4% DMSO 30% PEG 300 5% Tween 80	12 mg/kg	i.p.	2x tgl.
GDC-0941	4% DMSO 30% PEG 300 5% Tween 80	40 mg/kg	p.o.	3x tgl.
IC-87114	4% DMSO 30% PEG 300 5% Tween 80	6 mg/kg	p.o.	3x tgl.
MK-2206	30% Captisol	120 mg/kg	p.o.	1x tgl.
Nilotinib	4% DMSO 30% PEG 300 5% Tween 80	24 mg/kg	p.o.	3x tgl.
NU7441	4% DMSO 30% PEG 300 5% Tween 80	5 mg/kg	i.p.	2x tgl.
PH797804	2% DMSO 30% PEG 400 5% Tween 80	1 mg/kg	p.o.	2x tgl.
PHA-665752	4% DMSO 30% PEG 300 5% Tween 80	30 mg/kg	i.p.	1x tgl.
Propranolol HCl	PBS	4 mg/kg	i.p.	1x tgl.
Sotrastaurin	10 x mehr D-Glukose als Sotrastaurin 20.75% PEG 400 8,5% 0,1M HCl	30 mg/kg	p.o.	3x tgl.

2.2 In vitro Validierung der Inhibitoren durch den ROS-Freisetzungsversuch

Mit Hilfe des ROS-Freisetzungsversuchs wurde die Freisetzung von ROS aus aktivierten neutrophilen Granulozyten detektiert. In vier unterschiedlichen Konzentrationen (10 μM , 1 μM , 0,1 μM , 0,01 μM) wurden die Effekte der Substanzen auf die Signalwege, die in neutrophili-

len Granulozyten zur ROS-Freisetzung führen, überprüft. Ziel war die Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve.

2.2.1 Gewinnung humaner neutrophiler Granulozyten aus Vollblutspenden

Für den ROS-Freisetzungsversuch wurden für jede Testsubstanz humane neutrophile Granulozyten aus jeweils vier bis maximal neun unterschiedlichen Spenderblutproben gewonnen. Alle Spender wurden im Vorhinein über die Risiken einer Blutentnahme aufgeklärt und gaben freiwillig ihr schriftliches Einverständnis. Das positive Votum der Ethikkommission, das zur Versuchsdurchführung am Menschen notwendig ist, lag zum Versuchsbeginn vor (Ethikvotum-Aktenzeichen 09-140, s. Anhang 6.2).

Die frisch am jeweiligen Versuchstag entnommenen Vollblutproben (45 ml) von gesunden Spendern wurden in zwei 50 ml Röhrchen auf Polymorphprep im Verhältnis 1:2 aufgeschichtet. Die langsame Aufschichtung des Blutes ist dabei wichtig, um Verwirbelungen beider Medien zu vermeiden. Bei anschließender Zentrifugation (535xg, ohne Bremse, 35 min, 23°C) konnte durch das Polymorphprep ein Dichtegradient zwischen den Blutzellen erzeugt werden. Es entstanden unterschiedliche Zellbanden, wobei die obere Bande PBMCs (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) und die darunterliegende Bande die notwendigen neutrophilen Granulozyten (PMNs) enthielt. Am Boden des Röhrchens befanden sich Erythrozyten (s. Abb. 2.1). Nach Absaugen des Überstandes wurde die gewünschte Bande von PMNs aus beiden 50 ml Röhrchen mit einer 1 ml Pipette abgenommen und in einem neuen 50 ml Röhrchen zusammengeführt. Die Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:2 mit RPMI-Halbmedium und RPMI 1640 auf 50 ml aufgefüllt (s. Anhang 6.1).

Die Proben wurden erneut zentrifugiert (301xg, mit Bremse, 10 min, 4°C) und der Überstand wurde abgenommen. Die Erythrozyten, die sich nach diesem Schritt noch in dem gebildeten Pellet befanden, wurden anschließend lysiert. Während der ersten Versuchsreihen fand die Lyse durch 30-sekündige Resuspension des Pellets mit 3 ml Lyse-Puffer (s. Anhang 6.1) statt, wurde durch Auffüllen auf 50 ml mit RPMI 1640 abgestoppt und erneut zentrifugiert (301xg, mit Bremse, 10 min, 4°C). Da das Ergebnis der Lyse häufig unzureichend war, wurde sie umgestellt auf eine 45-sekündige Lyse durch 5 ml destilliertes Wasser, die mit 5 ml zweifach konzentriertem PBS (Phosphate Buffered Saline) abgestoppt wurde. Nach Auffüllen des Probenröhrchens auf 50 ml mit einfach konzentriertem PBS wurde die Probe abermals zentrifugiert (301xg, mit Bremse, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde abgesaugt und das entstandene Pellet mit 20 ml CL-Medium (s. Anhang 6.1) in der ersten Versuchsreihe bzw. mit einfach konzentriertem PBS in den folgenden Versuchsreihen gewaschen und nochmals zentrifugiert (301xg, mit Bremse, 10 min, 4°C). Die Aufreinigung der Neutrophilen aus humanem Vollblut war damit abgeschlossen und das Pellet mit den gewünschten Zellen wurde in 3 ml

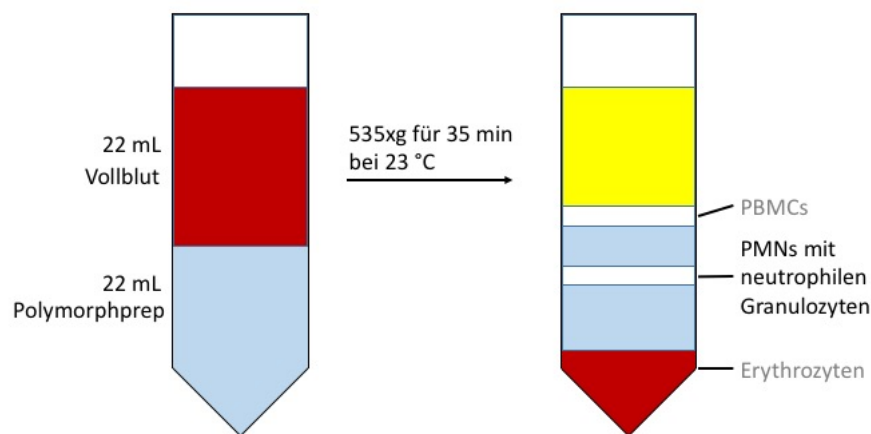


Abbildung 2.1 Polymorphprep Dichtegradient

Durch die 35-minütige Zentrifugation des auf Polymorphprep aufgeschichteten Vollblutes entsteht der abgebildete Zellgradient. Die Zellen werden nach ihrer Dichte aufgetrennt und es entstehen folgende Schichten und Banden von oben: erste Schicht (gelb) Plasma, zweite Schicht (weiß) PBMCs, dritte Schicht (blau) Polymorphprep, vierte Schicht (weiß) PMNs mit den gewünschten neutrophilen Granulozyten, fünfte Schicht (blau) Polymorphprep, Sediment (rot) Erythrozyten.

CL-Medium aufgenommen.

Um die Zellkonzentration mit einer Neubauer-Zählkammer zu ermitteln, wurden 10 μl der entstandenen Zellsuspension zu 80 μl CL-Medium gegeben und mit 10 μl Trypanblau angefärbt. Damit an jedem Versuchstag mit der gleichen Zellkonzentration von 2×10^6 Zellen/ml gearbeitet werden konnte, wurde die vorhandene Zellsuspension mit CL-Medium auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Während der weiteren Vorbereitung des Versuchs wurden die Zellen auf Eis gelagert.

2.2.2 Vorbereitung der 96-Well-Platte

Die isolierten neutrophilen Granulozyten wurden durch Immunkomplexe aus hCOL7 und anti-hCOL7 IgG1 aktiviert. Die notwendigen Immunkomplexe wurden dazu in einer 96-Well-Platte vorbereitet. Neben den Ansätzen mit Immunkomplexen für die Testung der Medikamente wurden auf der Platte ebenfalls Kontrollen durchgeführt. Als Positivkontrolle diente die Aktivierung zum einen mit den Immunkomplexen ohne Zugabe von Medikamenten und zum anderen mit Phorbol myristate acetate (PMA) (0,1 $\mu\text{g/ml}$). PMA-Zugabe zu neutrophilen Granulozyten resultiert über die Aktivierung der Wortmannin-sensitiven NADPH-Oxidase in einer Aktivierung der Neutrophilen und damit der Freisetzung von ROS²²⁹. Als Negativkontrolle diente die Beschichtung der Wells lediglich mit dem AK anti-hCOL7 IgG1 oder dem Antigen hCOL7. Um einen Einfluss des Lösungsmittels auf den Effekt der Medikamente auszuschließen, lief außerdem eine Kontrolle parallel, bei der die Wells mit Immunkomplexen beschichtet wurden

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PMA	PMA	S01 10 μ M	S01 10 μ M	S02 10 μ M	S02 10 μ M	S03 10 μ M	S03 10 μ M	S04 10 μ M	S04 10 μ M	S05 10 μ M	S05 10 μ M
B	IC	IC	S01 1 μ M	S01 1 μ M	S02 1 μ M	S02 1 μ M	S03 1 μ M	S03 1 μ M	S04 1 μ M	S04 1 μ M	S05 1 μ M	S05 1 μ M
C	hCol7	hCol7	S01 0,1 μ M	S01 0,1 μ M	S02 0,1 μ M	S02 0,1 μ M	S03 0,1 μ M	S03 0,1 μ M	S04 0,1 μ M	S04 0,1 μ M	S05 0,1 μ M	S05 0,1 μ M
D	IgG1	IgG1	S01 0,01 μ M	S01 0,01 μ M	S02 0,01 μ M	S02 0,01 μ M	S03 0,01 μ M	S03 0,01 μ M	S04 0,01 μ M	S04 0,01 μ M	S05 0,01 μ M	S05 0,01 μ M
E	DMSO 1:1000	DMSO 1:1000	S06 10 μ M	S06 10 μ M	S07 10 μ M	S07 10 μ M	S08 10 μ M	S08 10 μ M	S09 10 μ M	S09 10 μ M	S10 10 μ M	S10 10 μ M
F	DMSO 1:10000	DMSO 1:10000	S06 1 μ M	S06 1 μ M	S07 1 μ M	S07 1 μ M	S08 1 μ M	S08 1 μ M	S09 1 μ M	S09 1 μ M	S10 1 μ M	S10 1 μ M
G	DMSO 1:100000	DMSO 1:100000	S06 0,1 μ M	S06 0,1 μ M	S07 0,1 μ M	S07 0,1 μ M	S08 0,1 μ M	S08 0,1 μ M	S09 0,1 μ M	S09 0,1 μ M	S10 0,1 μ M	S10 0,1 μ M
H	DMSO 1:1000000	DMSO 1:1000000	S06 0,01 μ M	S06 0,01 μ M	S07 0,01 μ M	S07 0,01 μ M	S08 0,01 μ M	S08 0,01 μ M	S09 0,01 μ M	S09 0,01 μ M	S10 0,01 μ M	S10 0,01 μ M

Abbildung 2.2 Schema der Plattenbelegung Jeweils in Doppelbestimmung: PMA = Positivkontrolle, IC(Immunkomplexe) = Positivkontrolle, hCOL7(Antigen) = Negativkontrolle, IgG1(AK) = Negativkontrolle, DMSO(Lösungsmittel) = Referenz, S01-S10 = Medikamente

und am Ende statt der Medikamente lediglich das Lösungsmittel zu den Zellen hinzugefügt wurde. Alle Ansätze wurden in Doppelbestimmung durchgeführt, um mögliche Pipettierfehler, Unreinheiten der Wells, Kontaminationen der Proben o.ä. in der Auswertung möglichst gering halten zu können (s. Abb. 2.2). Die Vorbereitung der Platte begann jeweils einen Tag vor dem eigentlichen Versuchstag. Dazu wurde das Antigen hCOL7 E-F mit einer Ausgangskonzentration von 0,7 mg/ml in einer Lösung mit Beschichtungspuffer (s. Anhang 6.1) auf eine Konzentration von 5 μ g/ml verdünnt und die Wells einer stark bindenden 96-Well Platte mit je 50 μ l dieser Lösung beschichtet. Um eine ausreichende Bindung des Antigens an die Wells zu ermöglichen, wurde die Platte über Nacht bei 4°C im Kühlraum gelagert.

Nach dreimaligem Waschen der Platte mit je 300 μ l Waschpuffer (s. Anhang 6.1) pro Well wurde sie am Versuchstag mit je 100 μ l Bindungspuffer (s. Anhang 6.1) geblockt und für mindestens eine Stunde bei RT auf einen Rüttler gestellt. Anschließend wurde die Platte dreimal mit 200 μ l Waschpuffer pro Well gewaschen und mit je 100 μ l AK-Lösung beschichtet. Der AK anti-hCOL7 IgG1 mit einer Ausgangskonzentration von 0,894 mg/ml wurde mit Bindungspuffer auf eine Konzentration von 1,8 μ g/ml verdünnt. Nachdem sich die mit AK beschichtete Platte für mindestens eineinhalb Stunden bei RT auf einem Rüttler befunden hatte, wurde sie abermals dreimal mit 200 μ l Waschpuffer pro Well gewaschen und während der weiteren Vorbereitung des Versuchs mit 150 μ l CL-Medium beschichtet auf Eis gestellt.

2.2.3 Verdünnung der Testsubstanzen

Die Substanzen wurden in vier unterschiedlichen Konzentrationen (10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M, 0,01 μ M) getestet. Die Substanzen wurden abgewogen und entsprechend der Löslichkeitsangaben

vom Hersteller mit in Tabelle 2.3 angegebenem Lösungsmittel in Lösung gebracht. Es wurden Stocklösungen jeweils in einer Konzentration von 10 mM hergestellt, die bei -80°C aufbewahrt wurden. Am jeweiligen Versuchstag wurde die 10 mM Stocklösung mit CL-Medium auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt (s. Abb. 2.3).

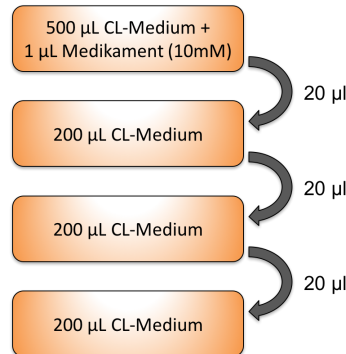


Abbildung 2.3 Pipettierschema zur Verdünnung der Medikamente auf die gewünschten Konzentrationen von 10 μM , 1 μM , 0,1 μM , 0,01 μM

Die Verdünnung wurde in Doppelansätzen auf einer 96-Deep-Well Platte (2 mL) vorgenommen. Je 100 μL der jeweiligen Verdünnungen wurden in die entsprechenden Wells der Deep-Well Platte mit Hilfe einer Mehrkanalpipette übertragen.

2.2.4 Messung der ROS-Freisetzung aus aktivierten neutrophilen Granulozyten mit Hilfe von Luminol

Für die Messung der ROS-Freisetzung aus Immunkomplex-aktivierten Neutrophilen wurden zuerst je 100 μL der verdünnten Medikamente, bzw. für die Negativkontrolle lediglich CL-Medium und für die Positivkontrolle PMA mit einer Mehrkanalpipette auf die vorbereitete 96-Well-Platte aufgetragen. Zu den aus Vollblut gewonnenen und in CL-Medium auf Eis aufbewahrten Neutrophilen wurden anteilig 5% Luminol-Lösung (s. Anhang 6.1) hinzugefügt. 100 μL dieser Zellsuspension sind in jedes Well der vorbereiteten Platte gegeben worden. Um eine sofortige Aktivierung der Granulozyten durch die Immunkomplexe zu vermeiden, stand die Platte auf Eis.

Durch die immobilisierten Immunkomplexe aus hCOL7 und anti-hCOL7 IgG1 wurden die neutrophilen Granulozyten letztendlich aktiviert und setzten infolgedessen ROS frei. Die freigesetzte Menge an ROS kann durch Zugabe von Luminol gemessen werden. Luminol ist eine Substanz, die an die freigesetzten ROS bindet und innerhalb einer Folgereaktion zum Phänomen der Chemilumineszenz führt²³⁰. Durch ein Elektron, welches aus einem energetisch angeregten Zustand in einen tiefer liegenden Zustand übergeht, wird Licht emittiert. Diese Lichtemissionen können vom Messgerät VICTOR³ Multilabel Reader detektiert werden. Das Ausmaß der Lichtemissionen gibt die Menge an freigesetzten ROS wieder und wird durch das Messgerät berechnet.

2.2.5 Kontrolle der Neutrophilenstimulation durch Immunkomplexe

Wie bereits erwähnt, wurden auf jeder Platte Kontrollansätze, sowohl zur Negativ- als auch zur Positivkontrolle (s. Kap. 2.2.2), mit durchgeführt. Durch die in den Wells immobilisierten Immunkomplexe sowie durch PMA sollten die neutrophilen Granulozyten ohne Zugabe eines Medikaments oder dessen Lösungsmittel stimuliert werden und eine gewisse Menge an ROS freisetzen. In den Wells der Negativkontrollen befand sich entweder nur das Antigen hCOL7, oder nur der AK anti-hCOL7 IgG1. Die Neutrophilen sollten in diesen Ansätzen nicht aktiviert werden und folglich weniger bzw. kein ROS freisetzen. Der Abbildung 2.4 ist zu entnehmen, dass die Kontrollen positiv waren.

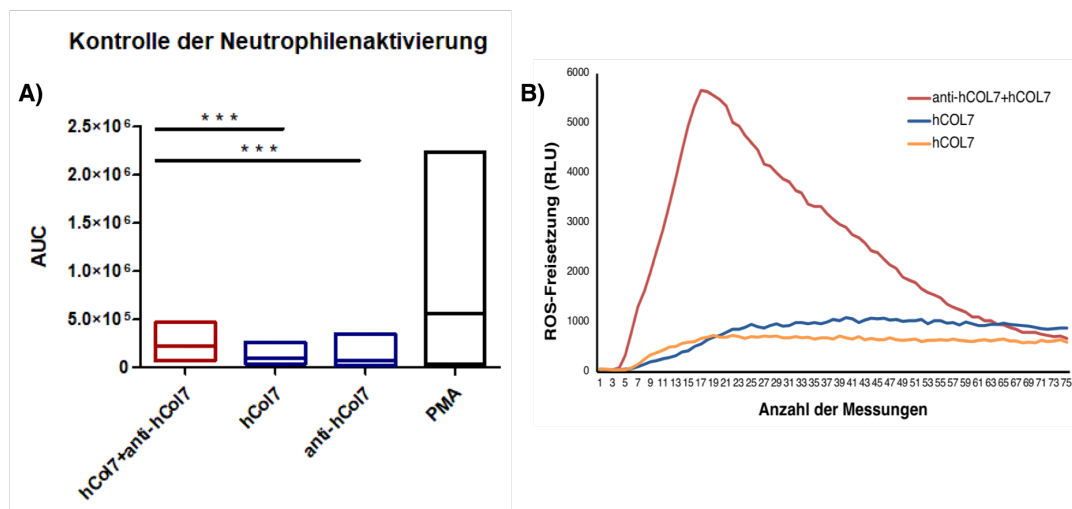


Abbildung 2.4 Kontrolle der Neutrophilenstimulation durch hCOL7-anti-hCOL7-IgG1 Immunkomplexe

Die aus humanem Vollblut gesunder Spender gewonnenen neutrophilen Granulozyten wurden durch die auf der Platte immobilisierten Immunkomplexe aus hCOL7 und anti-hCOL7-IgG1 im Gegensatz zu den Negativkontrollen (lediglich Antigen hCOL7 oder lediglich AK anti-hCOL7-IgG1) stärker aktiviert. Dies zeigt sich in einer statistisch signifikant höheren ROS-Freisetzung der Neutrophilen, die mit den Immunkomplexen in Berührung kamen im Vergleich zu denen, die lediglich Kontakt zu dem Antigen oder dem AK hatten. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test und der Software Graphpad Prism 5.0, (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$), $n = 29$.

2.2.6 Bestimmung des Reinheitsgrades isolierter neutrophiler Granulozyten mittels FACS

Die Bestimmung der Reinheit der isolierten neutrophilen Granulozyten lässt sich durch Abgrenzung der Neutrophilen von anderen Zellpopulationen aufgrund der Zellgröße und –granularität mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS) bestimmen. So weisen bspw. Lymphozyten eine geringere Zellgröße und –granularität als Granulozyten auf (s. Abb. 2.5). Des Weiteren sind Neutrophile über die Expression bestimmter Oberflächenmarker wie CD16 charak-

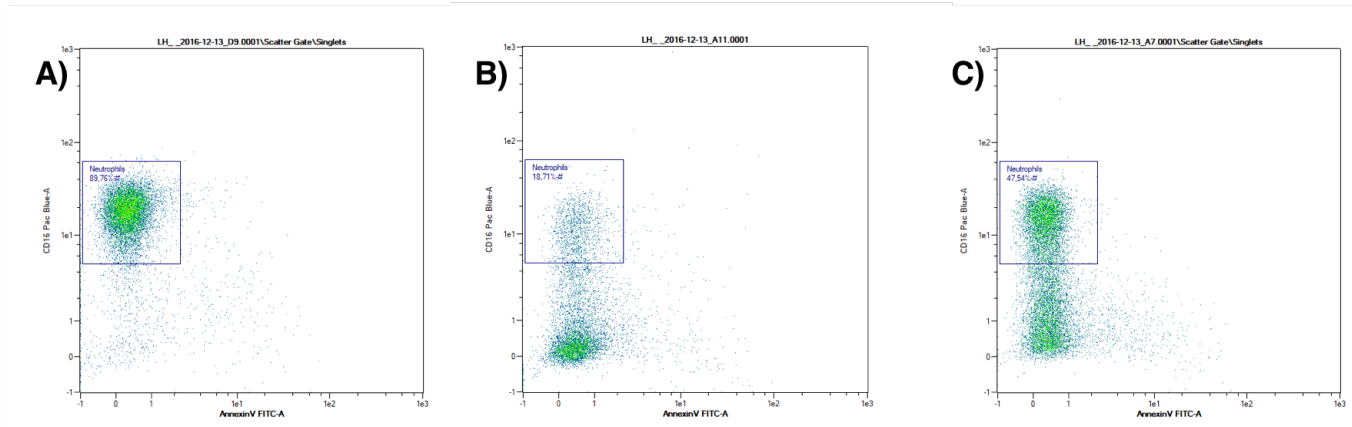


Abbildung 2.5 Durchflusszytometrische Analyse zur Bestimmung der Reinheit isolierter humaner PMN's

Aus humanem Vollblut wurden mittels Polymorphprep neutrophile Granulozyten isoliert (s. Kap. 2.2.1.) und für die durchflusszytometrische Analyse im Scatter Gate wie hier 2.2.6 beschrieben präpariert. Das CD16 Oberflächenmolekül sowie AnnexinV, ein Apoptosemarker, wurden jeweils mit einem AK markiert, der eine farbliche Unterscheidung der markierten Zellen bei der Durchflusszytometrie erlaubt. CD16 und AnnexinV wurden in diesem Diagramm gegeneinander aufgetragen. Dargestellt sind Proben vor (C) sowie nach der Isolation (A) Neutrophiler. Jeder Punkt stellt ein Messereignis, also eine Zelle dar. Während vor der Isolation ein Neutrophilen-Anteil von ca. 48% vorlag, führte der Isolationsvorgang zu einem quantitativen Anstieg auf ca. 90% Neutrophiler in der Probe.

terisiert. Für den quantitativen Nachweis der Reinheit Neutrophiler wurde ein anti-humane CD16-AK eingesetzt. 10^6 Zellen wurden in 100 μ l FACS Puffer (s. Anhang 6.1) für 30 min auf Eis mit 0,4 μ l des AK im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden anschließend für 6 min bei 450 x g zentrifugiert, in 100 μ l FACS-Puffer aufgenommen und durch ein 40 μ m Nylonnetz filtriert. Der Filter wurde mit 100 μ l FACS-Puffer gespült. Die Probe wurde bis zur Messung kühl (2-8°C) und dunkel gelagert. Die Messung erfolgte am *MACS Quant Analyzer 10*.

2.3 Verfahren der Tierversuche

Die männlichen und weiblichen C57BL/6-Wildtyp-Mäuse stammten aus der internen Zucht der Gemeinsamen Tierhaltung (GTH) der Universität zu Lübeck und wurden mit einem durchschnittlichen Alter von 12 Wochen in den Versuch aufgenommen. Die Tiere wurden den Auflagen des Ministeriums für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume Schleswig-Holstein, des Tierschutzgesetzes sowie der Tierschutz-Versuchstierordnung entsprechend in der GTH der Universität zu Lübeck gehalten. Bei einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus wurden sie von den qualifizierten Mitarbeitern der gemeinsamen Tierhaltung mit Standardfutter und Wasser versorgt. Der bei der Tierschutz-Ethikkommission des Ministeriums für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume in Kiel entsprechend gestellte Antrag auf Tierversuche wurde nach Begutachtung genehmigt (V 242 – 229788/2015 (108-8/15), s.

Anhang 6.2) und die Versuche von mir als zertifizierter Fachperson durchgeführt (s. Anhang 6.2).

2.3.1 Verfahren zur Induktion einer lokal auftretenden EBA

Zur Induktion einer lokalen EBA wurde ein bereits in anderen Arbeiten beschriebenes Modell verwendet^{11;14;80;231}. Um die Erkrankung lediglich in einem begrenzten Bereich des Körpers hervorzurufen, wurden Kaninchen-AK der IgG-Klasse gegen spezifisches murines COL7 (Versuchswoche 1), totales murines COL7 (Versuchswoche 3 und 4) bzw. gegen den von-Willebrandt-Faktor-A2- (vWFA2-) Bestandteil des COL7 (Versuchswoche 2) einmalig in einer Menge von 200 μ g, 980 μ g, bzw. 960 μ g intradermal in die Ohrbasis der Mäuse injiziert.

2.3.2 Aufbau der *in vivo* Versuche

In den *in vivo* Versuchen wurden nur Substanzen getestet, die *in vitro* zu einer statistisch signifikanten Verringerung der ROS-Freisetzung aus aktivierten neutrophilen Granulozyten geführt haben. Die Mäuse wurden bereits zwei Tage vor der Injektion des anti-mCOL7-IgG-AK mit dem jeweiligen Medikament behandelt (s. Abb. 2.6). Es handelt sich bei diesem Versuchsmodell um eine protektive, prophylaktische Medikamentengabe. Die Medikamente mit hemmender Wirkung auf die Signalkaskaden wurden also verabreicht, bevor sich COL7-anti-COL7 Immunkomplexe gebildet haben, die die Neutrophilen stimulieren. Auf diese Weise lässt sich möglicherweise ein höherer Effekt auf die Krankheitsausbildung erzielen. Außerdem kann der Versuch in einer verhältnismäßig kurzen Zeit, nämlich innerhalb von 5 Tagen durchgeführt werden. Ein therapeutisch ausgelegter Versuchsansatz würde hingegen darauf abzielen, die Symptome bei einer bereits vorhandenen Erkrankung zu reduzieren.

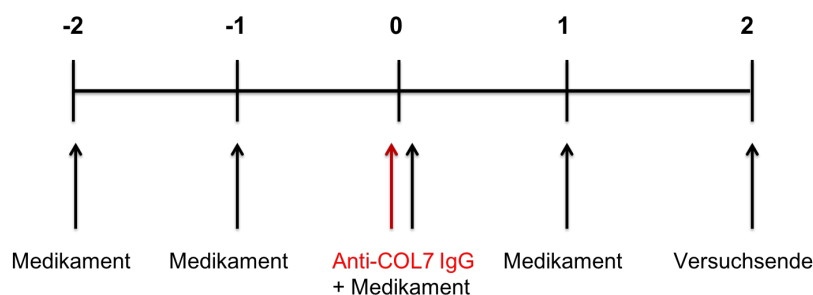


Abbildung 2.6 Behandlungsschema im *in vivo* Modell der lokalen EBA

Die tägliche Medikamentengabe begann zwei Tage (-2) vor Injektion des anti-mCOL7-IgG-AK (0) in die Ohrbasis. 2 Tage nach der AK-Injektion (2) wurde der Versuch beendet.

Pro Versuchsansatz gab es eine Interventionsgruppe, die die Medikamente entweder per oral (p.o.) oder intraperitoneal (i.p.) (s. Kap. 2.1.3 Tab. 2.4) erhielten sowie eine Kontrollgruppe,

die äquivalent dazu lediglich mit der Trägersubstanz der Medikamente behandelt wurde. Jede Gruppe bestand aus fünf Tieren, die äquivalent zueinander gleich viele männliche oder weibliche Tiere enthielten. Der Stichprobenumfang jeder Gruppe betrug 10 (5 Mäuse mit je 2 Ohren zur Testung der Medikamente).

Als Parameter für die Ausprägung der Entzündung wurde neben klinisch sichtbaren Rötungen, Krusten und Verschuppungen die Veränderung der Ohrdicke gemessen. Die weitere Beurteilung der Entzündung erfolgte histologisch. Die Messungen der Ohrdicke erfolgten an Tag 0, 1 und 2, während sich die Mäuse in Narkose befanden. An Tag 2 wurde der Versuch beendet, und die Tiere wurden in Narkose durch zervikale Dislokation getötet. Die Ohren wurden entnommen, um sie histologisch auf die Dicke der Epidermis und die Zelleinwanderung in die Dermis zu untersuchen und mittels DIF die Bindung der AK und die Beteiligung des Komplementsystems beurteilen zu können.

Die Versuche wurden in vier unterschiedlichen Ansätzen durchgeführt. Alle bei uns im Labor gelösten Medikamente wurden am Vorabend des ersten Versuchstages gelöst und für die Versuchsdauer von fünf Tagen bei 4°C (Sotrastaurin bei RT und abgedunkelt) gelagert.

Im ersten Ansatz wurden die Substanzen **BX-795** und **Propranolol** getestet (Trägersubstanzen s. Kap. 2.1.3, Tab. 2.4). Die Behandlungs- wie auch die Kontrollgruppe zur BX-759-Testung bestand aus je fünf weiblichen Mäusen im Alter von neun bis zehn Wochen. Die Tiere wurden nach dem in Abbildung 2.6 dargestellten Schema zweimal täglich p.o. mit dem Medikament mit einer Dosierung von 15 mg/kg Körpergewicht (KG) bzw. dem Lösungsmittel behandelt. In der Behandlungs- und Kontrollgruppe des Propranolol-Versuchs waren jeweils fünf männliche Tiere im Alter von neun bis zehn Wochen. Die Behandlung fand einmal täglich mit einer Dosis von 4 mg/kg KG i.p. statt. Am Tag 0 wurde den Tieren 200 µg spezifisches anti-COL7c-IgG (200 µl/100 µl) in die Ohrbasis beider Ohren injiziert.

Im zweiten Ansatz wurden **MK-2206** und **PH-797804** getestet (Trägersubstanzen s. Kap. 2.1.3, Tab. 2.4,). Die Gruppen für die Testung von MK-2206 bestanden aus jeweils fünf weiblichen, zehn bis elf Wochen alten Tieren, die einmal täglich p.o. mit 120 mg/kg KG des Medikaments bzw. Lösungsmittel behandelt wurden. PH797804 wurde den zehn bis zwölf Wochen alten Mäusen in der Behandlungsgruppe (drei männliche zwei weibliche) zweimal täglich mit einer Dosierung von 1 mg/kg KG p.o. verabreicht. Die Kontrollgruppe bestand aus zwei männlichen und drei weiblichen Tieren. Die Injektion des totalen anti-vWFA2-IgG-AK fand nach dem Versuchsaufbau an Tag 0 statt. Die Konzentration der AK-Lösung betrug 13,6 mg/ml, sodass mit einem Volumen von 70,5 µl 960 µg injiziert wurden.

Im dritten Ansatz wurden **PHA-665752**, **NU7441** und **EHop-016** getestet (Trägersubstanzen s. Kap. 2.1.3, Tab. 2.4). Die drei Substanzen PHA-665752, NU7441 und EHop-016 wurden von der Firma Selleckchem drei Tage vor Versuchsbeginn gelöst geliefert. PHA-665752 fiel bei Zugabe des destillierten Wassers wieder aus, weswegen das Wasser erst direkt vor der Gabe an die Behandlungsgruppe zugemischt wurde. Bei gleichen Trägersubstanzen der drei Medikamente wurde lediglich eine Kontrollgruppe benötigt. Die Kontroll- sowie die drei

Behandlungsgruppen bestanden aus je fünf, zwischen neun und 15 Wochen alten, männlichen Tieren. Den Tieren wurde einmal täglich 30 mg/kg KG PHA-665752 i.p., zweimal täglich 5mg/kg KG NU7441 i.p. oder zweimal täglich 12 mg/kg KG EHop i.p. bzw. das Lösungsmittel verabreicht. In die Ohrbasis wurden an Tag 0 der AK injiziert. Die Konzentration der Lösung des totalen anti-mCOL7 IgG-AK betrug 24,5 mg/ml. Es wurden 980 μ g in jedes Ohr injiziert.

Im vierten Ansatz wurde die Wirkung von **Sotrastaurin**, **IC-87441**, **Nilotinib** und **GDC-0941** beurteilt (Trägersubstanzen s. Kap. 2.1.3, Tab. 2.4). IC-87114, Nilotinib und GDC-0941 wurden von der Firma Selleckchem drei Tage vor Versuchsbeginn gelöst geliefert. GDC-0941 fiel bei Zugabe des destillierten Wassers aus, sodass das Wasser erst direkt vor der Injektion zugegeben wurde. Die drei Medikamente IC-87114, Nilotinib und GDC-0941 wurden in der gleichen Trägersubstanz gelöst, sodass lediglich eine Kontrollgruppe benötigt wurde. In den Gruppen waren jeweils 3-4 weibliche und entsprechend 1-2 männliche Tiere mit einem Alter von neun Wochen. Diese Gruppen wurden dreimal täglich p.o. behandelt. IC-87114 wurde mit einer Dosis von 5,6 mg/kg KG, Nilotinib mit einer Dosis von 24 mg/kg KG und GDC-0941 mit einer Dosis von 40 mg/kg KG verabreicht. Zusätzlich wurde Sotrastaurin in diesem Ansatz getestet (Trägersubstanzen s. Kap. 2.1.3, Tab. 2.4). Die Tiere wurden dreimal täglich p.o. mit einer Dosis von 30mg/kg KG behandelt. Die Behandlungs- und Kontrollgruppe bestanden aus weiblichen Mäusen im Alter von knapp zehn Wochen.

Allen Tieren wurde am Tag 0 (s. Abb. 2.6) 980 μ g des totalen anti-mCl7-IgG-AK intradermal in die Ohrbasis gespritzt.

2.4 Histologische Methoden: Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) und Direkte Immunfluoreszenz (DIF)

Für die histologische Beurteilung der Läsionen wurden die Ohren als Gewebeproben entnommen, enthaart und bis zur Weiterverarbeitung für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) in Histofix, einer 4%igen Formaldehydlösung, bei RT konserviert. Die Färbung wurde durch das Routinelabor der Dermatologie Lübeck durchgeführt.

Mit Hilfe der HE-Färbung lassen sich basophile Bestandteile der Zellen, wie die Zellkerne, DNA und Ribosomen blau darstellen. Acidophile Bestandteile, wie Proteine des Zytoplasmas und Kollagen, werden rot angefärbt. Diese Färbung erlaubt die Beurteilung des Gewebes bezüglich der Einwanderung von Zellen und Veränderungen der Hautschichten, v.a. der Epidermis, was beispielsweise die Dicke, die Bildung von Krusten oder Blasen betrifft. Die histologisch feststellbaren Veränderungen bezüglich Zelleinwanderung, Verdickung oder Verkrustung der Epidermis sowie Blasen- und Spaltbildung wurden als Parameter und Stärke der Entzündungsreaktion gewertet und in einem Score von 0 bis 3 zusammengefasst (s. Abb. 2.7). Anhand dieses Scores wurden die HE-gefärbten Schnitte miteinander verglichen.

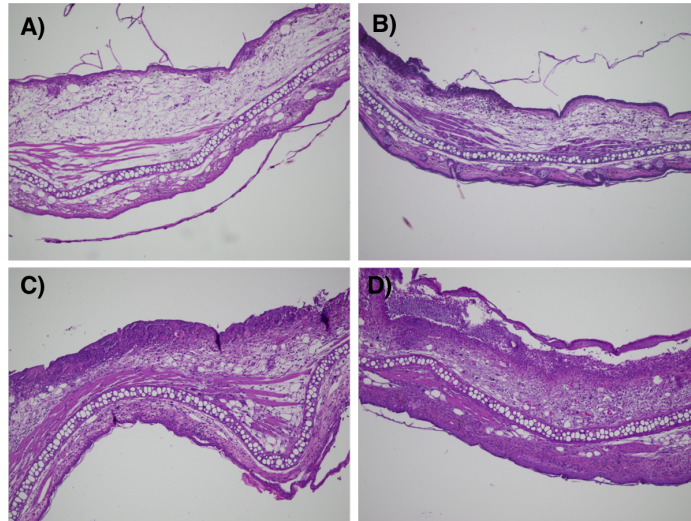


Abbildung 2.7 Score zur Analyse HE-gefärbter Gewebeschnitte A) Score=0: dünne Epidermis und keine Zelleinwanderung. B) Score=1: leicht verdickte, mehrschichtige Epidermis, oder Zelleinwanderung. C) Score=2: verdickte Epidermis und Einwanderung von Entzündungszellen. D) Score=3: verdickte Epidermis, massive Zelleinwanderung als Zeichen eines entzündlichen Prozesses und Spaltbildung.

Neben der HE-Färbung wurden die Gewebeproben auch mittels Fluoreszenzfärbungen untersucht. Dafür wurden die Proben nach Entnahme in TissueTek, einem Medium für spätere Kryoschnitte, eingebettet und auf Trockeneis (festes CO₂) gefroren. Die Weiterverarbeitung zu 6 μ m dicken Gefrierschnitten fand mit dem Kryostaten CM3040S von Leica statt. Diese Schnitte wurden bis zur weiteren Untersuchung bei -21°C aufbewahrt. Die anschließend angewendete DIF erlaubt die Sichtbarmachung von im Gewebe immobilisierten AK. Durch Bindung eines zweiten, mit einem Fluoreszenzfarbstoff beladenen AK, können die IgG-AK gegen das COL7 an der DEJ und die Ablagerung des Komplementfaktors C3 detektiert werden. Insgesamt wurden je drei Schnitte einer Probe für die DIF verwendet. Ein Schnitt für die Darstellung der im Gewebe gebundenen IgG-AK gegen das COL7, einer für die Darstellung des C3 Komplements und einer diente als Negativkontrolle.

Die 10-minütige Fixierung der Gefrierschnitte in -20°C kaltem Aceton erhöht zum einen die Permeabilität der Zellmembran für den Durchtritt des fluoreszierenden AK, zum anderen werden lösliche Moleküle und lipide Bestandteile aus dem Gewebe entfernt und Proteine in ihrem derzeitigen Zustand gefällt und so fixiert²³². Die AK gegen Kaninchen-IgG und das C3-Komplement wurden jeweils in einer Verdünnung von 1:100 mit 1xPBS angesetzt und die entsprechenden Schnitte anschließend mit 50 μ l dieser Verdünnungen beschichtet. Der für die Negativkontrolle gedachte Schnitt wurde lediglich mit 50 μ l PBS beschichtet. In einer dunklen, feuchten Kammer wurden die Proben für 45 min bei RT mit dem AK inkubiert. In zwei anschließenden zehnminütigen Waschschritten mit PBS bei RT wurden überschüssige AK von den Gewebeproben entfernt. Es folgte die Inkubation mit einem weiteren Fluoreszenzfarbstoff DAPI, der die DNA und somit die Zellkerne markiert. Alle drei Schnitte, auch die Negativkon-

trolle, wurden mit 80 μ l dieses Farbstoffes in einer 1:1000 Verdünnung mit 1xPBS beschichtet und für 5 min bei RT in einer feuchten, dunklen Kammer inkubiert. Nach zwei weiteren zehnminütigen Waschschritten mit PBS bei RT wurden die Proben mit Mowikol eingedeckt und bei 4°C in Dunkelheit bis zur mikroskopischen Analyse gelagert. Die mikroskopische Auswertung der Schnitte mit dem Fluoreszenz-Mikroskop BZ-9000 von Keyence fand maximal fünf Tage nach der Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff statt.

2.5 Statistik

Die statistische Analyse der Daten des *in vitro* Versuchs zur ROS-Freisetzung erfolgte mit dem *Kruskal-Wallis-Test*. Es wurden die Mittelwerte der Daten mit Standardabweichung dargestellt. Die Ergebnisse der *in vivo* Versuche wurden mithilfe des *Mann-Whitney-Tests*, z.T. mithilfe des t-Tests, analysiert. Die Daten wurden ebenfalls als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Als signifikant wurden Unterschiede mit $p < 0,05$ angesehen. Das Signifikanzniveau (p) und der Stichprobenumfang (n) werden im Ergebnisteil aufgeführt. Die Signifikanzprüfung sowie die graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 5.0.

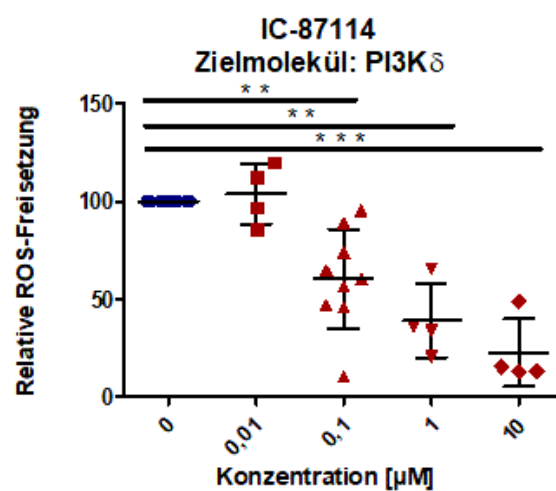
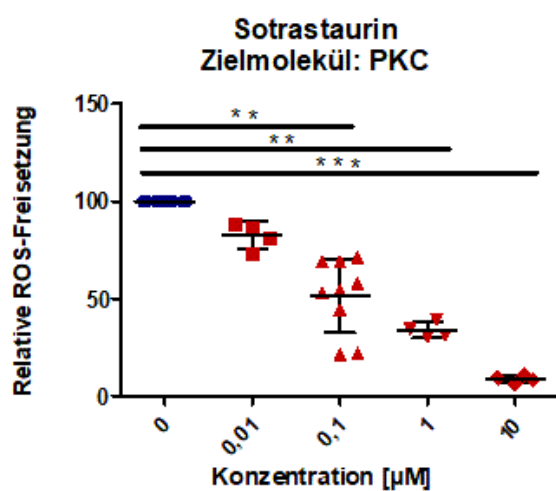
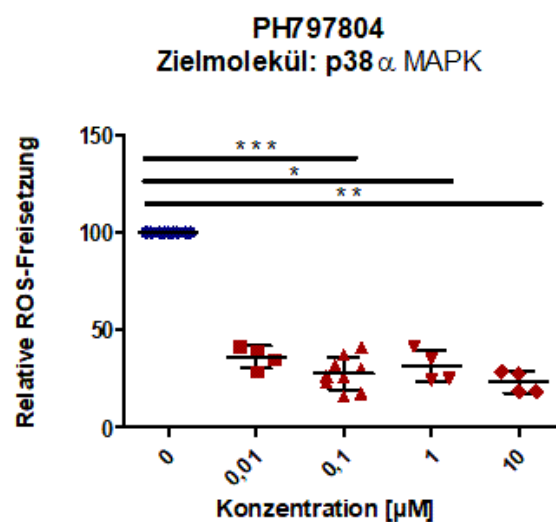
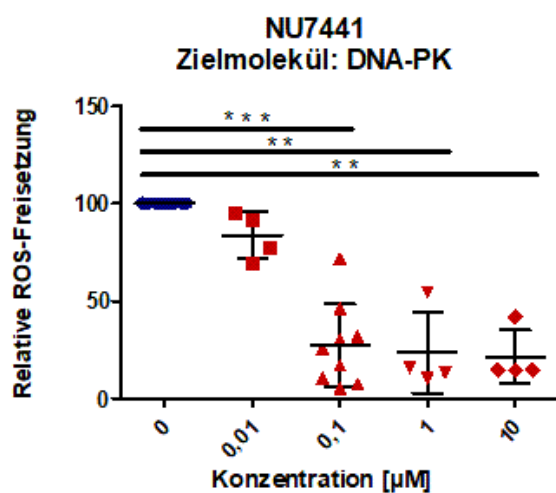
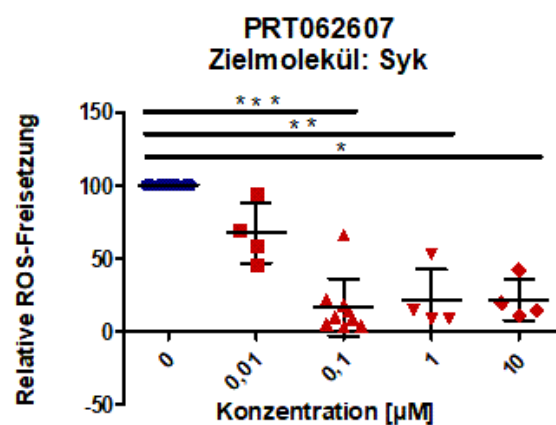
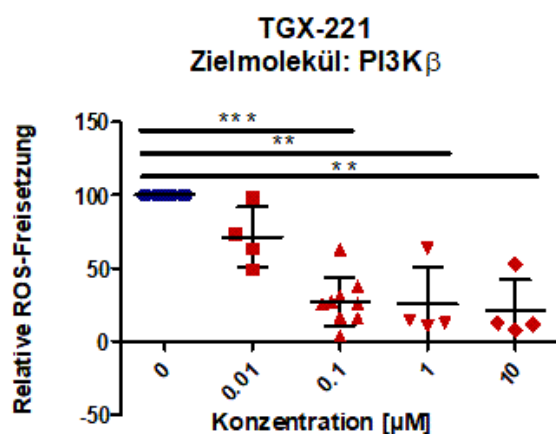
3 Ergebnisse

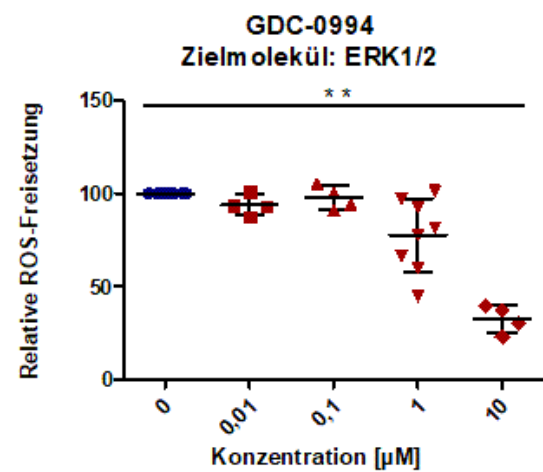
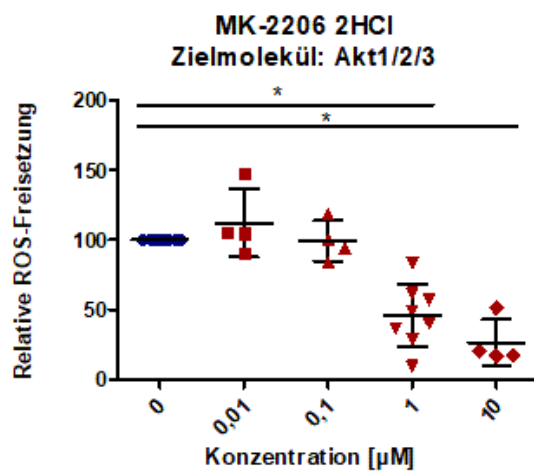
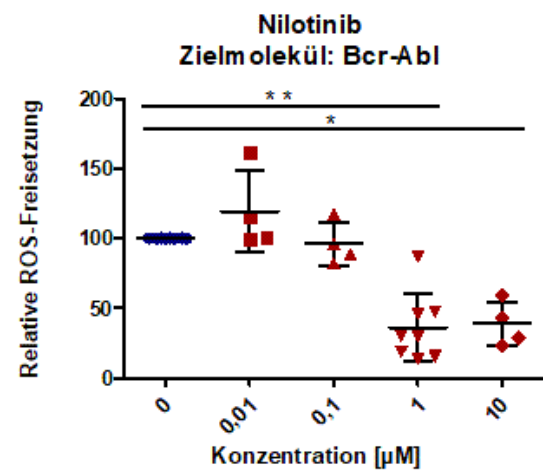
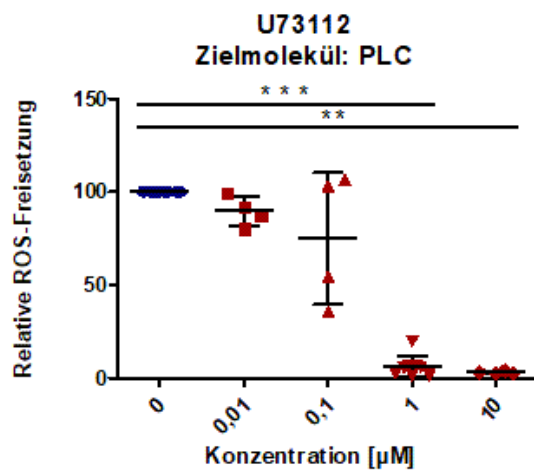
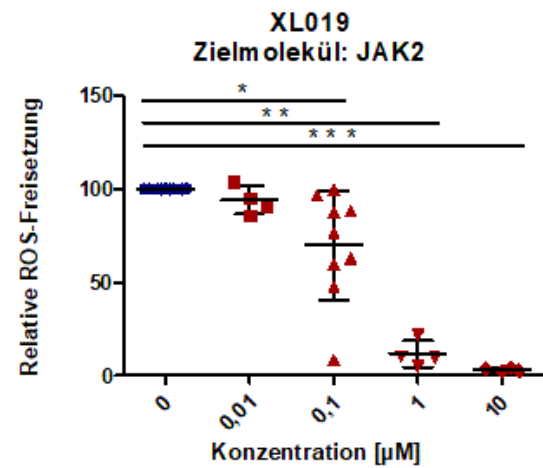
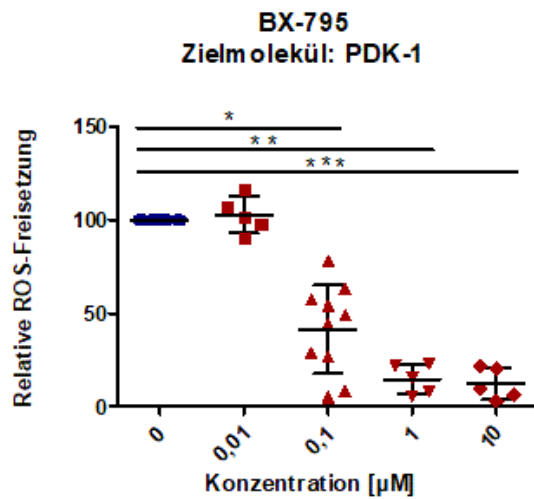
3.1 Beeinflussung der ROS-Freisetzung aktivierter neutrophiler Granulozyten von Substanzen mit Einfluss auf intrazelluläre Signalwege *in vitro*

Thema dieser Arbeit ist die Einflussnahme ausgewählter Substanzen auf die ROS-Freisetzung Immunkomplex-aktivierter neutrophiler Granulozyten und die damit einhergehende Verbesserung oder Aggravation der Symptome von EBA bei lokal induzierter Erkrankung im Mausmodell. Die Substanzen wiesen einen in der Literatur beschriebenen oder in unserer Arbeitsgruppe aus der Target spezifischen Library gescreeenten, aber noch nicht als Daten veröffentlichten, blockierenden Effekt auf Kinasen und Moleküle innerhalb der Signalkaskaden neutrophiler Granulozyten auf (STIs)^{23;55;121;137;233;234}. Die Menge freigesetzter ROS aus stimulierten Neutrophilen sollte durch Zugabe der STIs beeinflusst, im besten Falle reduziert werden.

Für die *in vitro* Experimente zur ROS-Freisetzung wurden neutrophile Granulozyten aus Vollblut von jeweils vier bis neun gesunden Spendern gewonnen und mit Immunkomplexen aus hCOL7- und anti-hCOL7-IgG stimuliert. Als Negativkontrollen wurden die Neutrophilen lediglich mit dem Antigen oder dem AK inkubiert. Als Positivkontrolle diente die Aktivierung der Neutrophilen mit PMA oder den Immunkomplexen selbst. Die Kontrolle der Neutrophilenstimulation wurde bereits im Material- und Methodenteil dargestellt (s. Kap. 2.2.5, Abb. 2.4).

Um die Wirkung der STIs auf die ROS-Freisetzung der aktivierten Neutrophilen zu ermitteln, wurden sie in jeweils vier Konzentrationen (10 μM , 1 μM , 0,1 μM , 0,01 μM) zu den Ansätzen zugefügt und anhand des Lösungsmittelansatzes normalisiert. Das heißt, dass die Wells, in denen die Immunkomplexe mit dem jeweiligen Lösungsmittel und den Neutrophilen inkubiert wurden, als Referenzwert im Sinne einer relativen ROS-Freisetzung von 100, gemessen mit Hilfe des Chemilumineszenzeffekts von Luminol, gelten. Auf diese Weise kann die Medikamentenwirkung unabhängig von einem eventuellen Einfluss des Lösungsmittels auf die ROS-Freisetzung bewertet werden. Die folgenden Abbildungen (s. Abb. 3.1, 3.2 und 3.3) geben einen Überblick über die Ergebnisse des ROS-Freisetzungsversuchs.





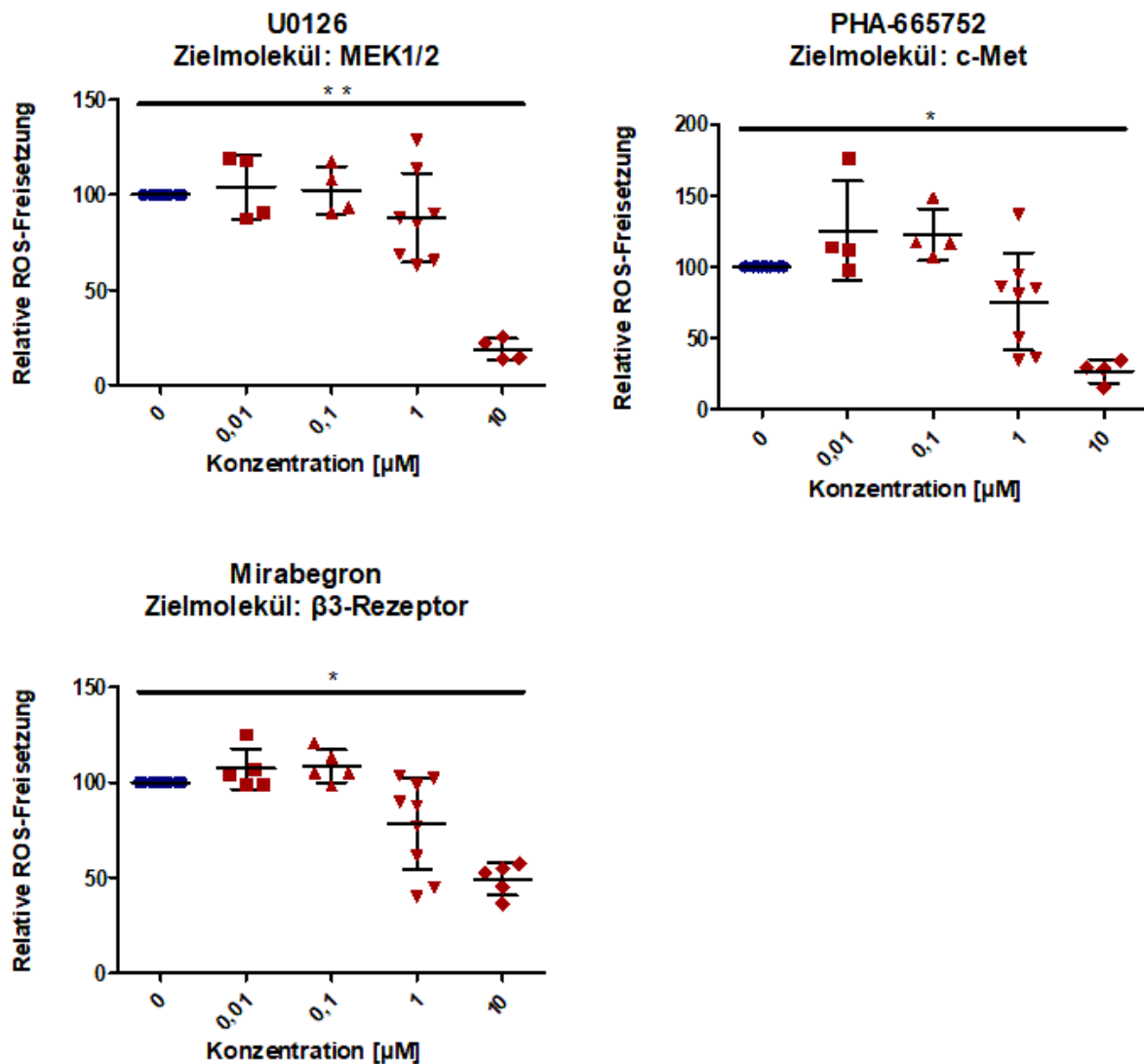


Abbildung 3.1 Relative ROS-Freisetzung im Freisetzungsversuch - hemmende STI

Neutrophile Granulozyten wurden mit hCOL7-anti-hCOL7-IgG1-Immunkomplexen stimuliert. Die Ansätze enthielten entweder die Testsubstanz (10 μM , 1 μM , 0,1 μM oder 0,01 μM) oder das entsprechende Lösungsmittel. Die Daten der Lösungsmittelansätze wurden als Referenzwert im Sinne einer relativen ROS-Freisetzung von 100 gesetzt und die Ergebnisse der Testsubstanzen anhand dieser Referenzwerte normalisiert. Auf diese Weise konnte die Medikamentenwirkung auf die ROS-Freisetzung unabhängig von einem eventuellen Einfluss des Lösungsmittels bewertet werden. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichung der Versuchsdaten jener Substanzen, die in mindestens einer Konzentration einen statistisch gesehen signifikant hemmenden Effekt auf die ROS-Freisetzung hatten. Auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurde mit dem Kruskal-Wallis Test geprüft (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$), bei $n = 4-9$.

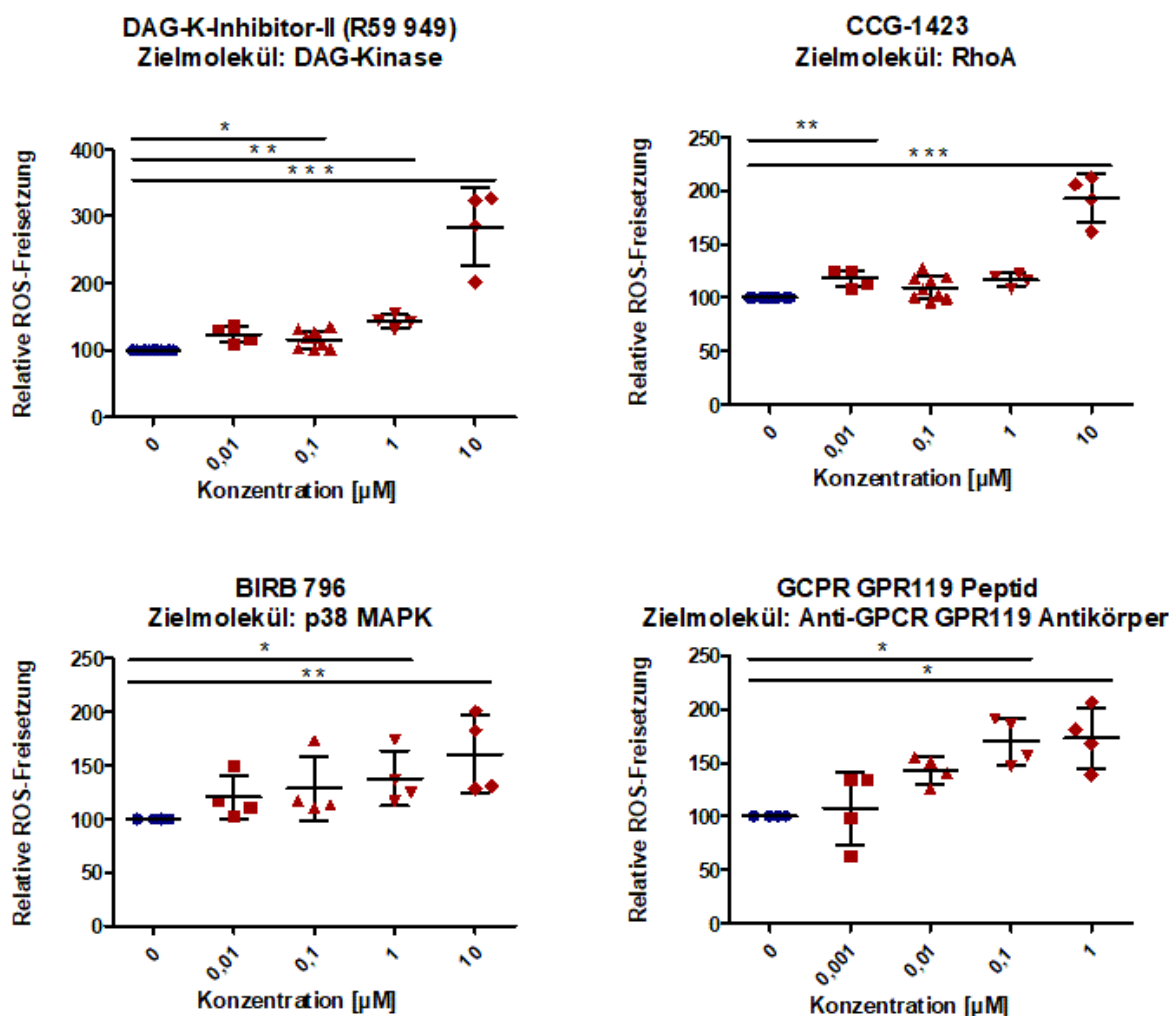
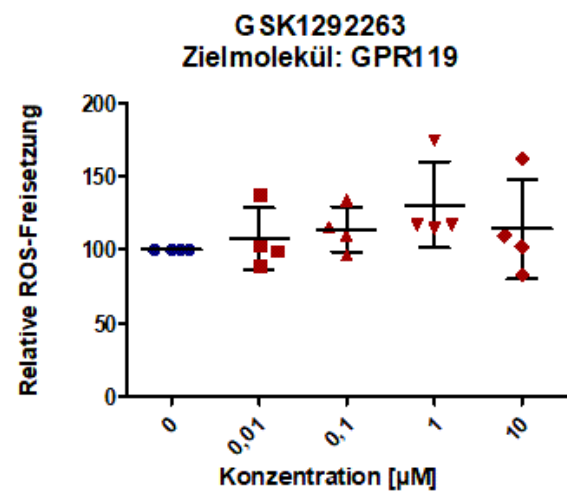
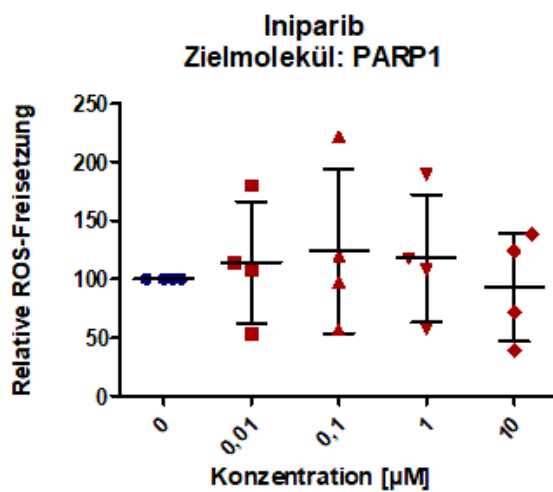
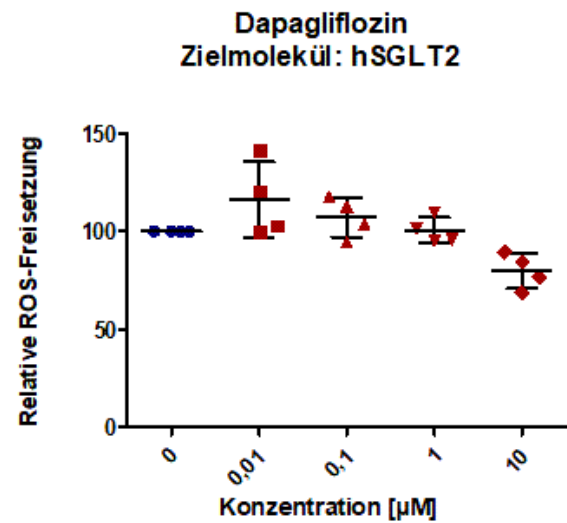
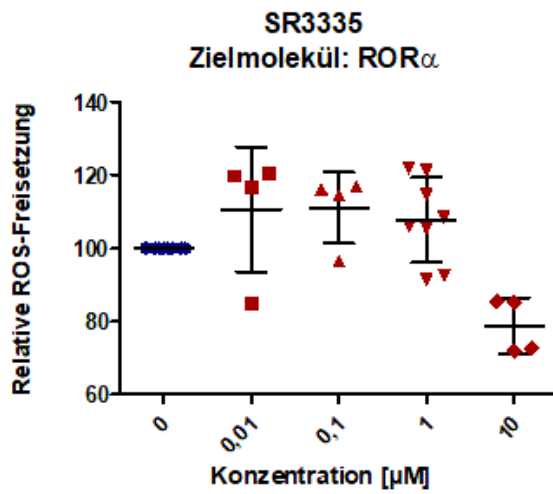
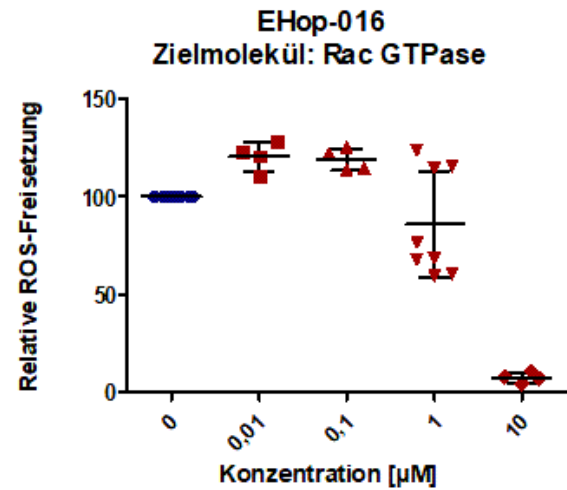
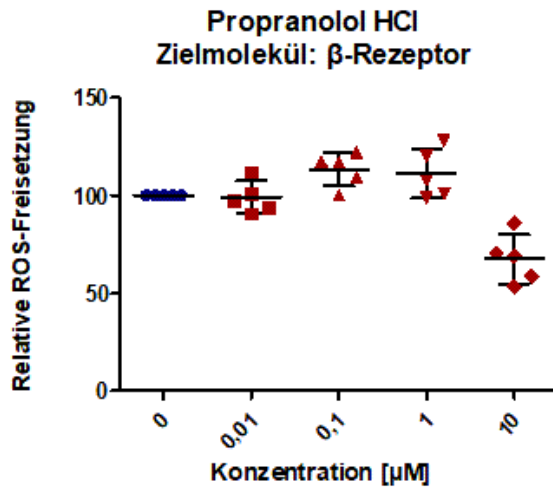
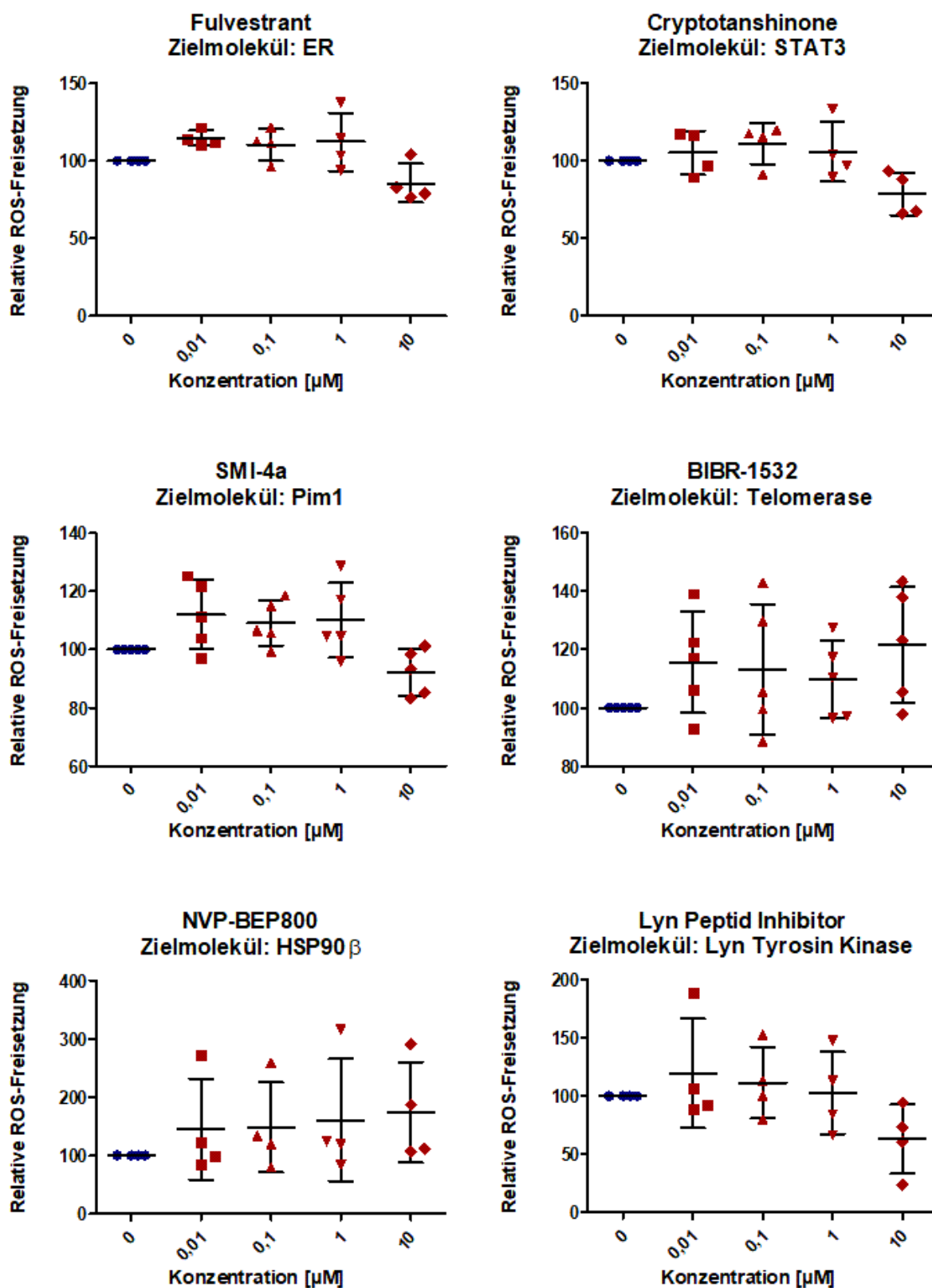


Abbildung 3.2 Relative ROS-Freisetzung im Freisetzungsversuch - aktivierende STI

Neutrophile Granulozyten wurden mit hCOL7-anti-hCOL7-IgG1-Immunkomplexen stimuliert. Die Ansätze enthielten entweder die Testsubstanz ($10 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$, $0,1 \mu\text{M}$ oder $0,01 \mu\text{M}$) oder das entsprechende Lösungsmittel. Die Daten der Lösungsmittelansätze wurden als Referenzwert im Sinne einer relativen ROS-Freisetzung von 100 gesetzt und die Ergebnisse der Testsubstanzen anhand dieser Referenzwerte normalisiert. Auf diese Weise konnte die Medikamentenwirkung auf die ROS-Freisetzung unabhängig von einem eventuellen Einfluss des Lösungsmittels bewertet werden. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichung der Versuchsdaten jener Substanzen, die in mindestens einer Konzentration einen statistisch gesehen signifikant steigernden Effekt auf die ROS-Freisetzung hatten. Auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurde mit dem Kruskal-Wallis Test geprüft (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$), bei $n = 4-9$.





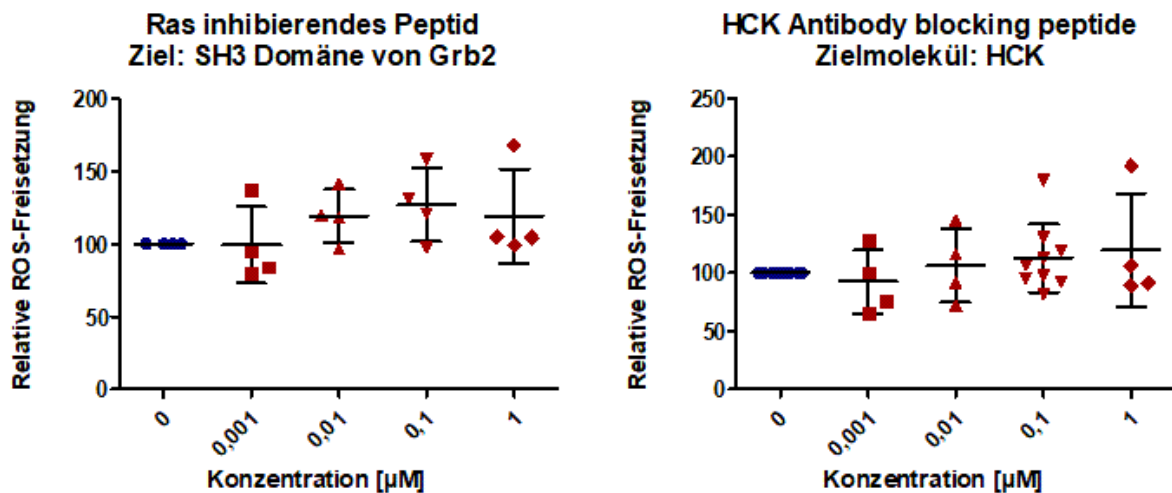


Abbildung 3.3 Relative ROS-Freisetzung im Freisetzungsversuch - wirkungslose STI

Neutrophile Granulozyten wurden mit Immunkomplexen aus hCOL7- und anti-hCOL7-IgG1 stimuliert. Zugewetzt wurde entweder nur das Lösungsmittel (DMSO) als Negativkontrolle oder die Testsubstanz in einer Konzentration von 10 μM , 1 μM , 0,1 μM oder 0,01 μM . Dargestellt sind die Substanzen, die statistisch gesehen keinen signifikanten Effekt auf die ROS-Freisetzung hatten. Es sind jeweils die Mittelwerte der Versuchsdaten mit Standardabweichung abgebildet. Die Ergebnisse der Medikamentenansätze wurden jeweils anhand des Ansatzes mit Lösungsmittel normalisiert. Das heißt, dass die Wells, in denen die Immunkomplexe mit dem jeweiligen Lösungsmittel mit den Neutrophilen inkubiert wurden, als Referenzwert im Sinne einer relativen ROS-Freisetzung von 100, gemessen mit Hilfe des Chemilumineszenzeffekts von Luminol, gelten. Auf diese Weise kann die Medikamentenwirkung unabhängig von einem eventuellen Einfluss des Lösungsmittels auf die ROS-Freisetzung bewertet werden. Auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurde mit dem Kruskal-Wallis Test geprüft (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$), bei $n = 4-9$.

Insgesamt wurden in dieser Arbeit 33 Substanzen getestet, von denen 19 einen signifikanten Einfluss in mindestens einer Konzentration aufwiesen. 15 dieser 19 Substanzen reduzierten die Menge an freigesetzten ROS, vier steigerten sie. Die in Abbildung 3.1 dargestellten Substanzen zeigen eine statistisch signifikante Minimierung der ROS-Freisetzung bis zur Konzentration von 0,1 μM . Zu diesen Medikamenten gehören **TGX-221**, welches die PI3-Kinase β blockiert, **PRT062607** mit Blockade der SYK-Tyrosinkinase, **NU7441**, das die DNA-abhängige Protein Kinase inhibiert, **PH797804** durch Hemmung der p38 α MAP-Kinase, **Sotrastaurin**, welches die PKC als Zielmolekül hat, **IC-87114** mit Blockade der PI3-Kinase, **BX-795** durch Hemmung der PDK1 und **XL019**, das die JAK2 blockiert. Die drei Substanzen **U73122** mit Inhibierung der PLC, **Nilotinib**, das als Zielmolekül Bcr-Abl hat und **MK-2206 2HCl**, welches AKT1/2/3 hemmt, führen bei Konzentrationen bis 1 μM zur Reduzierung der ROS-Freisetzung. **GDC-0994** führt durch Blockade von ERK1/2, ebenso wie **U0126** mit Blockade der MEK1/2, **PHA-665752**, welches als Zielmolekül c-Met inhibiert und **Mirabegron**, das den β_3 -Rezeptor blockiert, bei einer Konzentration von 10 μM zu einer verringerten ROS-Freisetzung. Der

DAG-Kinase-Inhibitor II inhibiert, wie der Name sagt, die DAG-Kinase. **CCG-1423** hemmt RhoA, **BIRB 796** hemmt p38 MAPK und das **GPCR GPR119 Peptid** blockiert einen Anti-GPCR GPR119 AK. Diese Substanzen haben anstatt eines hemmenden, einen steigernden Effekt auf die ROS-Freisetzung aus stimulierten Neutrophilen und sind in Abbildung 3.2 dargestellt. In Abbildung 3.3 sind Substanzen gezeigt, die keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die ROS-Freisetzung stimulierter Neutrophiler hatten. Zu ihnen gehören folgende Medikamente: **Propranolol** mit dem Ziel den β -Rezeptor zu blockieren, **EHop-016**, das die Rac-GTPase inhibiert, **SR3335** mit Blockade von ROR α , **Dapagliflozin**, welches zur Blockade von hSGLT2 (Natrium-abhängiger Glukosetransporter) führt, **Iniparib** mit Hemmung von PARP1 (Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1), **GSK1292263**, das GPR119 (G-Protein-gekoppelter Rezeptor 119) inhibiert, **Fulvestrant** mit dem Ziel den ER (Östrogen-Rezeptor) zu blockieren, **Cryptotanshinone**, welches Zielmolekül STAT3 besitzt, **SMI-41** mit Blockade von Pim1 (Proto-Onkogen Serin/Threonin-Protein Kinase), **BIBR-1532**, welches die Telomerase hemmt, **NVP-BEP800**, welches HSP90 β inhibiert, **Lyn Peptid Inhibitor**, der die Lyn Tyrosin Kinase blockiert, das **Ras inhibierende Peptid** mit der SH3 Domäne von Grb2 als Zielmolekül und das **HCK-AK blockierende Peptid**, das, wie der Name sagt, HCK blockiert.

3.2 Untersuchung der *in vitro* wirksamen Medikamente im lokalen Modell der AK-transfer-induzierten EBA in Mäusen

Die *in vitro* Versuche (s. Abb. 3.1, 3.2 und 3.3) zeigten bei 15 von 33 Substanzen einen deutlichen Rückgang der ROS-Freisetzung durch die mit Immunkomplexen stimulierten neutrophilen Granulozyten. *In vitro* Versuche im Allgemeinen eignen sich sehr gut, um die Funktion und Reaktion der einzelnen Zellen in einer isolierten Umgebung zu untersuchen. Allerdings ist die Schlussfolgerung einer gleichen Wirkung der Substanzen in einem komplexen Organismus, wie er in der Maus oder im Menschen vorliegt, nicht zulässig^{235;236}. Im Organismus kann die einzelne Zelle nicht für sich allein betrachtet werden, da sie in ständiger Wechselwirkung mit anderen Zellen, benachbarten Strukturen, Geweben und freigesetzten Mediatoren steht, die im *in vitro* Experiment nicht berücksichtigt werden. Außerdem stellt die Bioverfügbarkeit des Medikaments eine zentrale Bedingung für seine Wirksamkeit *in vivo* dar, die bei den *in vitro* Experimenten von geringerer Bedeutung ist^{236;237}. Für die *in vivo* Versuche wurden elf der im *in vitro* Vorversuch wirksamen Medikamente ausgewählt, die sich in Trägersubstanzen, in der Literatur angegeben, für Tierversuche lösen ließen. In einem prophylaktischen Behandlungsansatz wurden die Wirkstoffe im lokal induzierten Modell der EBA, d.h. durch AK-Injektion in die Ohrbasis, an Wildtyp Mäusen des Stammes C57BL/J6 getestet. Die Ohrdicke sowie die von Entzündung betroffenen Ohrflächen wurden im Verlauf des Versuchs als Parameter für

die klinische Symptomatik herangezogen.

Die AK-Injektion führt über schnelle Bindung der AK an die DEJ²³ zu einer entzündlichen Reaktion, die dosisabhängig innerhalb der ersten 24-72 Stunden mit Schwellung, Rötung und Blasenbildung^{23;80} im Bereich der Injektionsstelle einhergeht. Neutrophile, die zu den ersten Zellen gehören, die auf einen Entzündungs- oder Infektionsreiz hin aus der Blutbahn in das betroffene Gewebe auswandern,⁵ setzen aufgrund ihrer Aktivierung durch die an der DEJ abgelagerten Immunkomplexe u.a. Proteasen und ROS frei, welche zur Zerstörung des Gewebes im Sinne einer Erythem- und Blasenbildung führen^{11;23;238}.

Im Folgenden werden die Medikamente und ihr Einfluss auf die Entstehung bzw. die Ausprägung der Symptomatik im Einzelnen dargestellt.

3.2.1 Positive Effekte von GDC-0941 im lokalen Modell der EBA

GDC-0941 wurde für den *in vivo* Versuch aufgrund der besseren Löslichkeit anstelle von TGX-221 eingesetzt. Die Ergebnisse der *in vitro* Wirksamkeit von TGX-221 durch Blockade der PI3K β ²³⁹ sind in Abbildung 3.1 dargestellt. Bei GDC-0941 handelt es sich um einen Hemmstoff insbesondere der Untereinheiten α und δ der PI3-Kinase (IC_{50} 3 nM)¹⁵⁷. GDC-0941 wurde den Tieren dreimal täglich p.o. jeweils mit einer Dosis von 40 mg/kg KG verabreicht¹⁵⁷.

Die Behandlung mit dem Medikament GDC-0941 führte zu einem deutlichen Unterschied der Symptomatik zwischen Interventions- und Kontrollgruppe (s. Abb. 3.4). Bereits am ersten Tag nach Antikörperinjektion war bei den behandelten Tieren eine deutlich geringere Schwellung der Ohren ($p < 0,001$) im Vergleich zur Kontrollgruppe festzustellen, und auch am zweiten Tag setzte sich diese Beobachtung fort ($p < 0,05$). Daneben unterschied sich auch die klinisch sichtbare Ausprägung der Entzündung beider Gruppen. Während die Ohren der Kontrolltiere deutliche Rötungen und teilweise Verkrustungen aufwiesen, die knapp 40% der Ohrfläche betrafen, konnte bei den behandelten Tieren annähernd keine Läsion, Schwellung oder Rötung festgestellt werden.

Die Unterschiede ließen sich auch in der histologischen Auswertung der Gewebeproben bezüglich der Zelleinwanderung, der Verdickung der Epidermis und der Bildung von Blasen, Spalten oder Krusten erkennen ($p < 0,01$). In der Kontrollgruppe kam es zu einer deutlichen Einwanderung von Entzündungszellen in die Dermis und Epidermis und damit zu einer Verdickung der Epidermis. Die Epidermis, die normalerweise mit der Dermis über COL7 verbunden ist, hat sich durch die gegen die Verankerungen gerichteten AK und die damit einhergehende Entzündungsreaktion von der Dermis abgelöst. Im Gegensatz dazu ist bei den Gewebeschnitten der Behandlungsgruppe keine nennenswerte Einwanderung von Zellen in das Gewebe feststellbar, sodass die Epidermis überall gleichmäßig dünn erscheint.

Um eine möglicherweise fehlende Bindung des injizierten IgG-AK gegen mCOL7 mit der Folge einer geringer ausgeprägten Klinik auszuschließen, wurde die Bindung an der DEJ mit Hilfe

der DIF kontrolliert. Abbildung 3.4 zeigt die positive Bindung des IgG-AK durch die fluoreszierende Linie an der DEJ an. Die Zellen bzw. deren Kerne wurden mit Hilfe der DAPI-Färbung blau dargestellt, sodass die unterschiedlich starke Zelleinwanderung beurteilt werden konnte. In der DIF wurde ebenfalls die Aktivierung des Komplementsystems analysiert, die sich durch die Ablagerung der löslichen C3-Komponente darstellen lässt. Die Ergebnisse dieser Analyse waren etwas schwieriger zu beurteilen, da es anders als bei der IgG- Fluoreszenzfärbung zu einer stärkeren Hintergrundfärbung kam. In den repräsentativen Ausschnitten der Proben ist die Ablagerung des C3-Komplements an der DEJ jedoch in beiden Gruppen gut erkennbar, und auch hier ist die Epidermis der Kontrollgruppe durch eingewanderte Zellen deutlich dicker im Vergleich zur Behandlungsgruppe.

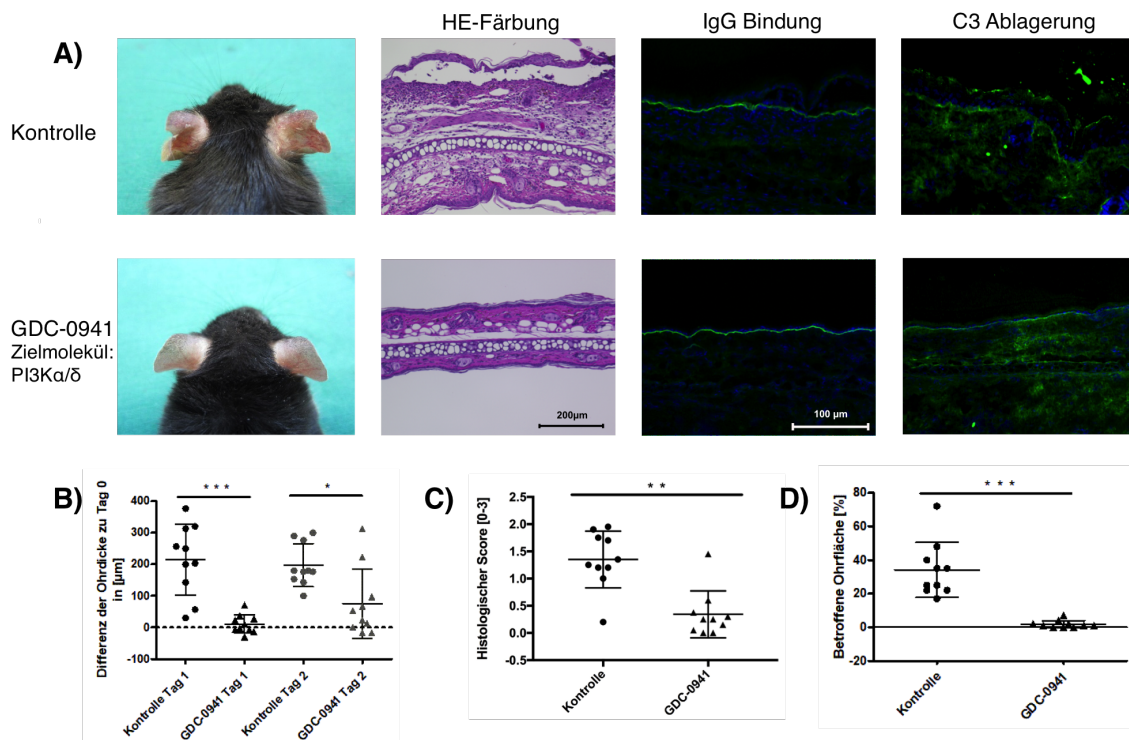


Abbildung 3.4 Lokale EBA in GDC-0941- und Lösungsmittel-behandelten Mäusen

C57BL/6-Wildtyp-Mäuse wurden p.o. mit GDC-0941, einem Inhibitor von PI3K α/δ , oder dem Lösungsmittel ab Tag -2 behandelt. An Tag 0 erfolgte die Injektion des anti-mCOL7-IgG-AK in die Ohrbasis und an Tag 0, 1 und 2 wurde die Ohrdicke als klinischer Parameter einer Entzündungsreaktion erfasst. An Tag 2 erfolgte die Untersuchung der Ohren hinsichtlich klinischer Symptome der EBA, wie Hautrötung, Blasen- und Krustenbildung. Neben Referenzabbildungen der HE-gefärbten Gewebshistologien (Maßstab = 200 μ m) sind fluoreszenzgefärbte Gefrierschnitte zur Kontrolle der Bindung des IgG-AK und der Ablagerung von C3-Komplement (Maßstab = 100 μ m) dargestellt (A). Klinische Parameter (Schwellung der Ohren und prozentualer Befall der Ohren mit Symptomen der EBA) wurden erfasst und mit dem Mann-Whitney Test statistisch ausgewertet (B, D). Die Veränderungen des Gewebes wurden anhand der HE-gefärbten Proben mithilfe einer Bewertungsskala, die die Zelleinwanderung in das Gewebe, die Verdickung der Epidermis und die Bildung von Blasen, Spalten und Krusten einbezieht, analysiert (C) und ebenfalls mit dem Mann-Whitney Test auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen und signifikante Unterschiede mit Sternen markiert (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Klinische Symptome einer Entzündung im Sinne einer Hautrötung oder Krustenbildung sind bei den Kontrolltieren im Gegensatz zu den behandelten Tieren deutlich stärker ausgeprägt. Die von EBA-Symptomen betroffene Oberfläche der Ohren liegt mit 40% bei der Kontrollgruppe ebenfalls signifikant höher als bei den behandelten Tieren mit etwa 5% ($p < 0,001$)(D). Auch der zur klinischen Beurteilung herangezogene Parameter der Ohrdicke unterscheidet sich mit einer statistisch signifikant stärkeren Ohrschwellung in der Kontrollgruppe von der Behandlungsgruppe (Tag 1: $p < 0,001$; Tag 2 $p < 0,05$) (B). Bei der Auswertung der HE-gefärbten Gewebeproben lässt sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen feststellen: Veränderungen des Gewebes, wie die Einwanderung von Neutrophilen in die Dermis oder Blasenbildung durch Abspaltung der Epidermis, sind lediglich bei der Kontrollgruppe deutlich sichtbar ($p < 0,01$)(C). In der DIF zeigte sich bei beiden Gruppen eine erfolgreiche Bindung des AK anti-mCOL7-IgG sowie eine Ablagerung des C3-Komplements an der DEJ (A).

3.2.2 Effekte von Sotrastaurin im lokalen Modell der EBA am zweiten Tag nach Injektion sichtbar

Bei Sotrastaurin handelt es sich um einen Inhibitor aller Untereinheiten der PKC (Pan-PKC-Inhibitor; θ -, β -, α - und δ -Untereinheit (IC_{50} 0,22/0,64/9,5/2,1 nM))¹⁴¹. Die PKC liegt im Signaltransduktionsweg relativ weit oben¹²¹, und die Blockade durch Sotrastaurin erzielte in den *in vitro* Experimenten eine statistisch signifikante Reduktion der ROS-Freisetzung (s. Abb. 3.1). Für das lokale Modell der EBA wurden die Mäuse mit je 30 mg/kg KG dreimal täglich p.o. behandelt²⁴⁰.

Sotrastaurin wird als oral gut verträgliches Medikament eingestuft^{153;154}. Zwei der fünf Mäuse wirkten allerdings krank, schwach, mit mattem Fell. Untersuchungen in geringerer Konzentration und Dosierung, mit anderen Lösungsmitteln oder in topischer Anwendung bringen eventuell bessere Verträglichkeiten mit sich.

Es ließen sich Unterschiede in den in Abbildung 3.5 dargestellten Ergebnissen zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe verzeichnen, statistisch signifikante Unterschiede v.a. die Ohrdicke betreffend. An Tag 2 waren die Ohren der Kontrolltiere im Vergleich zur Behandlungsgruppe stärker geschwollen ($p < 0,01$). Die Ohren der Kontrolltiere zeigten allerdings weder flächenmäßig stärker ausgeprägte Symptome der EBA noch ließ die Auswertung der HE-gefärbten Gewebeschnitte einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe erkennen. Die DIF Färbungen weisen auf die erfolgreiche Bindung des intradermal in die Ohrbasis der Mäuse beider Gruppen injizierten anti-mCOL7-IgG-AK hin. Der grüne Fluoreszenzfarbstoff markiert die im Gewebe an der DEJ immobilisierten AK gegen mCOL7. Die Ablagerung von C3-Komplement hat ebenfalls bei Kontroll- und Behandlungsgruppe stattgefunden, was die Abbildung der DIF erkennen lässt (s. Abb. 3.5).

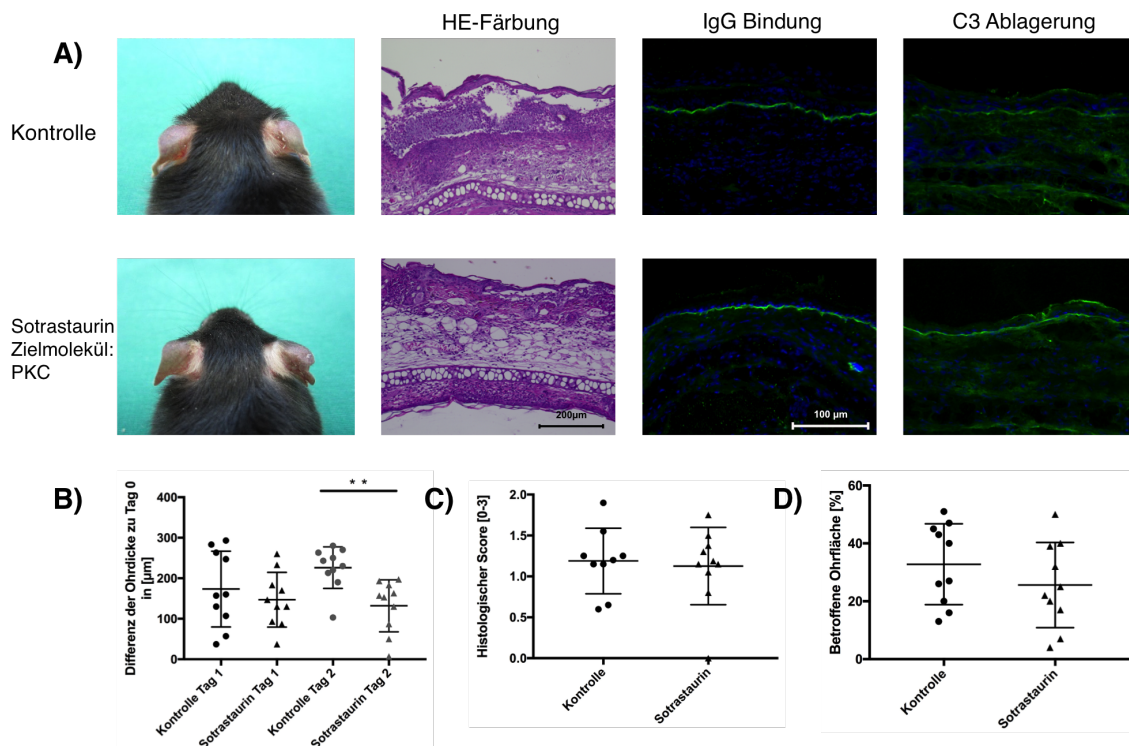


Abbildung 3.5 Lokale EBA in Sotrastaurin- und Lösungsmittel-behandelten Mäusen

Dargestellt sind die Ergebnisse der *in vivo* Versuche mit dem PKC-Inhibitor Sotrastaurin. C57BL/6-Wildtyp-Mäuse wurden p.o. mit Sotrastaurin oder dem Lösungsmittel ab Tag -2 behandelt, an Tag 0 erfolgte die Injektion des anti-mCOL7-IgG-AK in die Ohrbasis und an Tag 0, 1 und 2 wurde die Ohrdicke als klinischer Parameter einer Entzündungsreaktion erfasst. An Tag 2 erfolgte die Untersuchung der Ohren hinsichtlich klinischer Symptome der EBA, wie Hautrötung, Blasen- und Krustenbildung. Neben Referenzabbildungen der HE-gefärbten Gewebshistologien (Maßstab = 200 µm) sind fluoreszenzgefärbte Gefrierschnitte zur Kontrolle der Bindung des IgG-AK und der Ablagerung von C3-Komplement (Maßstab = 100 µm) dargestellt (A). Klinische Parameter (Schwellung der Ohren und prozentualer Befall der Ohren mit Symptomen der EBA) wurden erfasst und mit dem Mann-Whitney Test statistisch ausgewertet (B, D). Die Veränderungen des Gewebes wurden anhand der HE-gefärbten Proben mithilfe einer Bewertungsskala, die die Zelleinwanderung in das Gewebe, die Verdickung der Epidermis und die Bildung von Blasen, Spalten und Krusten einbezieht, analysiert (C) und ebenfalls mit dem Mann-Whitney Test auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede wurden mit Sternen markiert (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Das klinische Bild der EBA unterscheidet sich nicht wesentlich zwischen Kontroll- und Interventionsgruppe (D). Allerdings kann bei den mit Sotrastaurin behandelten Tieren ein statistisch signifikant geringerer Anstieg der Ohrdicke am zweiten Tag nach der AK-Injektion festgestellt werden ($p < 0,01$) (B). Histologisch sind sowohl in der Kontroll- als auch in der Behandlungsgruppe Zelleinwanderungen und Spaltbildungen zu erkennen (C). Die Bindung des anti-mCOL7-IgG-AK sowie die Ablagerung des C3-Komplements an der DEJ war bei beiden Gruppen identisch (A).

3.2.3 Abnahme der Ohrschwellung und histologisch geringere Entzündungszeichen bei Behandlung mit PHA-665752 im lokalen Modell der EBA

PHA-665752 inhibiert den Tyrosin-Kinase-Rezeptor c-Met in einem zellfreien Versuchsaufbau mit einem IC_{50} -Wert von 9 nM¹⁸⁷. Bei dem *in vitro* ROS-Freisetzungsversuch war eine signifikante Reduktion der ROS-Freisetzung nur bei Zugabe der Substanz in der höchsten Konzentration von 10 μ M zu beobachten (s. Abb. 3.1). Für den *in vivo* Versuch wurden die Mäuse einmal täglich i.p. mit PHA-665752 in einer Dosierung von 30 mg/kg KG¹⁸⁷ bzw. mit der Trägersubstanz behandelt. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abbildung 3.6 dargestellt.

Die Ohren der Kontrolltiere waren im Gegensatz zu denen der PHA-665752-behandelten Tiere von einer deutlicheren Rötung betroffen. An Tag 1 nach intradermaler AK-Injektion war bereits die Tendenz eines stärkeren Anschwellens der Ohren in der Kontrollgruppe zu sehen. Der Unterschied der Ohrdicke verglichen zu Tag 0 wurde zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe am zweiten Tag statistisch hochsignifikant ($p < 0,001$).

Die Verdickung der Ohren konnte in der histologischen Auswertung der Schnitte in HE Färbung ebenfalls nachvollzogen werden. Während es bei den Kontrolltieren zu einer starken Einwanderung von Neutrophilen in die Dermis und zu einer eindeutigen Verdickung der Epidermis im Sinne einer mehrschichtig statt einschichtig aufgebauten Epidermis kam, wanderten bei den behandelten Mäusen weniger Zellen ein und die Epidermis blieb verhältnismäßig dünn. Im repräsentativen Bild der HE gefärbten Schnitte ist bei der Kontrollgruppe außerdem die Abspaltung der Epidermis von der Dermis mit Krustenbildung erkennbar.

Die DIF Färbungen lassen sowohl bei den behandelten als auch bei den Kontrolltieren eine erfolgreiche Bindung des AK an der DEJ sowie die Ablagerung von C3-Komplement erkennen (s. Abb. 3.6).

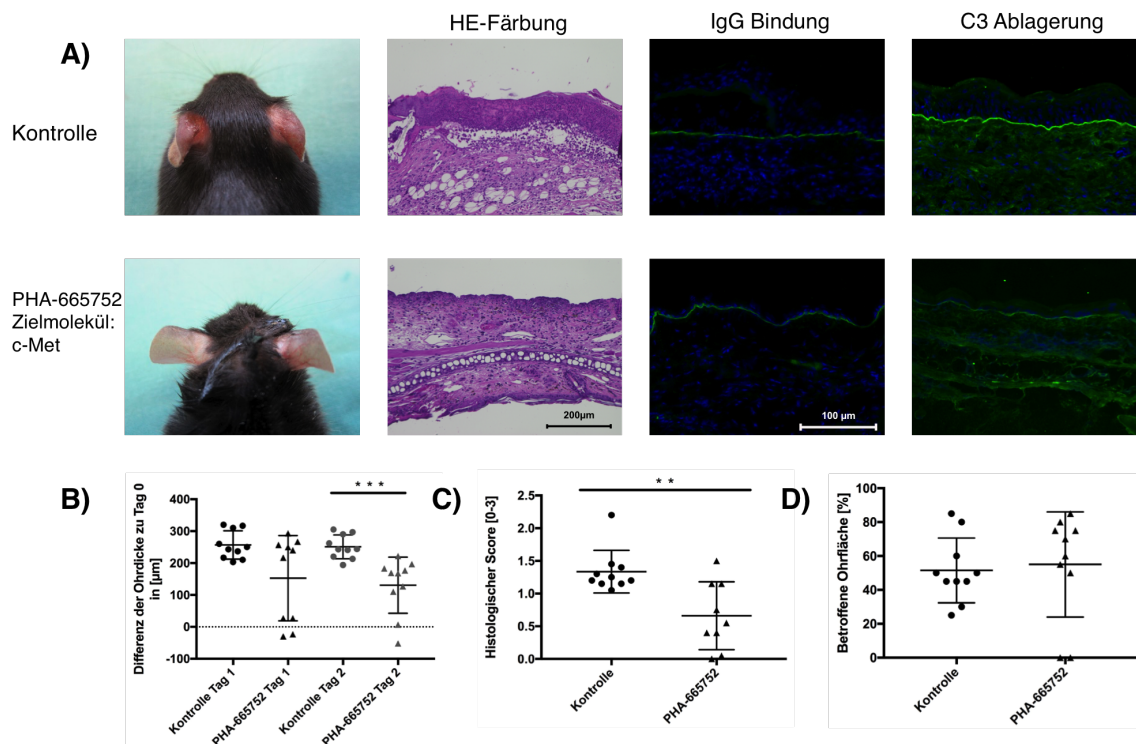


Abbildung 3.6 Lokale EBA in PHA-665752- und Lösungsmittel-behandelten Mäusen

C57BL/6-Wildtyp-Mäuse wurden p.o. mit dem c-Met-Inhibitor PHA-665752 oder dem Lösungsmittel ab Tag -2 behandelt, an Tag 0 erfolgte die Injektion des anti-mCOL7-IgG-AK in die Ohrbasis und an Tag 0, 1 und 2 wurde die Ohrdicke als klinischer Parameter einer Entzündungsreaktion erfasst. An Tag 2 erfolgte die Untersuchung der Ohren hinsichtlich klinischer Symptome der EBA, wie Hautrötung, Blasen- und Krustenbildung. Neben Referenzabbildungen der HE-gefärbten Gewebshistologien (Maßstab = 200 µm) sind fluoreszenzgefärbte Gefrierschnitte zur Kontrolle der Bindung des IgG-AK und der Ablagerung von C3-Komplement (Maßstab = 100 µm) dargestellt (A). Klinische Parameter (Schwellung der Ohren und prozentualer Befall der Ohren mit Symptomen der EBA) wurden erfasst und mit dem Mann-Whitney Test statistisch ausgewertet (B, D). Die Veränderungen des Gewebes wurden anhand der HE-gefärbten Proben mithilfe einer Bewertungsskala, die die Zelleinwanderung in das Gewebe, die Verdickung der Epidermis und die Bildung von Blasen, Spalten und Krusten einbezieht, analysiert (C) und ebenfalls mit dem Mann-Whitney Test auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen und signifikante Unterschiede mit Sternen markiert (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Neben einer stärkeren Rötung der Ohren ist bei den HE-gefärbten Gewebeproben der Kontrolltiere eine deutlich verdickte Epidermis sowie eine beginnende Spaltbildung an der DEJ sichtbar, was sich in der statistischen Auswertung der Histologien widerspiegelt ($p < 0,01$) (C). Die Auswertung der klinisch erfassten Parameter zeigte ein deutlich stärkeres Anschwellen der Ohren in der Kontrollgruppe ($p < 0,001$) (B). Der Anteil der Oberfläche, der von sichtbaren Symptomen der EBA, wie Rötung oder Verkrustung betroffen war, unterschied sich in beiden Gruppen statistisch nicht signifikant voneinander (D).

3.2.4 Geringere Symptomausprägung bei Behandlung mit NU7441 im lokalen Modell der EBA

In einem zellfreien Versuchsansatz kann durch Zugabe von NU7441 die DNA-PK mit einem IC_{50} -Wert von 14 nM, in Konzentrationen ab 5 μ M kann auch die PI3K inhibiert werden¹⁹³.

Bei dem *in vitro* Versuch zur ROS-Freisetzung zeigte sich bei Zugabe der Substanz in allen vier Konzentrationen eine signifikante Reduktion der ROS-Freisetzung (s. Abb. 3.1). Die Mäuse wurden im *in vivo* Versuch ab Tag -2 zweimal täglich i.p. mit dem Medikament (5 mg/kg KG)¹⁹⁴ bzw. mit der entsprechenden Menge des Lösungsmittels behandelt.

Wie man in Abbildung 3.7 sehen kann, waren die Tiere der Kontrollgruppe stärker von der Erkrankung betroffen als die Mäuse der Behandlungsgruppe. Die prozentuale Fläche der Ohren, die in der Kontrollgruppe von Symptomen der EBA (Rötung, Verkrustung) befallen war, war größer als bei den behandelten Tieren ($p < 0,001$). Die als klinischer Parameter der Symptomausprägung herangezogene Verdickung der Ohren war bei den Tieren der Kontrollgruppe statistisch signifikant stärker als die der mit NU7441 behandelten Tiere ($p < 0,01$). Die Auswertung der HE-gefärbten Gewebeschnitte erbrachte keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Krankheitsausprägung. Bei beiden Gruppen kam es z.T. zur Verdickung und Verkrustung der Epidermis durch eingewanderte Entzündungszellen (s. Abb. 3.7).

Die Kontrolle der Bindung der intradermal injizierten AK an die DEJ erfolgte mittels DIF und war bei beiden Gruppen positiv. Bei beiden Gruppen lagerte sich außerdem C3-Komplement an der DEJ ab. Die Mehrschichtung des Epithels ließ sich neben den HE-Schnitten auch bei den DIF-gefärbten Schnitten als blaue Zellkerne oberhalb der grün fluoreszenzmarkierten IgG-AK erkennen.

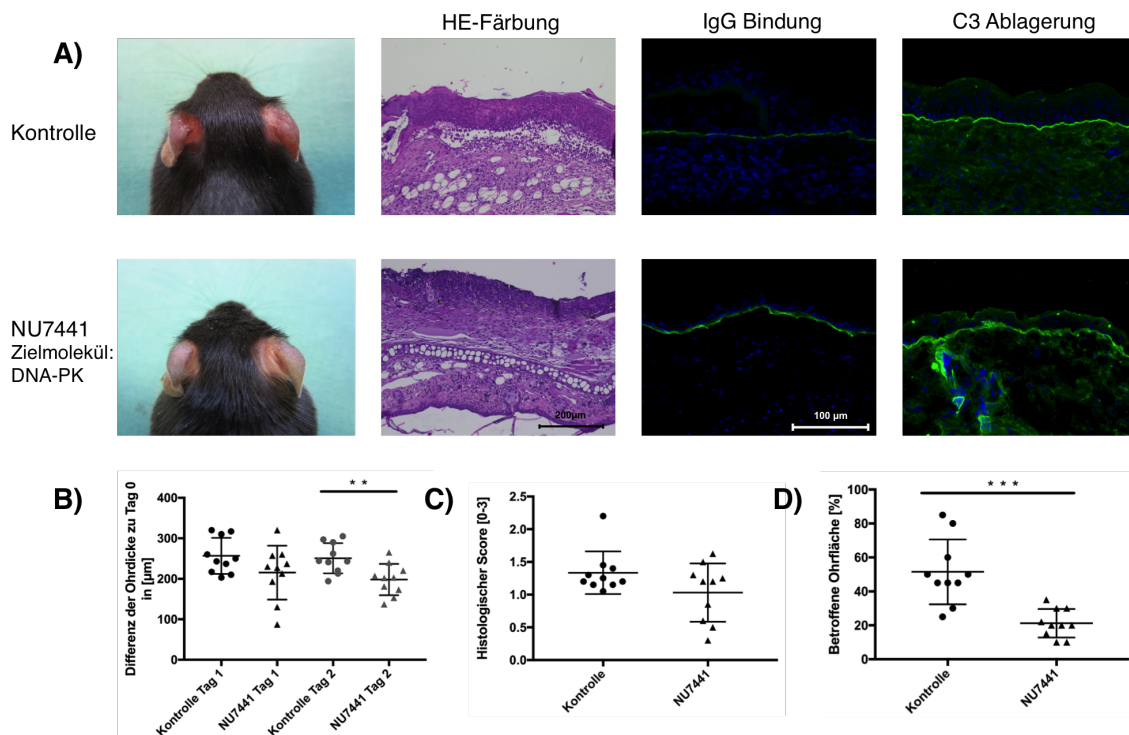


Abbildung 3.7 Lokale EBA in NU7441- und Lösungsmittel-behandelten Mäusen

C57BL/6-Wildtyp-Mäuse wurden i.p. mit dem DNA-PK-Inhibitor NU7441 oder dem Lösungsmittel ab Tag -2 behandelt, an Tag 0 erfolgte die Injektion des anti-mCOL7-IgG-AK in die Ohrbasis und an Tag 0, 1 und 2 wurde die Ohrdicke als klinischer Parameter einer Entzündungsreaktion erfasst. An Tag 2 erfolgte die Untersuchung der Ohren hinsichtlich klinischer Symptome der EBA, wie Hautrötung, Blasen- und Krustenbildung. Neben Referenzabbildungen der HE-gefärbten Gewebshistologien (Maßstab = 200 µm) sind fluoreszenzgefärbte Gefrierschnitte zur Kontrolle der Bindung des IgG-AK und der Ablagerung von C3-Komplement (Maßstab = 100 µm) dargestellt (A). Klinische Parameter (Schwellung der Ohren und prozentualer Befall der Ohren mit Symptomen der EBA) wurden erfasst und mit dem Mann-Whitney Test statistisch ausgewertet (B, D). Die Veränderungen des Gewebes wurden anhand der HE-gefärbten Proben mithilfe einer Bewertungsskala, die die Zelleinwanderung in das Gewebe, die Verdickung der Epidermis und die Bildung von Blasen, Spalten und Krusten einbezieht, analysiert (C) und ebenfalls mit dem Mann-Whitney Test auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen und signifikante Unterschiede mit Sternen markiert (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Während in den HE-gefärbten histologischen Gewebeschnitten sowohl in der Kontroll- als auch in der Behandlungsgruppe eine Verdickung, Verkrustung und teilweise Ablösung der Epidermis sichtbar ist (C), sind klinische Parameter, wie die Verdickung der Ohren ($p < 0,01$) (B) und der prozentual von EBA-Symptomen betroffene Anteil der Ohroberfläche ($p < 0,001$) (D), bei der Kontrollgruppe statistisch signifikant stärker ausgeprägt. Die DIF Färbungen zeigen bei beiden Gruppen sowohl die Bindung der anti-mCOL7-IgG-AK als auch die C3-Ablagerung an der DEJ (A).

3.2.5 Hemmender Effekt von Propranolol HCl auf die Symptomausprägung im lokalen Modell der EBA

Propranolol ist ein nicht selektiver, kompetitiver Inhibitor des β -Adrenorezeptors, der mit einem IC_{50} -Wert von 12 nM wirksam ist¹⁹⁹. In einer ersten statistischen Analyse der *in vitro* Versuche mit Hilfe des One-way ANOVA-Tests ergab sich bei Zugabe von Propranolol in einer Konzentration von 10 μ M statistisch gesehen eine signifikante Reduktion der ROS-Freisetzung ($p < 0,01$). Daraufhin wurden weitere Untersuchungen mit Propranolol durch unsere Arbeitsgruppe durchgeführt. Bisher noch nicht veröffentlichte Daten zeigten ebenfalls eine deutlichen Reduktion der ROS-Freisetzung aus stimulierten Neutrophilen unter Zugabe von Propranolol. In dem von mir durchgeführten *in vivo* Versuch wurden die Mäuse der Behandlungsgruppe ab Tag -2 einmal täglich i.p. mit 4 mg/kg KG Propranolol bzw. einer äquivalenten Menge des Lösungsmittels PBS behandelt^{241;242}.

Bei den Repräsentativbildern der Mäuse in Abbildung 3.8 ist eine stärker ausgeprägte Rötung der Ohren der Kontrolltiere zu erkennen. Die Schwellung der Ohren als klinischer Parameter der Entzündung war bei den mit Propranolol behandelten Tieren vor allem am ersten Tag nach AK-Injektion deutlich geringer ($p < 0,05$). Der Unterschied der von EBA betroffenen Ohrfläche zwischen beiden Gruppen am Tag zwei war zwar statistisch gesehen nicht signifikant, allerdings war bei den mit Propranolol behandelten Tieren im Mittel eine Ohrfläche von 5% betroffen, während bei den Kontrolltieren über 20% der Fläche Entzündungsreaktionen aufwiesen. Die fehlende statistische Signifikanz kommt vermutlich wegen der breiten Streuung bei gleichzeitig kleiner Stichprobengruppe zustande.

Die Auswertung der HE-gefärbten Gewebeschnitte beider Gruppen erbrachte keine signifikant unterschiedlichen Ergebnisse. Sowohl bei der Kontroll- als auch bei der Behandlungsgruppe ist die Epidermis leicht verdickt und eine Einwanderung von Granulozyten feststellbar. In den DIF Färbungen konnte sowohl die Bindung der anti-mCOL7-IgG-AK an die DEJ als auch die C3-Ablagerung nachgewiesen werden (s. Abb. 3.8).

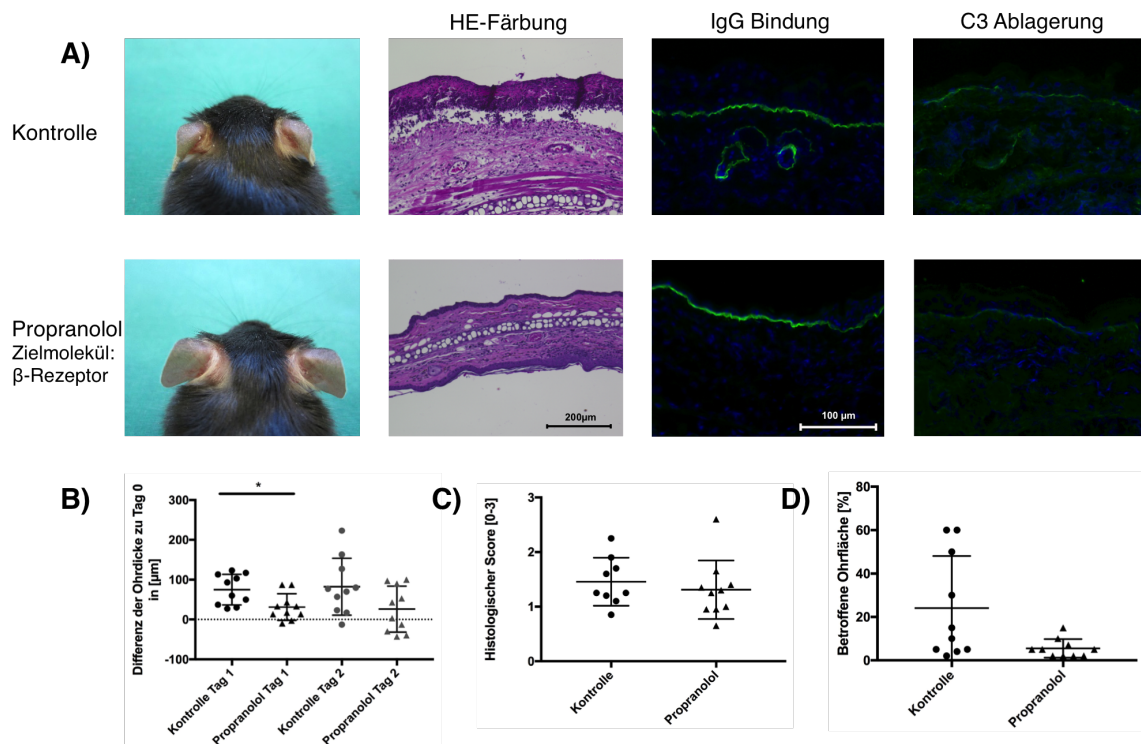


Abbildung 3.8 Lokale EBA in Propranolol HCl- und Lösungsmittel-behandelten Mäusen

C57BL/6-Wildtyp-Mäuse wurden i.p. mit Propranolol, das nicht selektiv den β -Adrenorezeptor blockiert, oder dem Lösungsmittel ab Tag -2 behandelt, an Tag 0 erfolgte die Injektion des anti-mCOL7-IgG-AK in die Ohrbasis und an Tag 0, 1 und 2 wurde die Ohrdicke als klinischer Parameter einer Entzündungsreaktion erfasst. An Tag 2 erfolgte die Untersuchung der Ohren hinsichtlich klinischer Symptome der EBA, wie Hautrötung, Blasen- und Krustenbildung. Neben Referenzabbildungen der HE-gefärbten Gewebshistologien (Maßstab = 200 µm) sind fluoreszenzgefärbte Gefrierschnitte zur Kontrolle der Bindung des IgG-AK und der Ablagerung von C3-Komplement (Maßstab = 100 µm) dargestellt (A). Klinische Parameter (Schwellung der Ohren und prozentualer Befall der Ohren mit Symptomen der EBA) wurden erfasst und mit dem Mann-Whitney Test statistisch ausgewertet (B, D). Die Veränderungen des Gewebes wurden anhand der HE-gefärbten Proben mithilfe einer Bewertungsskala, die die Zelleinwanderung in das Gewebe, die Verdickung der Epidermis und die Bildung von Blasen, Spalten und Krusten einbezieht, analysiert (C) und ebenfalls mit dem Mann-Whitney Test auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen und signifikante Unterschiede mit Sternen markiert (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Die klinischen Parameter zwischen der Kontroll- und der Interventionsgruppe unterschieden sich bis auf die Differenz der Ohrdicke an Tag 1 (B) nicht signifikant voneinander. Die makroskopisch sichtbar betroffene Ohrfläche betrug bei der Kontrollgruppe jedoch im Mittel 20%, während bei der Interventionsgruppe lediglich 5% betroffen waren (D). In der histologischen Analyse zeigten sich ähnlich ausfallende Gewebeveränderungen mit Zelleinwanderung, Verdickung der Epidermis und bei der Kontrollgruppe Spaltbildung (C). Die DIF Färbungen zeigen bei beiden Gruppen sowohl die Bindung der anti-mCOL7-IgG-AK als auch die C3-Ablagerung an der DEJ (A).

3.2.6 Hemmender Effekt von BX-795 auf die Symptomausprägung im lokalen Modell der EBA

In zellfreien Untersuchungen hemmt BX-795 spezifisch die PDK1 mit einer IC_{50} von 6 nM¹⁶⁹. Die Zugabe von BX-795 in den drei höchsten Konzentrationen, 0,1 μ M, 1 μ M und 10 μ M, zu den durch Immunkomplexe aktivierten neutrophilen Granulozyten bewirkte eine signifikante Reduktion der freigesetzten ROS (s. Abb. 3.1). Um die Wirkung des Medikamentes auf die Zellen in einem komplexen Organismus zu untersuchen, wurde es im *in vivo* Versuch den Mäusen der Behandlungsgruppe zweimal täglich in einer Dosierung von 15 mg/kg KG peroral verabreicht¹⁶⁹.

Die klinischen Symptome der EBA, wie Rötung, Verkrustung und Blasenbildung, die sich nach Injektion des anti-mCOL7-IgG-AK ausgebildet haben, zeigten in ihrer flächenhaften Ausbreitung zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe einen deutlichen Unterschied (s. Abb. 3.9). Während in der Kontrollgruppe eine Fläche am Ohr im Mittel von etwa 25% betroffen war, ließen sich an den Ohren der mit BX-795 behandelten Mäuse nur sehr wenige Läsionen finden. Diese Beobachtung ließ sich allerdings nicht durch stärkere Schwellung der Ohren der Kontrolltiere widerspiegeln.

Bei der Analyse der HE gefärbten Gewebeschnitte lag keine stärkere Einwanderung von Entzündungszellen, Verdickung der Epidermis oder Blasenbildung bei der Kontrollgruppe im Vergleich zur Behandlungsgruppe vor. Die Färbungen der Proben mit Hilfe der DIF wiesen die Bindung des intradermal injizierten anti-mCOL7-IgG-AK an das in der DEJ befindliche Antigen COL7 sowie die Ablagerung von C3-Komplement an der DEJ nach (s. Abb 3.9).

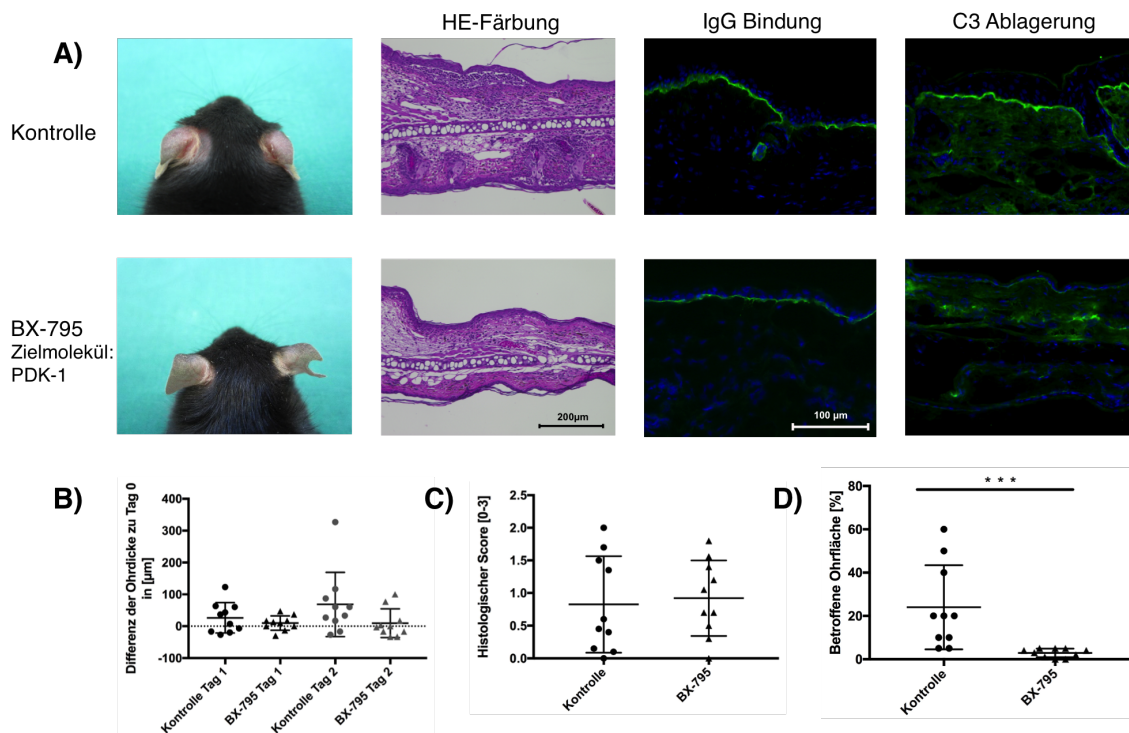


Abbildung 3.9 Lokale EBA in BX-795- und Lösungsmittel-behandelten Mäusen

C57BL/6-Wildtyp-Mäuse wurden p.o. mit BX-795, einem Inhibitor der PDK1, oder dem Lösungsmittel ab Tag -2 behandelt, an Tag 0 erfolgte die Injektion des anti-mCOL7-IgG-AK in die Ohrbasis und an Tag 0, 1 und 2 wurde die Ohrdicke als klinischer Parameter einer Entzündungsreaktion erfasst. An Tag 2 erfolgte die Untersuchung der Ohren hinsichtlich klinischer Symptome der EBA, wie Hautrötung, Blasen- und Krustenbildung. Neben Referenzabbildungen der HE-gefärbten Gewebshistologien (Maßstab = 200 µm) sind fluoreszenzgefärbte Gefrierschnitte zur Kontrolle der Bindung des IgG-AK und der Ablagerung von C3-Komplement (Maßstab = 100 µm) dargestellt (A). Klinische Parameter (Schwellung der Ohren und prozentualer Befall der Ohren mit Symptomen der EBA) wurden erfasst und mit dem Mann-Whitney Test statistisch ausgewertet (B, D). Die Veränderungen des Gewebes wurden anhand der HE-gefärbten Proben mithilfe einer Bewertungsskala, die die Zelleinwanderung in das Gewebe, die Verdickung der Epidermis und die Bildung von Blasen, Spalten und Krusten einbezieht, analysiert (C) und ebenfalls mit dem Mann-Whitney Test auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen und signifikante Unterschiede mit Sternen markiert (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Die Tiere, die mit BX-795 behandelt wurden, wiesen im Gegensatz zu den Kontrolltieren nahezu keine von entzündlichen Hautläsionen betroffene Ohrfläche ($p > 0,001$) auf (D). In der statistischen Auswertung der Veränderung der Ohrdicke (B), als klinischer Parameter einer Entzündung, und in der Analyse der histologischen Gewebeproben ließen sich keine statistischen Unterschiede zwischen beiden Gruppen feststellen (C). Die DIF Färbungen zeigen bei beiden Gruppen sowohl die Bindung des anti-mCOL7-IgG-AK als auch die C3-Ablagerung an der DEJ (A).

3.2.7 Kaum sichtbare Effekte von EHop-016 im lokalen Modell der EBA

Die Rac-GTPase wird in MDA-MB-435- und MDA-MB-231-Zellen (Brustkrebszellen) durch EHop-016 mit einem IC_{50} -Wert von $1,1 \mu M$ gehemmt¹⁸³. In der höchsten Konzentration von $10 \mu M$ reduzierte die Zugabe von EHop-016 zu stimulierten humanen neutrophilen Granulozyten *in vitro* die ROS-Freisetzung nach einer ersten Analyse mit dem One-way ANOVA-Test statistisch signifikant ($p < 0,05$). Aus diesem Grund wurde es für den weiteren *in vivo* Versuch ausgewählt und der Wirkstoff wurde dazu drei Tage vor Versuchsbeginn von der Firma Selleckchem gelöst geliefert. Zweimal täglich wurden die Mäuse i.p. mit 12 mg/kg KG EHop-016¹⁸⁴ bzw. dem entsprechenden Lösungsmittel behandelt.

Abbildung 3.10 fasst die Ergebnisse des *in vivo* Versuches zusammen. Ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe war lediglich in der Ausbreitung der Symptome am Ohr zu erkennen ($p < 0,05$), wobei die Kontrollgruppe stärker betroffen war. Die Messung der Schwellung der Ohren oder die Analyse der Gewebshistologien führten zu keinen statistisch signifikant unterschiedlichen Ergebnissen.

Die Bindung des injizierten AK an mCOL7 hat bei beiden Gruppen stattgefunden, was sich in der DIF als grün fluoreszierende Linie an der DEJ darstellen lässt. Die Ablagerung von C3-Komplement an der DEJ ist ebenso bei Kontroll- und Behandlungsgruppe als Zeichen einer Aktivierung des Komplementsystems durch die im Gewebe immobilisierten Immunkomplexe aus mCOL7 und anti-mCOL7-IgG erfolgt.

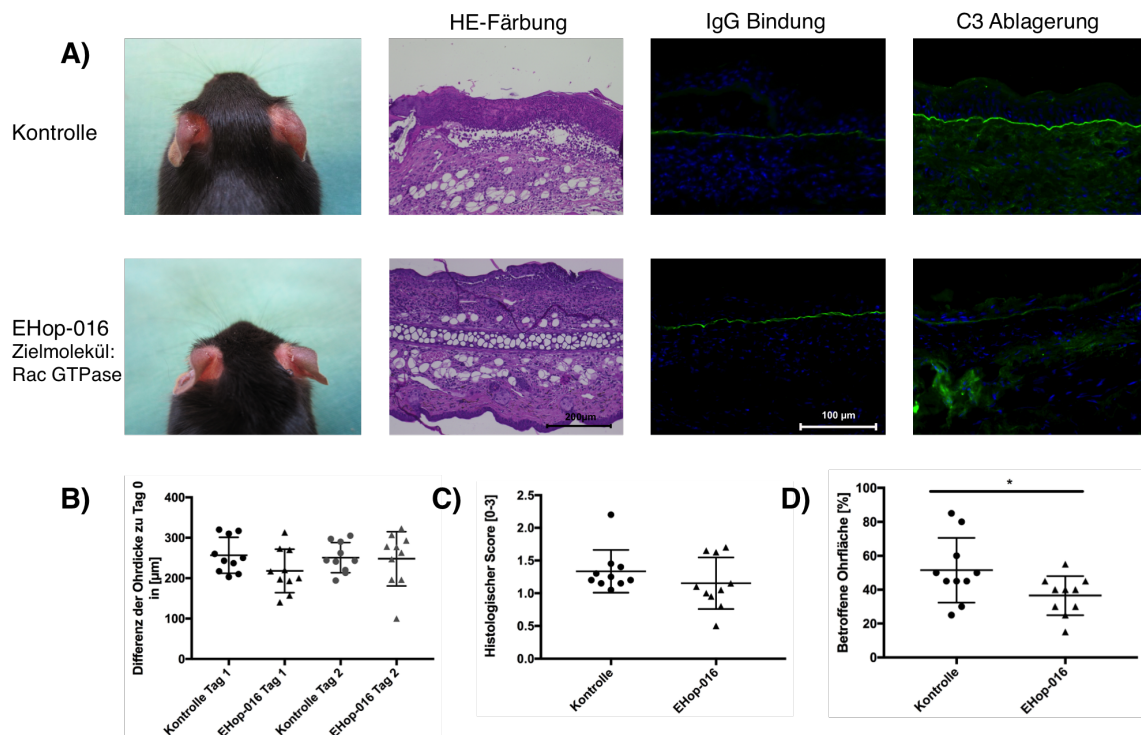


Abbildung 3.10 Lokale EBA in EHOp-016- und Lösungsmittel-behandelten Mäusen

C57BL/6-Wildtyp-Mäuse wurden i.p. mit EHOp-016, das die Rac-GTPase hemmt, oder dem Lösungsmittel ab Tag -2 behandelt, an Tag 0 erfolgte die Injektion des anti-mCOL7-IgG-AK in die Ohrbasis und an Tag 0, 1 und 2 wurde die Ohrdicke als klinischer Parameter einer Entzündungsreaktion erfasst. An Tag 2 erfolgte die Untersuchung der Ohren hinsichtlich klinischer Symptome der EBA, wie Hautrötung, Blasen- und Krustenbildung. Neben Referenzabbildungen der HE-gefärbten Gewebshistologien (Maßstab = 200 µm) sind fluoreszenzgefärbte Gefrierschnitte zur Kontrolle der Bindung des IgG-AK und der Ablagerung von C3-Komplement (Maßstab = 100 µm) dargestellt (A). Klinische Parameter (Schwellung der Ohren und prozentualer Befall der Ohren mit Symptomen der EBA) wurden erfasst und mit dem Mann-Whitney Test statistisch ausgewertet (B, D). Die Veränderungen des Gewebes wurden anhand der HE-gefärbten Proben mithilfe einer Bewertungsskala, die die Zelleinwanderung in das Gewebe, die Verdickung der Epidermis und die Bildung von Blasen, Spalten und Krusten einbezieht, analysiert (C) und ebenfalls mit dem Mann-Whitney Test auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen und signifikante Unterschiede mit Sternen markiert (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Außer dem statistisch signifikant unterschiedlich stark ausgeprägten Befall der Ohrfläche ($p < 0,05$) (D) ergaben die Analysen der weiteren klinischen (B) und histologischen (C) Parameter keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe. Die DIF Färbungen zeigen bei beiden Gruppen sowohl die Bindung der anti-mCOL7-IgG-AK als auch die C3-Ablagerung an der DEJ (A).

3.2.8 Kein Effekt von MK-2206 2HCl im lokalen Modell der EBA

Durch die Blockade von AKT1/2/3 mit IC_{50} -Werten von 8 nM/ 12 nM/ 65 nM durch den Wirkstoff MK-2206 2HCl wird die Phosphorylierung der im intrazellulären Signalweg unterhalb liegenden Enzyme/Kinasen verhindert¹⁷⁹. Die Blockade durch MK-2206 2HCl führte in den *in vitro* Experimenten in den höheren Konzentrationen von 1 μ M und 10 μ M zu einer statistisch signifikant verringerten Freisetzung von ROS aus aktivierten neutrophilen Granulozyten ($p < 0,05$) (s. Abb. 3.1). Für die Behandlung der Tiere im *in vivo* Versuch wurde der Wirkstoff in einer Dosierung von 120 mg/kg KG²⁴³ oder das Lösungsmittel einmal täglich p.o. verabreicht.

Die Ergebnisse der Tierversuche sind in Abbildung 3.11 dargestellt. Es waren keine wesentlichen Unterschiede weder in der flächenhaften Ausprägung der Symptome noch in der Veränderung der Ohrdicke zwischen beiden Gruppen feststellbar. Auch in der Auswertung der HE-gefärbten Proben war keine signifikante Abweichung der Entzündungsmerkmale erkennbar. Sowohl bei der Interventions- als auch bei der Kontrollgruppe führte die AK-Injektion zur Einwanderung von Zellen in das Gewebe sowie zur Ausbildung von Blasen durch Abspaltung der Epidermis von der Dermis.

In der DIF war die DEJ bei beiden Gruppen als fluoreszierende Linie im Sinne des an mCOL7 gebundenen, injizierten AK darstellbar. Aufgrund einer relativ starken Hintergrundfärbung durch den fluoreszierenden AK war die Ablagerung des C3-Komplements schlechter beurteilbar, dennoch ist sie bei beiden Gruppen erkennbar.

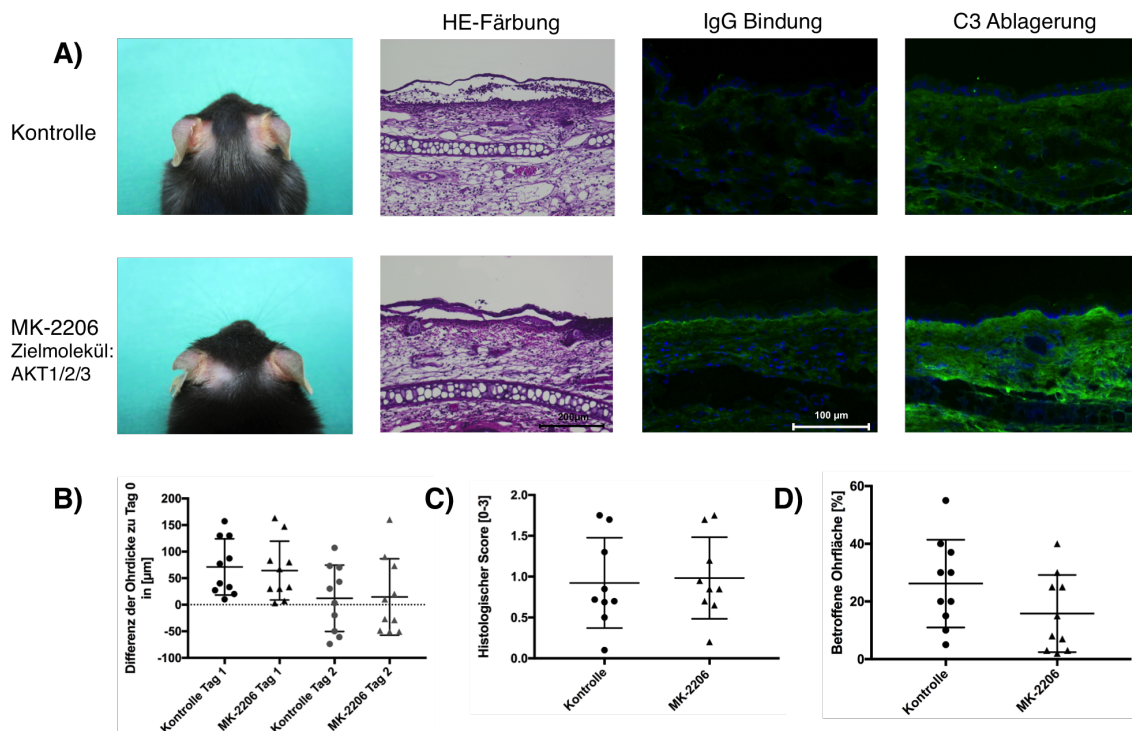


Abbildung 3.11 Lokale EBA in MK-2206 2HCl- und Lösungsmittel-behandelten Mäusen

C57BL/6-Wildtyp-Mäuse wurden p.o. mit MK-2206, einem Hemmstoff der AKT1/2/3, oder dem Lösungsmittel ab Tag -2 behandelt, an Tag 0 erfolgte die Injektion des anti-mCOL7-IgG-AK in die Ohrbasis und an Tag 0, 1 und 2 wurde die Ohrdicke als klinischer Parameter einer Entzündungsreaktion erfasst. An Tag 2 erfolgte die Untersuchung der Ohren hinsichtlich klinischer Symptome der EBA, wie Hautrötung, Blasen- und Krustenbildung. Neben Referenzabbildungen der HE-gefärbten Gewebshistologien (Maßstab = 200 µm) sind fluoreszenzgefärbte Gefrierschnitte zur Kontrolle der Bindung des IgG-AK und der Ablagerung von C3-Komplement (Maßstab = 100 µm) dargestellt (A). Klinische Parameter (Schwellung der Ohren und prozentualer Befall der Ohren mit Symptomen der EBA) wurden erfasst und mit dem Mann-Whitney Test statistisch ausgewertet (B, D). Die Veränderungen des Gewebes wurden anhand der HE-gefärbten Proben mithilfe einer Bewertungsskala, die die Zelleinwanderung in das Gewebe, die Verdickung der Epidermis und die Bildung von Blasen, Spalten und Krusten einbezieht, analysiert (C) und ebenfalls mit dem Mann-Whitney Test auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen und signifikante Unterschiede mit Sternen markiert (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Insgesamt ist eine relativ breite Streuung der Werte erkennbar, die relevante Unterschiede zwischen beiden Gruppen nicht erkennen lässt (B, D). Veränderungen der Haut bestehen bei beiden Gruppen im Sinne einer Migration von Zellen und Verdickung bzw. Spaltbildung zwischen Dermis und Epidermis (C). Bei starker Hintergrundfärbung lassen sich die DIF-Bilder schwieriger analysieren, jedoch ist sowohl die Bindung des IgG-AK sowie eine Ablagerung von C3 sichtbar (A).

3.2.9 Geringer Effekt von IC-87114 auf die Symptomausprägung der EBA im lokalen Modell

IC-87114 ist ein selektiver Inhibitor der PI3K δ , mit einem IC₅₀-Wert von 0,5 μ M im zellfreien Versuchsansatz¹⁶³. Im *in vitro* Experiment mit Immunkomplex-aktivierten Neutrophilen führte die Zugabe von IC-87114 mit einer Konzentration von minimal 0,1 μ M zu einer statistisch signifikanten Verringerung der ROS-Freisetzung ($p < 0,05$) (s. Abb. 3.1). Für die *in vivo* Versuche wurde die Substanz von der Herstellerfirma Selleckchem drei Tage vor Versuchsbeginn im Lösungsmittel gelöst geschickt. Die Tiere wurden dreimal täglich p.o. mit einer Dosis von 5,6 mg/kg KG IC-87114¹⁶⁷ bzw. dem Lösungsmittel behandelt.

Der Befall der Ohren mit Symptomen der EBA, der bei der Kontrollgruppe im Mittel bei etwa 35% und bei der Behandlungsgruppe bei etwa 20% lag, unterschied sich statistisch signifikant voneinander ($p < 0,05$) (s. Abb. 3.12). Die klinischen und histologischen Parameter einer Entzündung unterschieden sich nicht signifikant. In den Referenzabbildungen ist sowohl bei der Kontrollgruppe als auch bei der Behandlungsgruppe die Einwanderung von Zellen sichtbar sowie die Ausbildung einer Blase im Beispiel der Kontrollgruppe und die Ausbildung einer Kruste im Beispiel der Behandlungsgruppe. Die Bindung des anti-mCOL7-IgG-AK und die Ablagerung von C3-Komplement an der DEJ wurde durch Färbungen der Gewebeschnitte in der DIF untersucht und ist bei beiden Gruppen identisch.

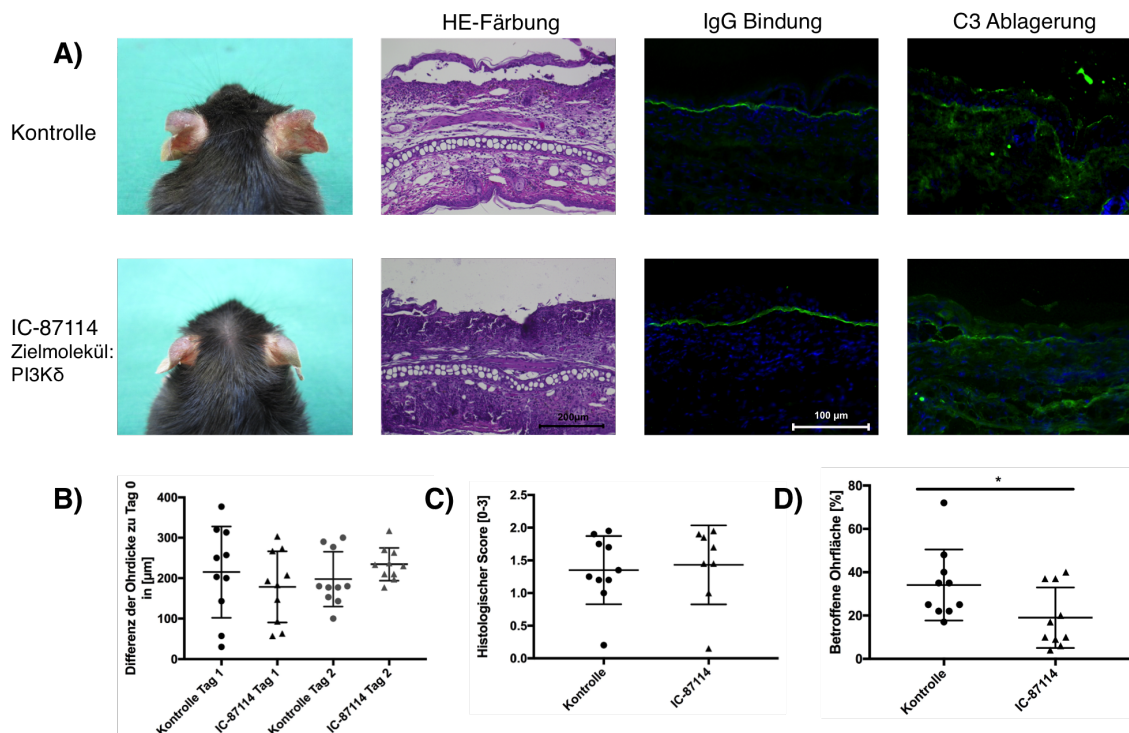


Abbildung 3.12 Lokale EBA in IC-87114- und Lösungsmittel-behandelten Mäusen

C57BL/6-Wildtyp-Mäuse wurden p.o. mit IC-87114, einem Inhibitor von PI3K δ , oder dem Lösungsmittel ab Tag -2 behandelt, an Tag 0 erfolgte die Injektion des anti-mCOL7-IgG-AK in die Ohrbasis und an Tag 0, 1 und 2 wurde die Ohrdicke als klinischer Parameter einer Entzündungsreaktion erfasst. An Tag 2 erfolgte die Untersuchung der Ohren hinsichtlich klinischer Symptome der EBA, wie Hautrötung, Blasen- und Krustenbildung. Neben Referenzabbildungen der HE-gefärbten Gewebshistologien (Maßstab = 200 μ m) sind fluoreszenzgefärbte Gefrierschnitte zur Kontrolle der Bindung des IgG-AK und der Ablagerung von C3-Komplement (Maßstab = 100 μ m) dargestellt (A). Klinische Parameter (Schwellung der Ohren und prozentualer Befall der Ohren mit Symptomen der EBA) wurden erfasst und mit dem Mann-Whitney Test statistisch ausgewertet (B, D). Die Veränderungen des Gewebes wurden anhand der HE-gefärbten Proben mithilfe einer Bewertungsskala, die die Zelleinwanderung in das Gewebe, die Verdickung der Epidermis und die Bildung von Blasen, Spalten und Krusten einbezieht, analysiert (C) und ebenfalls mit dem Mann-Whitney Test auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen und signifikante Unterschiede mit Sternen markiert (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Vor allem die Abbildungen der Gewebshistologien, sowohl die HE-Färbungen als auch die DIF-Färbungen, lassen erkennen, dass es bei beiden Versuchsgruppen zu einer Krankheitsentwicklung nach AK-Injektion gekommen ist (A, C). Eine Verdickung der Epidermis mit Krusten- bzw. Blasenbildung sowie die Einwanderung von Entzündungszellen sind als Zeichen der Erkrankung sichtbar (C). Die makroskopisch sichtbar von Symptomen betroffene Ohrfläche der Interventionsgruppe ist nach statistischer Auswertung signifikant geringer (D), während bei der Ohrdicke und der Auswertung der Gewebshistologien kein Unterschied zu sehen ist (B, C). Die Bindung des anti-mCOL7-IgG-AK und die Ablagerung von C3-Komplement an der DEJ wurde durch Färbungen der Gewebeschnitte in der DIF untersucht und ist bei beiden Gruppen gleich (A).

3.2.10 Schwach aktivierender Effekt von Nilotinib im lokalen Modell der EBA

Nilotinib als bekannter Inhibitor von Bcr-Abl mit einem IC_{50} -Wert < 30 nM in murinen myeloiden Progenitorzellen²¹² führte in der *in vitro* Untersuchung mit humanen neutrophilen Granulozyten in Konzentrationen von $1 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M}$ zur deutlichen Reduktion der ROS-Freisetzung ($p < 0,05$) (s. Abb. 3.1). Mit einer Dosierung von 24 mg/kg KG ²¹² wurden die Mäuse der Behandlungsgruppe mit Nilotinib bzw. die Kontrolltiere mit der Trägersubstanz dreimal täglich p.o. behandelt.

Die Versuchsergebnisse in Abbildung 3.13 zeigen, dass die Behandlung mit Nilotinib zu keiner Symptomabmilderung im Vergleich zur Kontrollgruppe führte. Die an den Ohren sichtbaren Läsionen waren in beiden Gruppen etwa gleich stark ausgeprägt. Bei der Kontrolle der Ohrdicke konnte an Tag 2 sogar eine stärkere Schwellung bei den mit Nilotinib behandelten Tieren festgestellt werden ($p < 0,05$). Histologisch waren in den Gewebeproben beider Gruppen in das Gewebe eingewanderte Zellen und die Ausbildung von Spalten zwischen Dermis und Epidermis zu erkennen. Es kam ebenfalls bei beiden Gruppen zur Verdickung der Epidermis. Die Bindung des intradermal injizierten AK wurde in der DIF Färbung überprüft und konnte bei beiden Gruppen an der DEJ nachgewiesen werden. Abgelagertes C3-Komplement wurde ebenfalls markiert und an der DEJ dargestellt.

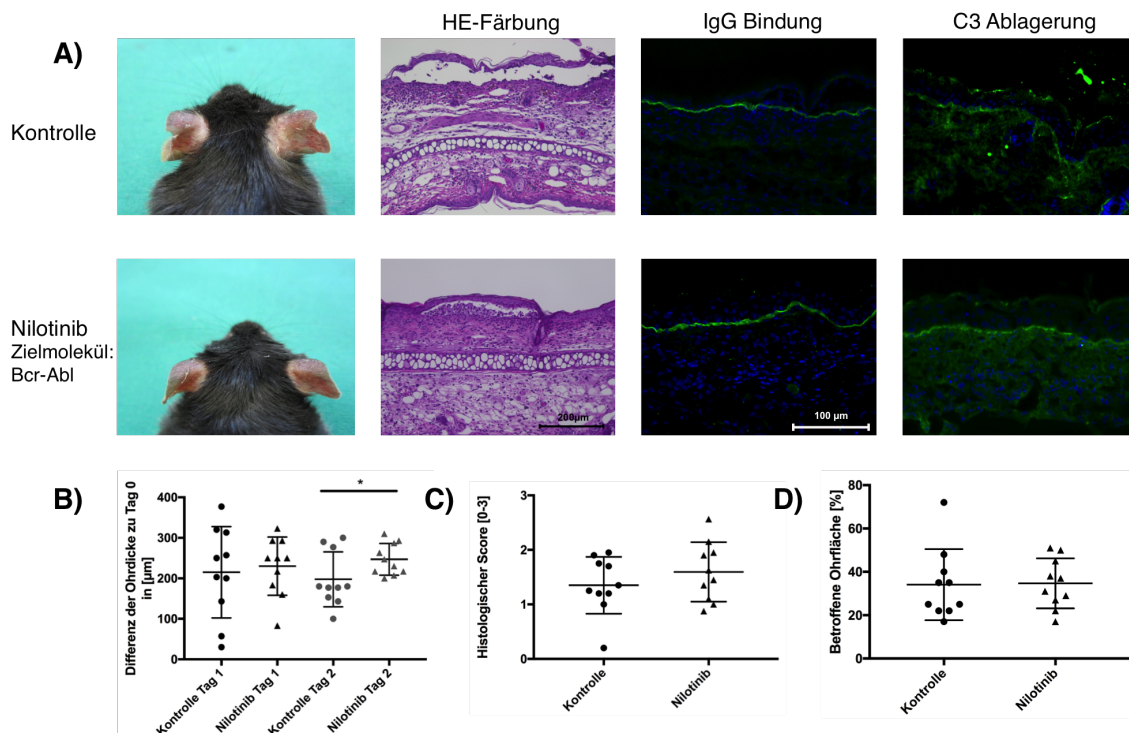


Abbildung 3.13 Lokale EBA in Nilotinib- und Lösungsmittel-behandelten Mäusen

Die Tiere wurden p.o. mit Nilotinib, das Bcr-Abl blockiert, oder dem Lösungsmittel ab Tag -2 behandelt, an Tag 0 erfolgte die Injektion des anti-mCOL7-IgG-AK in die Ohrbasis und an Tag 0, 1 und 2 wurde die Ohrdicke als klinischer Parameter einer Entzündungsreaktion erfasst. An Tag 2 erfolgte die Untersuchung der Ohren hinsichtlich klinischer Symptome der EBA, wie Hautrötung, Blasen- und Krustenbildung. Neben Referenzabbildungen der HE-gefärbten Gewebshistologien (Maßstab = 200 µm) sind fluoreszenzgefärbte Gefrierschnitte zur Kontrolle der Bindung des IgG-AK und der Ablagerung von C3-Komplement (Maßstab = 100 µm) dargestellt (A). Klinische Parameter (Schwellung der Ohren und prozentualer Befall der Ohren mit Symptomen der EBA) wurden erfasst und mit dem Mann-Whitney Test statistisch ausgewertet (B, D). Die Veränderungen des Gewebes wurden anhand der HE-gefärbten Proben mithilfe einer Bewertungsskala, die die Zelleinwanderung in das Gewebe, die Verdickung der Epidermis und die Bildung von Blasen, Spalten und Krusten einbezieht, analysiert (C) und ebenfalls mit dem Mann-Whitney Test auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen und signifikante Unterschiede mit Sternen markiert (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Sowohl in der Interventionsgruppe als auch in der Behandlungsgruppe wurden durch AK-Injektion Symptome der EBA, wie Krusten- und Spaltbildung, hervorgerufen, was in den repräsentativen HE-gefärbten Bildern zu sehen ist (A). In der DIF-Färbung lässt sich darüber hinaus die Einwanderung von Zellen an der DEJ erkennen (blau gefärbte Zellen) (A). Die Messung der Ohrdicke zeigte ein deutlicheres Anschwellen der Ohren der mit Nilotinib behandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren ($p < 0,05$) (B). Die statistische Auswertung der weiteren erhobenen klinischen Parameter sowie der HE-gefärbten Gewebeproben ergaben keine relevanten Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen (C, D).

3.2.11 Zunahme der Ohrschwellung bei Behandlung mit PH-797804 am zweiten Tag im lokalen Modell der EBA

PH-797804 ist ein Inhibitor der p38 α MAP-Kinase mit einem IC₅₀-Wert von 26 nM¹⁷⁵. In den *in vitro* Versuchen konnte, wie in Abbildung 3.1 sichtbar, die ROS-Freisetzung bei Zugabe des Wirkstoffes zu den Immunkomplex-aktivierten Neutrophilen in der Konzentration von 0,1 μ M deutlich reduziert werden ($p < 0,01$). *In vivo* wurde PH-797804 zweimal täglich in einer Dosierung von 1 mg/kg KG¹⁷⁵ oder zur Kontrolle die äquivalente Menge des Lösungsmittels p.o. verabreicht.

Die Ergebnisse des Versuches sind in Abbildung 3.14 zusammengefasst dargestellt. Die klinische Manifestation an den Ohren der Tiere unterschied sich in Kontroll- und Behandlungsgruppe nicht wesentlich voneinander. Allerdings war eine deutlichere Zunahme der Ohrdicke festzustellen und zwar nicht bei den Tieren der Kontrollgruppe, sondern bei den mit PH-797804 behandelten Tieren ($p < 0,05$). In der Auswertung der Gewebshistologien war die Zelleinwanderung in die Haut mit Folge einer verdickten Epidermis bei beiden Gruppen vergleichbar. Die Bindung des intradermal applizierten IgG-AK an das in der DEJ gelegene COL7 sowie die Ablagerung des C3-Komplements war bei beiden Gruppen identisch.

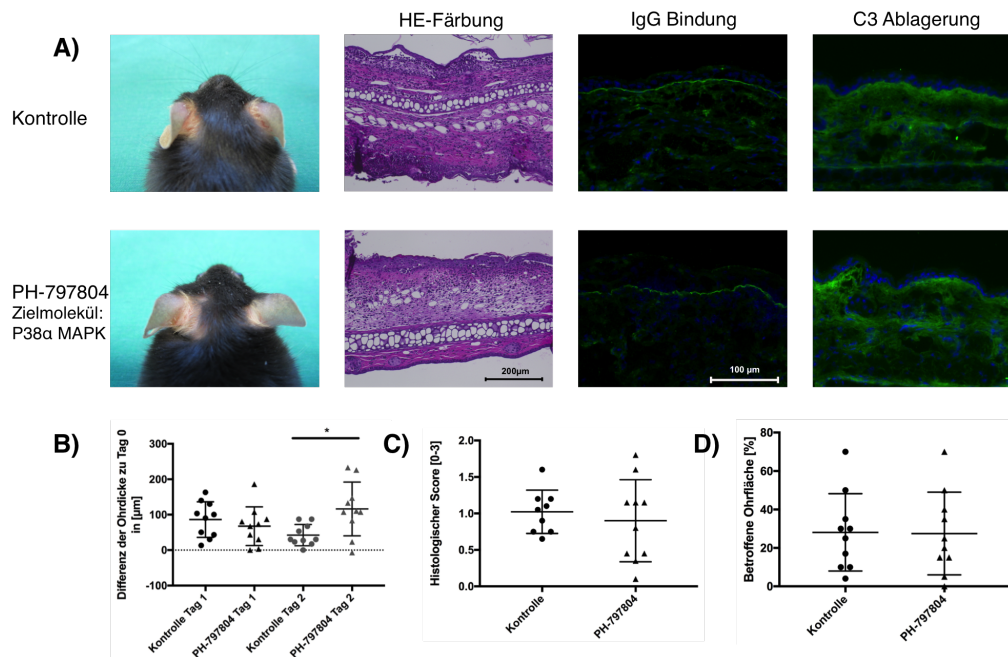


Abbildung 3.14 Lokale EBA in PH-797804- und Lösungsmittel-behandelten Mäusen

C57BL/6-Wildtyp-Mäuse wurden p.o. mit PH-797804, einem Inhibitor der p38 α MAP-Kinase, oder dem Lösungsmittel ab Tag -2 behandelt, an Tag 0 erfolgte die Injektion des anti-mCOL7-IgG-AK in die Ohrbasis und an Tag 0, 1 und 2 wurde die Ohrdicke als klinischer Parameter einer Entzündungsreaktion erfasst. An Tag 2 erfolgte die Untersuchung der Ohren hinsichtlich klinischer Symptome der EBA, wie Hautrötung, Blasen- und Krustenbildung. Neben Referenzabbildungen der HE-gefärbten Gewebshistologien (Maßstab = 200 μ m) sind fluoreszenzgefärbte Gefrierschnitte zur Kontrolle der Bindung des IgG-AK und der Ablagerung von C3-Komplement (Maßstab = 100 μ m) dargestellt (A). Klinische Parameter (Schwellung der Ohren und prozentualer Befall der Ohren mit Symptomen der EBA) wurden erfasst und mit dem Mann-Whitney Test statistisch ausgewertet (B, D). Die Veränderungen des Gewebes wurden anhand der HE-gefärbten Proben mithilfe einer Bewertungsskala, die die Zelleinwanderung in das Gewebe, die Verdickung der Epidermis und die Bildung von Blasen, Spalten und Krusten einbezieht, analysiert (C) und ebenfalls mit dem Mann-Whitney Test auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen und signifikante Unterschiede mit Sternen markiert (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Die Abbildungen der Gewebshistologien sowie die DIF-Färbungen lassen die Einwanderung von Zellen erkennen mit daraus folgenden Veränderungen des Gewebes, nämlich Spaltbildung an der DEJ und Zerstörung des Epithels mit konsekutiver Krustenbildung (A). Zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe bestehen in der Auswertung der Gewebeproben oder dem Ausmaß der makroskopisch sichtbaren Erkrankungsausprägung keine statistisch signifikanten Unterschiede (D). Die Veränderung der Ohrdicke nach AK-Injektion führte statistisch gesehen zu einem signifikant stärkeren Anschwellen bei der Interventionsgruppe an Tag 2 ($p < 0,05$) (B).

3.2.12 Geringere Symptomausprägung bei Behandlung mit Enbrel im lokalen Modell der EBA

Teile dieser Arbeit wurden im Rahmen von Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zum Einfluss von $\text{TNF}\alpha$ auf EBA bereits veröffentlicht⁸⁹. Es können höhere Level von $\text{TNF}\alpha$ in Hautläsionen von erkrankten Mäusen detektiert werden, was einen positiven Effekt von Enbrel (ETA), einem $\text{TNF}\alpha$ -Blocker, im Sinne einer abmildernden Symptomatik der Erkrankung erwarten ließ⁸⁹. Enbrel wurde den Mäusen einmal täglich in einer Dosierung von 2,5 mg/kg KG i.p. verabreicht, beginnend 2 Tage vor Injektion des anti-mCOL17 IgG-AK in die Ohrbasis. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.15 dargestellt. Die prozentual von EBA-Symptomen betroffene Fläche war bei den mit Enbrel behandelten Tieren statistisch signifikant geringer als bei der Kontrollgruppe ($p < 0,05$).

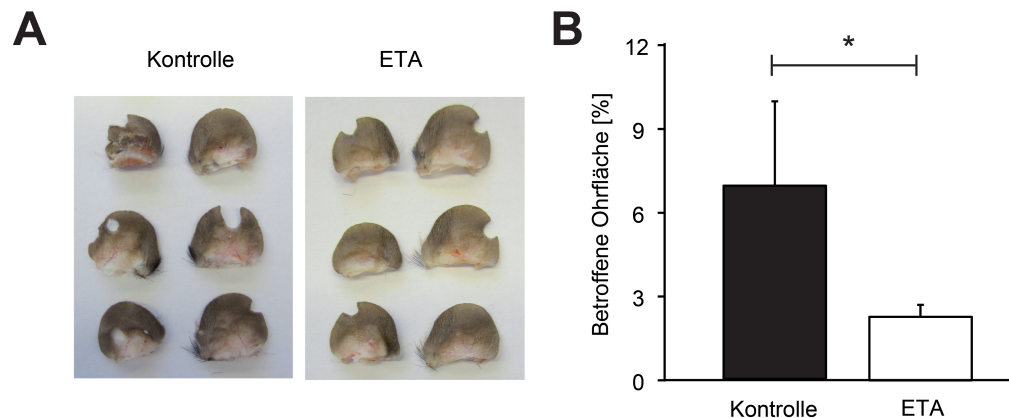


Abbildung 3.15 Lokale EBA in Enbrel- und Lösungsmittel-behandelten Mäusen⁸⁹

C57BL/6-Wildtyp-Mäuse wurden ab Tag -2 i.p. mit Enbrel (ETA), das $\text{TNF}\alpha$ blockiert, oder dem Lösungsmittel behandelt, an Tag 0 erfolgte die Injektion des anti-mCOL17-IgG-AK in die Ohrbasis und an Tag 0, 1 und 2 wurde die Ohrdicke als klinischer Parameter einer Entzündungsreaktion erfasst. An Tag 2 erfolgte die Untersuchung der Ohren hinsichtlich klinischer Symptome der EBA, wie Hautrötung, Blasen- und Krustenbildung. Dargestellt sind repräsentative Mausohren 2 Tage nach AK-Injektion und Behandlung mit Enbrel oder Trägersubstanz (A) und der prozentuale Befall der Ohren mit Symptomen der EBA als klinischer Parameter (B). Die erfassten Daten wurden mit dem t-Test ausgewertet und signifikante Unterschiede wie folgt markiert: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Der klinische Parameter im Sinne eines großflächigeren Symptombefalls war bei Tieren in der Behandlungsgruppe mit Enbrel ($n=6$) geringer ausgeprägt als in der Kontrollgruppe ($n=8$) ($p < 0,05$)(B).

4 Diskussion

Neutrophile Granulozyten sind als Haupteffektorzellen bei bullösen Autoimmundermatosen, wie der EBA, maßgeblich an der Entstehung der Symptome beteiligt^{80;85;86;92;93;98}. Der Bindung von Autoimmunkomplexen an die DEJ folgt die Freisetzung proinflammatorischer und chemotaktischer Signale^{81–84}, das Komplementsystem wird aktiviert^{76;77;79;80} und neutrophile Granulozyten werden rekrutiert und aktiviert. Die Degranulation der Neutrophilen geht mit der Freisetzung von ROS und MMPs einher, wodurch eine Gewebeschädigung hervorgerufen wird^{85;91;92}. Wegen der schwerwiegenden und teils lebensbedrohlichen Symptome der EBA sollte die Erforschung und Entwicklung neuer Medikamente das angestrebte Ziel sein. Die pharmazeutische Industrie sieht gerade in der Erforschung neuer Therapeutika gegen seltene Erkrankungen wirtschaftlich jedoch keine Rentabilität und hat daher wenig Interesse an derartigen Projekten^{244–246}.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Signaltransduktionsinhibitoren (STI), sogenannte „kleine Moleküle“, bezüglich ihrer Fähigkeit die ROS-Freisetzung aus Immunkomplex-aktivierten Neutrophilen *in vitro* zu minimieren und damit eine geringere Krankheitsausprägung im *in vivo* Modell der lokalen EBA zu erzielen, getestet. Im Gegensatz zu breit immunsuppressiv wirkenden Medikamenten, wie z.B. Glukokortikoiden, geht man aufgrund der gezielten Blockade für die Erkrankung spezifischer Zielstrukturen bei diesen Medikamenten von einem geringeren Nebenwirkungspotential aus²³⁴.

Von insgesamt 33 getesteten Substanzen führten 15 zu einer statistisch signifikanten Abnahme der ROS-Freisetzung aus Immunkomplex-aktivierten humanen neutrophilen Granulozyten im *in vitro* Versuch. Elf dieser *in vitro* wirksamen Substanzen konnten im *in vivo* Modell der lokal induzierten EBA auf ihre Wirksamkeit, die EBA-Symptome zu verringern, untersucht werden. Am Ende zeigte sich bei der Anwendung von sechs dieser Medikamente eine deutlich geringere Ausbildung von makroskopisch sichtbaren Läsionen und mikroskopisch erkennbaren Hautveränderungen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.1 zusammengefasst dargestellt.

Name	Zielstruktur	ROS	In vivo	IC ₅₀
TGX-221 →	(p110β) →	***	✓	5 nM / 3 nM
GDC-0941 <i>in vivo</i>	(p110α/δ) <i>in vivo</i>	***	n.d.	1 nM
PRT062607 HCl	SYK	***	✓	14 nM
NU7441	DNA-PK	***	Entzündung ↑	26 nM
PH797804	p38α MAPK	***	✓	0,22 nM
Sotrastaurin	PKC	**	n.s.	0,5 μM
IC-87114	p110δ	**	✓	111 nM
BX-795	PKC-1	*	n.d.	2,2 nM
XL019	JAK2	*	n.d.	1,0 - 2,1 μM
U73122	PLC	***	n.s.	< 30 nM
Nilotinib	Bcr-Abl	**	n.s.	8/12/65 nM
MK-2206 2HCl	AKT1/2/3	*	n.d.	1,1/0,3 nM
GDC-0994	ERK1/2	**	n.d.	0,07 μM
U0126	MEK1/2	**	✓	9 nM
PHA-665752	c-Met	*	n.d.	22,4 nM
Mirabegron	β3-Rezeptor	*	✓	12 nM
Propranolol HCl	β-Rezeptor	n.s.	n.s.	1,1 μm
EHop-016	Ras GTPase	n.s.	n.d.	480 nM
SR3335	RORα	n.s.	n.d.	

Name	Zielstruktur	ROS	In vivo	IC ₅₀
Iniparib	PARP1	n.s.	n.d.	40-128 μM
GSK1292263	GPR119	n.s.	n.d.	> 30 μM
Fulvestrant	ER	n.s.	n.d.	0,29 nM
Dapagliflozin	hSGLT2	n.s.	n.d.	1,1 nM
Cryptotanshinone	STAT3	n.s.	n.d.	4,6 μM
SMI-4a	Pim1	n.s.	n.d.	17 nM
BIBR 1532	Telomerase	n.s.	n.d.	100 nM
NVP-BEP800	HSP90β	n.s.	n.d.	58 nM
Lyn Peptide Inhibitor	Lyn	n.s.	n.d.	
Ras inhibitory peptide	Ras	n.s.	n.d.	
HCK Antibody (N-term)	HCK	n.s.	n.d.	
Blocking Peptide				
BIRB 796	p38α MAPK	*	n.d.	38 nM
GPCR GPR119 peptide	GPR119	*	n.d.	
R59 949	DAG-Kinase	*	n.d.	0,3 μM
CCG-1423	RhoA	**	n.d.	1,5 μM

0,01 μM
 0,1 μM
 1 μM
 10 μM
 n.d.: nicht durchgeführt
 n.s.: nicht signifikant
 aktivierend

Abbildung 4.1 Übersicht der Wirksamkeit getesteter Substanzen im *in vitro* und *in vivo* Modell Dargestellt ist die Signifikanz der Wirksamkeit getesteter Substanzen im *in vitro* ROS-Freisetzungsversuch und im *in vivo* Modell der lokal induzierten EBA. Die Abhängigkeit der Reduktion der ROS-Freisetzung von der Konzentration des Medikamentes ist farblich verdeutlicht: dunkelgrün=Hemmung bei einer Konzentration von 0,1 μM; blassgrün=Hemmung bei einer Konzentration von 1 μM; türkis=Hemmung bei einer Konzentration von 10 μM; rot=Aktivierung. Im ROS-Freisetzungsversuch wurden pro Medikament 4 bis 9 Versuche (n=4-9) mit Positiv- und Negativkontrolle in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Test mit GraphPad Prism 5 ermittelt (*, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001). Im lokalen EBA-Modell wurden 5 Tiere mit je 2 Ohren (n=10) pro Medikament und pro Kontrollgruppe getestet. Nicht signifikante Werte sind mit n.s. gekennzeichnet; nicht getestete mit n.d. (nicht durchgeführt).

Im Folgenden werden die einzelnen Medikamente bezüglich ihrer Wirksamkeit in den Tierversuchen diskutiert.

Sotrastaurin (AEB071), ein nicht selektiver PKC-Inhibitor, zählt zu den Wirkstoffen, die neben der ROS Reduktion *in vitro* auch einen *in vivo* Effekt bezüglich der Abmilderung der EBA-Symptome erzielen konnten. Neben Anwendungsgebieten, die in der Einleitung (s. Kap. 1.5) bereits beschrieben wurden, konnte Sotrastaurin, eingesetzt in der dermatologischen Forschung, bei oraler Einnahme dosisabhängig sowohl den Rückgang der akuten allergischen Kontaktdermatitis im Rattenmodell als auch die Verbesserung von Symptomen bei Psoriasispatienten¹⁵³ erzielen.

Bei präklinischen Zellversuchen in der onkologischen Forschung unterdrückte Sotrastaurin den NF-κB Signalweg, der bei Tumorgeschehen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese einnimmt²⁴⁷. Dieser Signalweg spielt auch in Bezug auf die Freisetzung von ROS durch die aktivierte NADPH-Oxidase in neutrophilen Granulozyten eine wichtige Rolle²⁴⁸, sodass dessen Unterdrückung *in vivo* zum Rückgang der EBA-Symptome geführt haben könnte. Bekannt ist darüber hinaus ein dosisabhängiger hemmender Effekt Sotrastaurins *in vitro* sowohl auf die Migration aktivierter Neutrophiler als auch auf die Freisetzung von ROS²⁴⁹. *In vitro* konnte bei LPS-stimulierten Neutrophilen die Genexpression proinflammatorischer Zytokine nicht inhibiert werden²⁴⁹. Durch die Zugabe von Sotrastaurin in einer Konzentration von

0,01 μ M konnte *in vitro* ein statistisch signifikanter Rückgang der ROS-Freisetzung aus Neutrophilen erzielt werden. Im *in vivo* Modell der lokal induzierten EBA konnte Sotrastaurin in präventiver Anwendung das klinische Bild bei den behandelten Tieren im Gegensatz zur Kontrollgruppe leicht verbessern. Am zweiten Tag war vor allem die Schwellung der Ohren in der Behandlungsgruppe deutlich geringer. Bei der von EBA betroffenen Fläche oder in der Auswertung der Gewebshistologien gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Sotrastaurin- und der Kontrollgruppe.

Eine lokale Anwendung wäre aufgrund meist geringer ausgeprägter Nebenwirkungen, verglichen zu systemischer Applikation, wünschenswert. Im Rahmen von Untersuchungen zur Hyperpigmentierung bei Mäusen zeigte der PKC β -Inhibitor *Bis* bereits Wirkung in lokal topischer Anwendung²⁵⁰. Untersuchungen zur topischen Anwendung von Sotrastaurin bei EBA könnten daher in Betracht gezogen werden.

Neben der Blockade von PKC führte auch die Blockade der PI3-Kinase durch **GDC-0941** (Pictilisib) im *in vivo* Modell zu einer Verbesserung der EBA-Symptome. Bei der *in vitro* durchgeführten Blockade der PI3K verwendete ich den selektiv gegen die p110 β Untereinheit wirksamen Wirkstoff TGX-221. Da ich für die *in vivo* Versuche keine Lösung von TGX-221 erzielen konnte, wurde er durch GDC-0941 ersetzt. Dieser Wirkstoff hemmt insbesondere die PI3K α - und δ -Untereinheit, in höherer Konzentration auch β .

Der PI3K/AKT Signalweg stellt, wie bereits in der Einleitung erwähnt (s. Kap. 1.5), bei der Kanzerogenese einen entscheidenden Aspekt bezüglich Proliferation, Migration und Angiogenese dar^{158;160}. Bei Immunkomplexbindung über den Fc γ -Rezeptor auf neutrophilen Granulozyten wird dieser Signalweg ebenfalls aktiviert^{23;55;118–120} und sorgt für die Bereitstellung von ROS zur Abwehr fremder Organismen¹²¹. Durch Blockade der Signalkaskade konnten die neutrophilen Granulozyten *in vitro* eine geringere Menge an ROS freisetzen (s. TGX-221 in Abb. 3.1), bzw. die Symptome der lokal induzierten EBA *in vivo* waren weniger stark ausgeprägt (s. Abb. 3.4). Die ausschlaggebende Bedeutung der PI3K in der Pathogenese der EBA zeigten bereits Untersuchungen mit PI3K β -defizienten Mäusen, die bei experimentell induzierter EBA vor Entzündungen und Blasenbildung geschützt waren^{119;137}. Ob dieser Effekt auf die Reduktion der freigesetzten ROS oder auf die Blockade der Freisetzung von Elastase¹⁶³, die zusammen mit der Gelatinase B wesentlich an der Zerstörung von Strukturproteinen und der dermal-epidermalen Separation beteiligt ist⁹¹, zurückzuführen ist, ist nicht klar voneinander abzugrenzen. Da die Funktion der Neutrophilen bezüglich ihrer ROS-Freisetzung durch den PI3K-Inhibitor allerdings sehr stark eingeschränkt wurde, trägt dieser Effekt vermutlich stark zur verringerten Symptomatik bei.

Andere PI3K Inhibitoren, wie der selektive p110 δ -Inhibitor **IC-87114**, wiesen eine abmildernde Wirkung in Tiermodellen bei Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise Arthritis, auf¹⁶⁴ und reduzierten die Degranulation von Mastzellen in einem Mausmodell zur allergischen Immunantwort in der Haut¹⁶⁷.

GDC-0941 führte im lokalen Modell der EBA im Vergleich zu IC-87114 zu deutlich geringer ausgeprägten Symptomen. Die Inhibition der α - β - und δ -Untereinheit scheint in Bezug auf die Aktivierung der Neutrophilen durch Immunkomplexe und die Freisetzung von ROS eine bedeutendere Rolle zu spielen als die selektive Inhibition der δ -Untereinheit durch IC-87114. Die Untereinheiten der PI3K sind mit unterschiedlichen Aktivierungswegen und Funktionen vergesellschaftet^{251;252}. Während die γ -Untereinheit bei biphasischer PI3K-Aktivierung durch fMLP-stimulierte Neutrophile v.a. in der initialen Phase von Bedeutung ist, ist die δ -Untereinheit zu etwa 50-60%, β zu etwa 15% und α zu maximal 15% für die zweite Phase, in der die Synthese und Freisetzung von ROS reguliert wird, verantwortlich²⁵³. Die alleinige Blockade oder der Mangel an PI3K β führte bei Neutrophilen vermittelt über den Fc γ -Rezeptor zu verringerter ROS-Freisetzung. Im Mausmodell der EBA konnte auf diese Weise ein deutlicher Schutz und im Modell der entzündlichen Arthritis ein partieller Schutz vor Symptomentwicklung geschaffen werden¹¹⁹. Auch bei meinen *in vitro* Untersuchungen ließ sich eine deutliche Reduktion der ROS-Freisetzung aus humanen Neutrophilen durch die selektive Blockade der PI3K β mit TGX-221 in der Konzentration von 0,1 μ M erzielen. Die selektive Blockade von PI3K δ mit IC-87114 führte zwar auch zur ROS-Reduktion, allerdings weniger deutlich (s. Abb. 3.1). Möglicherweise trägt die PI3K β zur Impulsweiterleitung und vollen Aktivierung der PI3K δ bei¹¹⁹. Die gemeinsame Blockade der Untereinheiten β und δ konnte *in vitro* auch bei hochdosierter Immunkomplexstimulierung eine Reduktion der ROS-Freisetzung erreichen und einen kompletten Schutz vor Symptomen der Arthritis erzielen¹¹⁹. Das Zusammenspiel beider PI3K-Untereinheiten kann erklären, warum die Gabe von GDC-0941 im Gegensatz zu IC-87114 zu einer geringeren Krankheitsausprägung im lokalen Modell der EBA führte. Die δ -Untereinheit scheint darüber hinaus für die CD18 integrinabhängige, gerichtete Migration Neutrophiler eine entscheidende Rolle zu spielen¹⁶³. Die gleichzeitige Blockade von PI3K δ und PI3K β könnte neben der verringerten ROS-Reduktion (PI3K β) auch zu einer geringeren Einwanderung der ursächlichen Granulozyten in das Entzündungsgewebe führen.

Im weiteren Verlauf des PI3K-Signalwegs liegt die für die AKT-Aktivierung notwendige PDK1¹⁶⁸. **BX-795** blockiert die PDK1 und inhibiert infolgedessen auch die Phosphorylierung weiter abwärts gelegener Kinasen, wie PKC und AKT¹⁷¹. Bei Forschung an tumorös veränderten Zellen resultierte daraus eine Funktionseinschränkung von Neutrophilen und Makrophagen bezüglich der Chemotaxis und Migration^{171–173}, laut Yagi jedoch nicht bezüglich einer Minimierung der ROS-Freisetzung aus Neutrophilen¹⁷¹. Untersuchungen mit multiplen Myelomzellen stellten sogar einen Anstieg von ROS bei Behandlung mit einem PDK1-Inhibitor (Dichloracetat) fest¹⁷⁴. Kontrovers zu diesen Beobachtungen stehen die Ergebnisse, die sich bei dem von mir durchgeführten ROS-Freisetzungsversuch ergaben. Durch Behandlung gesunder, Immunkomplex-stimulierter Neutrophiler mit BX-795 in Konzentrationen bis 0,1 μ M konnte eine deutliche Reduktion der freigesetzten Menge an ROS im Vergleich zum Kontrollansatz gemessen werden (s. Abb. 3.1). Diese Diskrepanz lässt sich möglicherweise auf veränderte Signaltransduktionen

mit veränderter Zellantwort bei Tumorzellen zurückführen.

Neben dem PKC- und AKT-Signalweg werden durch die Blockade von PDK1 möglicherweise auch andere beeinflusst, die eine Alteration der ROS-Freisetzung zur Folge haben. In T-Zellen wird durch PDK1-Blockade beispielsweise die NF- κ B-Antwort beeinträchtigt¹⁷². Möglicherweise hat der NF- κ B-Signalweg ebenfalls einen Einfluss auf die ROS-Freisetzung oder anderer Mediatoren und Zytokine, welche das Krankheitsbild der EBA oder anderer entzündlicher Autoimmunerkrankungen hervorrufen.

Im *in vivo* Versuch war vor allem bei der klinischen Betrachtung der Ohren eine verringerte Ausprägung der EBA-Symptome in der BX-795-Behandlungsgruppe zu erkennen, die auf eine geringere ROS-Freisetzung hindeutet. Diese Beobachtungen spiegeln sich allerdings kaum in Unterschieden der Ohrdicke und der histologische Auswertung betreffend wider. Eine deutlich geringere Einwanderung von Zellen auf dem Boden der von Yagi beschriebenen Reduktion von Chemotaxis und Migration bei PDK1-Inhibierung kann nicht festgestellt werden. In der Kontrollgruppe ist die klinische Ausprägung der EBA von kaum veränderten Ohren bis zu Läsionen, die etwa 50% der Ohrfläche betreffen, sehr breit gestreut. Wiederholungen der Versuche bzw. weitere Untersuchungen dieses Wirkstoffes bezüglich seiner genauen Beeinflussung der Signalkaskaden in neutrophilen Granulozyten sind notwendig.

Auch c-Met, ein Tyrosin Kinase Rezeptor, der durch **PHA-665752** blockiert werden kann, steht mit dem PI3K-Signalweg in Verbindung¹⁸⁶. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Blockade von c-Met und der ROS-Freisetzung aus Neutrophilen wurde meines Wissens bisher noch nicht untersucht. Jedoch scheint c-Met bei der Rekrutierung der Neutrophilen aus dem Knochenmark und ihrer transendothelialen Migration Einfluss zu nehmen, ohne dass antitumoröse Funktionen der Neutrophilen eingeschränkt werden¹⁹². Andere Untersuchungen zeigten bei Aktivierung, nicht bei Blockade der c-Met eine gesteigerte Freisetzung antiinflammatorischer Mediatoren und Zytokine¹⁹¹, was die insgesamt komplexen und vom zellulären sowie intrazellulären Kontext abhängigen Regulationsmechanismen durch c-Met verdeutlicht²⁵⁴. Die Verknüpfung von c-Met zu anderen Signalkaskaden, wie der PI3K/Akt- oder der Ras/MAPK-Kaskade (zusammengefasst in²⁵⁴) lässt vermuten, dass eine fehlende Aktivierung von c-Met in Neutrophilen eine geringere ROS-Freisetzung zur Folge hat. Bei den *in vitro* Versuchen zur ROS-Freisetzung wurde diese bei Zugabe von 10 μ M konzentriertem PHA-665752 deutlich reduziert (s. Abb. 3.1). Im Modell der lokalen EBA konnte vor allem am zweiten Tag ein Rückgang der Ohrschwellung bei mit PHA-665752 behandelten Tieren beobachtet werden. Am deutlichsten konnten Unterschiede bei der Infiltration von Entzündungszellen zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe in der Auswertung der HE-gefärbten Gewebesthistologien gesehen werden. Die stärkere Infiltration bei der Kontrollgruppe unterstützt die Erkenntnisse von Glodde, dass c-Met Einfluss auf die transendotheliale Migration der Granulozyten nimmt und dass durch die c-Met-Blockade die Migration inhibiert wird¹⁹².

NU7441 inhibiert die DNA-PK, die bis dato eher Aufmerksamkeit in der Krebsforschung erhielt^{194;195;255}. Ein Einfluss auf immunologische Regulationsmechanismen im Sinne einer Freisetzung inflammatorisch wirkender Mediatoren und Zytokine über den NF- κ B-Signalweg wurde jedoch auch beschrieben²⁵⁶. Die DNA-PK erkennt pathogene virale oder bakterielle Proteine und DNA sowie körpereigene veränderte oder geschädigte DNA-Bestandteile über die PAMPS (pathogen-associated molecular patterns). Durch Induktion von IFN β , Zytokinen und Chemokinen ruft die Aktivierung der DNA-PK eine Immunantwort hervor¹⁹⁸. Die Blockade der DNA-PK könnte im *in vivo* Modell zu einer reduzierten Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren und damit zu geringerer Migration und Aktivierung der Neutrophilen geführt haben, was wiederum eine verringerte Symptomausprägung der EBA zur Folge hat. Neben dieser indirekten Wirkung zeigte NU7441 *in vitro* auch einen direkten Einfluss auf die Neutrophilen. Es kam zu einer deutlichen Verringerung der ROS-Freisetzung (s. Abb. 3.1). In einem zellfreien Ansatz kann durch NU4771 in Konzentrationen ab 5 μ M auch die PI3K inhibiert werden¹⁹³, sodass ein wie bei den PI3-Kinase-Inhibitoren beschriebener Mechanismus ebenfalls zu dem Ergebnis führen könnte. Wie genau die Signalkaskade, die direkt die ROS-Freisetzung betrifft, abläuft, muss daher noch weiter untersucht werden.

Propranolol ist ein sogenannter nicht-selektiver β -Blocker, der im klinischen Alltag v.a. bei kardialen Erkrankungen häufig eingesetzt wird^{200–203}. In meiner Arbeit wurde er für autoimmune Dermatosen, im Speziellen für EBA, als Behandlungsoption näher untersucht.

β 2-Rezeptoragonisten führen zur Aktivierung der Src-Tyrosin Kinasen, Ras und MAPK^{209;210}, die wiederum die Aktivierung verschiedener Signalwege wie Raf/MEK/ERK und PI3K/AKT zur Folge haben. Zellproliferation und -überleben wird so reguliert²¹¹. Die Blockade des β 2-Rezeptors führt zu einer verringerten Expression des Wachstumsfaktors VEGF (reviewed²⁰⁶) und zu einer verminderten Freisetzung von MMP²¹¹. Gerade die verminderte Freisetzung von MMP ist in der Betrachtung für EBA ein interessanter Effekt, da sie neben ROS zur Schädigung des Gewebes beitragen²³.

Gegensätzlich dazu zeigte sich bei Stimulation des β 2-Rezeptors in anderen Untersuchungen eine reduzierte Neutrophilenmigration durch geringere Ausprägung von ICAM-1 und VCAM-1, wie auch geringere Level proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, was insgesamt eine anti-entzündliche Wirkungsweise widerspiegelt²⁵⁷. Jedoch können β -Agonisten unter bestimmten Bedingungen ebenfalls zur Entwicklung eines proinflammatorischen Milieus beitragen²⁵⁸. Berichte über β -Blocker induzierte Psoriasis lassen auf eine verstärkte Proliferation, Motilität und Aktivität von Lymphozyten, Neutrophilen und Makrophagen durch Blockade der β -Rezeptoren schließen^{259;260}.

All diese Untersuchungen zeigen unter Beteiligung unterschiedlicher Zelltypen die offensichtlich sehr komplexen zellulären Mechanismen, die durch Stimulation bzw. Blockade der β -Rezeptoren in Gang gesetzt werden. Es bestehen noch immer Wissenslücken über die genauen Wirkmechanismen von Propranolol. Neben der β -Rezeptor-Blockade wird auch über

eine Beeinflussung von α - oder Serotonin (5HT)-Signalwegen nachgedacht (zusammengefasst²⁰⁶).

Anhand der Ergebnisse meiner Arbeit lassen sich kaum spezifischere Aussagen über die genaue Wirkungsweise von Propranolol treffen. Im ROS-Freisetzungsversuch konnte die Behandlung mit Propranolol die Menge an ROS aus stimulierten humanen neutrophilen Granulozyten reduzieren. Eine statistische Signifikanz ergab sich allerdings nur in der ersten Analyse mit dem One-way ANOVA-Test und in der höchsten Konzentration von 10 μ M. Aufgrund anderer, noch nicht veröffentlichter, Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, die ebenfalls zu einer verringerten ROS-Freisetzung führten, habe ich Propranolol im Tierversuch getestet. Im lokalen Modell der EBA konnte durch Behandlung mit Propranolol eine geringere Ausprägung von Schwellung, Rötung und Krustenbildung in der Interventionsgruppe erzielt werden. Diese Beobachtung könnte sich auf eine antiinflammatorische Reaktion durch Blockade des β -Rezeptors zurückführen lassen. Die über β -Rezeptoren stimulierten Src-Tyrosin Kinasen, Ras- und MAP-Kinasen, mit anschließender Aktivierung von Raf/MEK/ERK- und PI3K/Akt-Signalkaskaden, spielen bei der Entstehung von EBA eine entscheidende Rolle (reviewed¹³⁷). Wird der β -Rezeptor nun durch Propranolol blockiert, müsste im Umkehrschluss das Ausbleiben der eben genannten Signalkaskadenaktivierung zu verringerter ROS-Freisetzung und damit zur Abmilderung der EBA-Symptome führen. Inwiefern aber lediglich die Blockade der Neutrophilen ausschlaggebend für die *in vivo* gesehene Verbesserungen der EBA ist, oder ob die *in vitro* gemessene ROS Reduktion durch andere Wirkmechanismen der β -Blocker überlagert wird, muss in weiteren Untersuchungen verifiziert werden.

Die anderen *in vivo* getesteten Wirkstoffe, **Nilotinib** (gegen Bcr-Abl gerichtet), **MK-2206 2HCl** (gegen AKT gerichtet) und **Ehop-016** (gegen Ras GTPase gerichtet) konnten bei präventiver Anwendung keine abmildernde Wirkung auf die Symptome der lokal hervorgerufenen EBA erzielen.

Bisher v.a. in der Leukämieforschung eingesetzt, bietet sich **Nilotinib** mit seiner Blockade des Bcr-Abl Fusionsproteins und damit einhergehend verminderter Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden, wie PI3K oder AKT,²¹³ ebenfalls an bezüglich seiner Wirkung auf Neutrophile und die ROS-Freisetzung untersucht zu werden. Die Regulation der NADPH-Oxidase, die mit der Synthese von ROS einhergeht, kann durch c-Abl beeinflusst werden²⁶¹, was sich durch die *in vitro* Untersuchungen bestätigen ließ. Die Hemmung des Bcr-Abl Fusionsproteins durch Nilotinib ab Konzentrationen von 1 μ M führte zu einer deutlich reduzierten ROS-Freisetzung aus Immunkomplex-aktivierten Neutrophilen (s. Abb. 3.1). C-Abl hat außerdem Anteil an der β -Intergin-abhängigen Migration der Zellen, denn die Hemmung von c-Abl führte zu reduzierter Zelleinwanderung²¹⁷. Besonderes Augenmerk bei diesen Effekten liegt auf der Assoziation zwischen c-Abl und den Tyrosinkinase der Src-Familie (Fgr, Hck, Lyn) und SYK^{217;262}, welche an der Regulation der Neutrophilenmigration sowie der Synthese und Freisetzung von ROS beteiligt sind⁹⁸.

Nilotinib wies eine gute Absorption und Bioverfügbarkeit des oral verabreichten Medikaments ohne nachweisliche Toxizität auch in hohen Dosen²¹² und eine in klinischen Phase II Studien gemessene Halbwertszeit (HWZ) von 15 Stunden auf²⁶³. Bei starker inhibitorischer Wirkung *in vitro* auf leukämisch veränderte myeloide Progenitorzellen ($IC_{50} < 30$ nM) werden gesunde Zellen in ihrer Aktivität und Proliferation erst ab Konzentrationen von 1 μ M gehemmt²¹². Neben der Bcr-Abl Blockade führt Nilotinib in zellfreien Versuchen ab Konzentrationen von 3 μ M zur Hemmung der bereits erwähnten Tyrosinkinasen der Src-Familie, c-Met, PKA oder PKB²¹². Daher könnte der Wirkstoff mit Anwendung höherer Konzentrationen über zusätzliche Blockade dieser Signalwege *in vivo* möglicherweise zu einer deutlicheren Reduktion der Neutrophilenfunktion führen und damit zur Verringerung der lokal induzierten EBA-Symptome.

MK-2206 hemmt AKT und hat neben einer auf Tumorstadium reduzierenden Wirkung auch Einfluss auf Regulationsmechanismen des Immunsystems^{181;182}. Bei Entzündungsgeschehen ist der AKT Signalweg in Neutrophilen in die Synthese proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, in die Zellrekrutierung und die NADPH gesteuerte ROS Generierung involviert¹⁸¹. Vor allem die AKT2-Isoform, die zusammen mit AKT1 und AKT3 von MK-2206 blockiert wird, scheint für die Bereitstellung von ROS über die NADPH-Oxidase essentiell zu sein²⁶⁴.

Die Ergebnisse des *in vitro* Versuchs zeigen eine deutliche ROS Reduktion in Konzentrationen von 1 μ M und 10 μ M. Möglicherweise lässt sich eine AKT2 Blockade, die für die NADPH-Oxidase-Aktivierung und ROS-Produktion ausschlaggebend ist als AKT1/3, lediglich in diesen höheren Konzentrationen erzielen. Im Gegensatz zu den *in vitro* Ergebnissen konnte *in vivo* keine relevante Symptommilderung durch Behandlung mit 120 mg/kg KG MK-2206 erzielt werden. Klinische Studien ergaben zwar eine relativ langsame Absorption von MK-2206 (4-10 Stunden)²⁶⁵, dafür aber eine lange, z.T. variable HWZ im Körper (60-90 Stunden)¹⁷⁹. Um *in vivo* eine der *in vitro* vergleichbaren Hemmung der AKT zu erzielen, müssten bei Patienten Plasmakonzentrationen von 100-150 nM erreicht werden, was nur bei Überschreiten der maximal tolerierten Dosis möglich wäre²⁶⁶. Ein Plasmaspiegel von MK-2206 hat sich aufgrund der langen HWZ bei den Mäusen vor Injektion des AK zwar wahrscheinlich aufgebaut, möglicherweise war die Konzentration, wie bei den klinischen Studien, dennoch zu gering, um AKT2 in den Neutrophilen zu blockieren. Denkbar wäre auch, dass die alleinige Blockade der intrazellulär gelegenen AKT-Kinase nicht effizient genug für die Reduktion der ROS-Freisetzung ist. Denn auch in der Krebsforschung konnte ein signifikant positiver Behandlungseffekt lediglich bei Anwendung in Kombinationstherapie mit anderen Zytostatika, nicht aber in Monotherapie mit MK-2206 erzielt werden²⁶⁷. Die Kombination dieses Wirkstoffes mit einem anderen, beispielsweise einem PI3K-Inhibitor, bezüglich seiner Wirkung auf die ROS-Freisetzung *in vitro* und Symptomminderung *in vivo* erneut zu testen, könnte eine nächste Überlegung sein.

EHop-016 inhibiert die Rac-GTPase, genauer die Rac1- und Rac3-GTPase¹⁸³. Untersuchungsergebnissen zufolge kann dadurch vor allem die Migration und Invasion von Krebszellen *in*

*vitro*¹⁸³ und bei Behandlung von Mäusen mit 25 mg/kg KG das Tumorstadium *in vivo* minimiert werden¹⁸⁴. Bei meinem Versuch wurden die Tiere zweimal täglich mit 12 mg/kg KG behandelt, da eine höhere Konzentration des Wirkstoffes im Lösungsmittel nicht erzielt werden konnte. Ein schwach positiver Effekt auf die Symptomausprägung der EBA könnte auf einen unzureichend hohen Wirkspiegel von EHOp-016 zurückzuführen sein, denn auch im *in vitro* Versuch konnte eine statistisch signifikante Reduktion der ROS-Freisetzung nur bei 10 μ M erzielt werden. Der bereits erwähnte IC₅₀-Wert von 1,1 μ M (s. Kap. 3.2.7) bezieht sich auf Brustkrebszellen, was eine evtl. höhere Konzentration für gesunde Zellen erklärt. Hinzu kommt eine relativ kurze HWZ von 3,8 bis 5,7 Stunden bei i.p.-Gabe²⁶⁸, die bei zweimaliger Gabe am Tag überschritten wurde. Nach der Gabe scheint das Medikament schnell eliminiert zu werden, sodass es bei sehr geringer Konzentration des Medikaments im Plasma zu keiner Spiegelbildung kam²⁶⁸. Während EHOp-016 spezifisch Rac1 und Rac3 inhibiert, ist die Isoform Rac2 wesentlich an der Aktivierung der NADPH-Oxidase und damit der ROS-Freisetzung beteiligt¹⁸⁵. Bei höher konzentrierter Behandlung der Mäuse könnte durch EHOp-016 die über Rac1 gesteuerte Migration der Neutrophilen¹⁸⁵ möglicherweise verringert werden, ein direkter Einfluss auf die ROS-Freisetzung ohne zusätzliche Blockade von Rac2 ist allerdings unwahrscheinlich.

Als Inhibitor der p38 MAPK könnte **PH-797804** bedeutend für die Behandlung entzündlicher Erkrankungen sein, da die p38 MAPK-Signalkaskade eine zentrale Rolle in der Entwicklung entzündlicher Autoimmunerkrankungen, wie z.B. Morbus Crohn, Psoriasis, RA und EBA, einnimmt^{176;177}. Durch orale Behandlung von COPD-Patienten mit PH-797804 konnte nach LPS-Inhalation eine geringere Migration Neutrophiler in das Lungengewebe gezeigt werden¹⁷⁸. Die Beteiligung der p38 MAPK am sogenannten respiratory burst konnte durch Behandlung von TNF- α - oder GM-CSF-aktivierten humanen neutrophilen Granulozyten mit SB203580 gezeigt werden, da eine signifikante Reduktion der H₂O₂- und ROS-Produktion die Folge war^{55;127}. Die alleinige Inhibition der MAPK α -Untereinheit durch PH-797804 bewirkte bei den *in vitro* Versuchen mit Immunkomplex-aktivierten humanen Neutrophilen eine signifikante Reduktion der ROS-Freisetzung, auch in der geringen Konzentration von 0,1 μ M (s. Abb. 3.1). Diese Ergebnisse konnten sich im Tiermodell allerdings nicht verifizieren lassen. Eine Verbesserung der Symptome im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte nach täglich zweimaliger p.o. Gabe von 1mg/kg KG nicht festgestellt werden. Insgesamt ist eine relativ breite Streuung der Ergebnisse zu erkennen. Dies betrifft vor allem die Werte der am zweiten Tag gemessenen Ohrdicke sowie die histologisch ausgewerteten Ergebnisse (s. Abb. 3.14).

In anderen Studien konnte die Behandlung von Mäusen mit PH-797804 eine antiinflammatorische Wirkung über verringerte Freisetzung chemotaktisch wirksamer Zytokine hervorrufen, welche eine geringere Infiltration von Entzündungszellen, wie neutrophilen Granulozyten, zur Folge hatte¹⁷⁵. Eine direkte Wirkung auf die ROS-Freisetzung *in vivo* wurde nicht beschrieben. Ob aufgrund der *in vitro* Reduktion der ROS-Freisetzung oder durch verringerte Migration,

hätte ich einen mildernden Effekt auf die Entstehung EBA-spezifischer Symptome im lokalen Mausmodell erwartet. Warum dies bei den *in vivo* Versuchen nicht der Fall ist, ist derzeit unbekannt. Eine langsame Absorption des Medikaments, aber eine dafür lange *in vivo* HWZ¹⁷⁵ machen eine nicht ausreichende Konzentration eher unwahrscheinlich. Möglicherweise hat PH-797804 aufgrund der Lösung oder der Lagerung für den *in vivo* Versuch an Wirksamkeit verloren.

Zur Klärung, warum das Medikament im Vergleich zum *in vitro* Versuch eine derart geringe Wirkung zeigte, sollten weitere Untersuchungen angestrebt werden, die den genauen Wirkmechanismus der über die α -Untereinheit der MAPK gesteuerten Signalkaskade in Neutrophilen umfassen. Außerdem sollte der Wirkstoff PH-797804 möglicherweise auf einem anderen Applikationsweg oder in einer anderen Trägersubstanz gelöst und erneut im lokalen *in vivo* Modell untersucht werden.

Alle weiteren Wirkstoffe, die bei den *in vitro* Testungen einen statistisch signifikanten Rückgang der freigesetzten ROS mit sich brachten, konnte ich aufgrund unzureichender Lösungseigenschaften nicht bezüglich ihrer Wirksamkeit im *in vivo* Modell untersuchen. Jedoch sollte die Erforschung einiger dieser Wirkstoffe in Hinblick auf mögliche neue Therapieansätze für EBA in Betracht gezogen werden.

Beispielsweise spielt SYK bei immunmodulatorischen Mechanismen eine entscheidende Rolle¹²⁹. SYK^{-/-} Neutrophile waren bei Aktivierung über β 2-Integrin-Signalkaskaden nicht in der Lage zur Degranulation oder ROS-Freisetzung, während die β 2-Integrin abhängige Migration unbeeinflusst war²⁶⁹. Erst kürzlich wurde die Kinase auch als Schlüsselstruktur in der Entstehung von EBA identifiziert. Nach Stimulation durch COL7-haltige Immunkomplexe waren SYK^{-/-} neutrophile Granulozyten *in vitro* nicht in der Lage CXCL2 oder LTB4 als Zeichen einer Entzündungsamplifikation freizusetzen¹²³. Außerdem zeigten sie keine adäquate Antwort auf die Aktivierung über den Fc γ -Rezeptor in Form von Degranulation und Freisetzung von ROS¹²³, die bei der klinischen Krankheitsentwicklung von großer Bedeutung sind. SYK-defiziente Mäuse wiesen einen vollkommenen Schutz vor AK-induzierter EBA auf^{117;123}. Daten, die von unserer Arbeitsgruppe und u.a. von mir erhoben wurden, zeigen, dass auch die pharmakologische Blockade der SYK *in vivo* dosisabhängig fast vollkommen vor der anti-COL7-induzierten EBA schützt¹¹⁷. Analysen der Signalwege Immunkomplex-aktivierter Neutrophiler zeigten bei Behandlung mit dem SYK-Inhibitor BAY61-3606 u.a. eine geringere Phosphorylierung der nachgeschalteten ERK1/2, AKT und p38. Wie bereits erwähnt, tragen diese Signalwege letztendlich zur Aktivierung der NADPH-Oxidase und zur für die Blasenbildung unerlässlichen Freisetzung von ROS bei. Der von mir verwendete Wirkstoff PRT062607¹¹⁷ inhibierte, wie auch BAY61-3606¹¹⁷, die SYK und reduzierte im ROS-Freisetzungsversuch in Konzentrationen bis 0,1 μ M die Freisetzung von ROS statistisch signifikant ($p < 0,05$) (s. Abb. 3.1).

Neben der Aktivierung durch den $\text{Fc}\gamma$ -Rezeptor können Neutrophile auch durch GM-CSF stimuliert werden. Bei der auf diese Weise aktivierten Signalkaskade sind JAK2 (Janus Kinase), Stat3 und Stat5B involviert²⁷⁰ und am Ende steht die Aktivierung der NADPH-Oxidase und Freisetzung von ROS²⁷¹. Bei meinen Versuchen wurden die neutrophilen Granulozyten nicht durch GM-CSF, sondern durch Immunkomplexe stimuliert. Eine Blockade der JAK2 durch **XL-019** konnte die Freisetzung von ROS *in vitro* deutlich reduzieren (s. Abb. 3.1), was die Beteiligung der JAK2 auch im $\text{Fc}\gamma$ -aktivierten Signalweg nahelegt. Genauere Untersuchungen, den Transduktionsweg betreffend, sollten daher für die Erforschung neuer Therapien für EBA in Betracht gezogen werden. Sowohl bei klinischen Phase I Studien zur Behandlung mit allgemeinen JAK-Inhibitoren als auch bei Anwendung des spezifischeren JAK2-Inhibitoren XL-019 wurde von Nebenwirkungen (dosisabhängige Myelosuppression; periphere und/oder zentrale Neurotoxizität) berichtet, die einen Abbruch der Untersuchungen erforderten²⁷². Untersuchungen zur topischen Anwendung des Medikamentes, die üblicherweise mit weniger starken Nebenwirkungen einhergeht, könnten weiterhin als Therapieoption der EBA in Betracht gezogen werden.

Die PLC aktiviert die PKC DAG-abhängig²⁷³. Wie bereits erläutert, ist die PKC an der Freisetzung von ROS aus neutrophilen Granulozyten beteiligt und kann durch Sotrastaurin inhibiert werden, was zur Reduktion der ROS-Freisetzung führt (s. Abb. 3.1). Die Blockade der PLC durch **U73122** bewirkte *in vitro* ebenfalls eine verringerte Menge gemessener ROS (s. Abb. 3.1), was sich anhand der Verbindung zwischen der PLC und PKC erklären lässt. Für eine weitere Validierung im Mausmodell ließ sich der Wirkstoff leider nicht lösen.

Das Bindeglied DAG zwischen der PLC und PKC wird normalerweise über die DAG-Kinase abgebaut. Die Blockade dieser Kinase führte *in vitro* zu einer gesteigerten Freisetzung von ROS. Der verminderte Abbau von DAG und eine dadurch verstärkt stimulierte PKC machen die gesteigerte ROS-Freisetzung möglicherweise plausibel²⁷⁴.

Eine Reduktion von ROS aus neutrophilen Granulozyten durch Inhibition von HSP90, wie sie Tukaj beschrieb¹³⁸, konnte ich durch meine Versuche nicht reproduzieren. Möglicherweise ist dies durch den unterschiedlichen Wirkstoff zu erklären, der bei Tukaj (17-DMAG) alle Untereinheiten, bei mir (NVP-BEP800) jedoch lediglich die β -Untereinheit blockierte. Unabhängig von einer möglicherweise direkten Wirkung auf die ROS-Freisetzung der Neutrophilen erzielte sowohl die systemische^{88;138} als auch die lokale²⁷⁵ Applikation des HSP90-Blockers 17-DMAG im Mausmodell einer systemisch induzierten EBA einen deutlich mildereren Krankheitsverlauf, beruhend auf der Inhibition autoreaktiver T- und B-Zellen sowie einem weniger intensiven Entzündungszellinfiltrat aus Neutrophilen an der DEJ^{88;138;275}.

Generell lässt sich ein aufgrund limitierter Ressourcen verhältnismäßig kleiner Stichprobenumfang von je 4 Blutspendern *in vitro* bzw. je 5 Mäusen ($n=10$, da Untersuchung an je beiden

Ohren der Maus) *in vivo* zur Untersuchung der Medikamente diskutieren, da mit kleinen Stichprobengruppen größere statistische Variabilität einhergeht.

Die Untersuchungen zur ROS-Freisetzung als Grundlage für eine mögliche Wirksamkeit der STIs gegen EBA ist sinnvoll, da die Neutrophilen bzw. deren Synthese von ROS gerade in der Effektorphase eine entscheidende Rolle spielen⁸⁵. Jedoch sollte sie nicht als alleiniges Merkmal betrachtet werden, da nachgewiesenermaßen auch andere Zellen, wie Makrophagen⁸⁹ und T-Zellen⁹⁵, effektiv zur Krankheitsentstehung in der Effektorphase beitragen. Das bedeutet, dass auch im lokalen Modell der EBA, das v.a. die frühe Phase der Krankheitsentstehung berücksichtigt, nicht nur Neutrophile, sondern eben auch Makrophagen und T-Zellen zur Symptomausbildung beitragen. Folglich sollte die Wirkung der STIs auch auf diese Zellen beachtet werden. Diesbezüglich ist auch die Verwendung bzw. der Vergleich zwischen *in vitro*- und *in vivo*-Testung der STIs in zwei unterschiedlichen Systemen zu diskutieren. *In vitro* wird die Wirkung der Substanzen in einem isolierten Zellsystem, bestehend aus neutrophilen Granulozyten untersucht, während bei *in vivo* Anwendung ein komplexer Organismus zu Grunde liegt. Hier muss die Wirksamkeit nicht nur auf einen bestimmten, sondern auf mehrere Zelltypen beachtet werden. Außerdem sind Bioverfügbarkeit und die Halbwertszeit für die Wirksamkeit von Medikamenten in einem Organismus entscheidend. Die *in vitro* Versuche fanden mit humanen neutrophilen Granulozyten statt, während die Wirksamkeit *in vivo* an einem murinen Organismus getestet wurde. Mögliche Unterschiede in zellulären Prozessen, wie der Aktivierung unterschiedlicher Signalkaskaden oder anderer Effektorfunktionen, können nicht vollkommen ausgeschlossen werden²⁵³.

Die Pharmakokinetik, also Aufnahme, Bioverfügbarkeit, Verstoffwechselung und HWZ sowie Wirkung eines Medikaments kann sich zwischen den Geschlechtern unterscheiden^{276;277}. Um größere statistische Variabilität bezüglich der geschlechterspezifischen Unterscheidung auszuschließen, wurden Versuchsgruppen wenn möglich lediglich aus männlichen oder weiblichen Tieren zusammengestellt. Andernfalls wurde auf gleiche Verteilung der Geschlechter in beiden Gruppen geachtet. Bei Anwendung der Medikamente lediglich an einem Geschlecht, wird natürlich eine evtl. bessere oder schlechtere Wirksamkeit beim jeweils anderen Geschlecht nicht beachtet. Auch das Alter der Tiere kann einen Effekt auf die Pharmakokinetik haben²⁷⁸. Darüber hinaus könnte die Entwicklung des Immunsystems, welches bei Kindern z.B. weniger weit entwickelt ist als bei Erwachsenen²⁷⁹, sich auch bei jüngeren Tieren von dem älteren unterscheiden, was eine andere Wirkung der gegebenen STIs nach sich ziehen könnte. Bezüglich der Pharmakokinetik sollte über den Applikationsweg, die Häufigkeit der Anwendung und die Dauer der Behandlung nachgedacht werden. Möglicherweise wäre bei einigen Medikamenten eine längere Behandlungszeit oder eine häufigere Applikation notwendig gewesen, um ausreichende Wirkspiegel aufbauen zu können. Auf der anderen Seite steht die Behandlung mit sehr hohen Konzentrationen der STIs evtl. im Zusammenhang mit Nebenwirkungen im Sinne der Hemmung anderer, nicht spezifischer Kinasen^{179;193;212}, die Einfluss auf ROS-Freisetzung oder andere Zellantworten nehmen. Hier steht die genaue Betrachtung der

IC₅₀-Werte im Vordergrund, die sich in der Literatur teilweise lediglich auf kanzerös veränderte, nicht aber gesunde Zellen bezieht^{183;212}. Außerdem muss die Toxizität und Verträglichkeit der Medikamente v.a. in höheren Konzentrationen und in Bezug auf unterschiedliche Organismen (Maus vs. Mensch) berücksichtigt werden. In klinischen Studien kam es beispielsweise bei Inhibition der p38 MAPK durch kleine Moleküle vermehrt zu Nebenwirkungen, die den Abbruch der Studien erforderten²³⁴.

Bei der Auswertung der klinischen Parameter (Messung der Ohrdicke) und der Auswertung der Gewebshistologien werden unterschiedliche, nicht spezifische Auswirkungen einer Entzündungsreaktion betrachtet. Die Ohrschwellung ist bspw. nicht ausschließlich durch Neutrophileneinwanderung mit ROS-Freisetzung zu erklären. Unabhängig vom AK führt jegliche Injektion zu einer mastzellabhängigen Ödementwicklung²⁸⁰. Die genaue Zuordnung der Gewebshistologien (HE-Färbungen) zu Werten von 0-3 anhand der Bewertungsskala, die Verdickung der Epidermis, Zellweininwanderung und Spaltbildung umfasst, ist teilweise schwierig und nicht vollständig objektivierbar. Außerdem kann es beim Schneiden der Gewebeproben dazu kommen, dass ein nicht-repräsentativer Abschnitt im Sinne eines insgesamt zu starken Befalls oder anders herum abgebildet wird.

4.0.1 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Optionen zur symptomatischen Behandlung der Autoimmundermatose EBA untersucht. Neben *in vitro* Experimenten zur Testung der Effizienz unterschiedlicher Wirkstoffe auf die Reduktion der ROS-Freisetzung durch aktivierte neutrophile Granulozyten wurden die *in vitro* vielversprechenden Medikamente im Tiermodell untersucht. Dabei handelte es sich um ein Mausmodell mit Induktion einer lokalen EBA durch intradermale Injektion eines AK gegen COL7.

Um die *in vivo* wirksamen Medikamente tatsächlich als Behandlungsmöglichkeit der EBA-Symptome in Erwägung ziehen zu können, müssen weitere Untersuchungen angeschlossen werden. Dazu zählt z.B. die Testung im systemischen Modell, bei dem der anti-COL7-AK nicht lokal, sondern systemisch, also i.p., gespritzt wird. Vom prophylaktischen Versuchsansatz sollte auf den therapeutischen gewechselt werden, um die Wirkung der Medikamente nach entstandener Krankheitsausbildung im aktiven Modell der EBA zu testen. In diesem Falle stünde nicht nur die lokale Bedeutung der Neutrophilen, sondern auch die Einflussnahme anderer Immunzellen, wie beispielsweise B- und T-Zellen, im Fokus. Außerdem sollte über die Verabreichung der Wirkstoffe in unterschiedlichen Konzentrationen nachgedacht werden, um die geringste noch wirksame Konzentration mit dem geringsten Nebenwirkungsprofil zu finden. Sobald systemisch wirksame Wirkstoffe identifiziert werden konnten, kann die Untersuchung einer topischen Applikation in Erwägung gezogen werden, da bei transdermaler, topischer Anwendung meist geringere Nebenwirkungen als bei systemischer Gabe auftreten.

Alle Autoimmunerkrankungen gehen mit der Synthese von Auto-AK einher und können durch Immunkomplexbildung ähnliche Signalkaskaden wie bei der EBA in Gang setzen. Medikamente, die sich in der Behandlung von EBA als wirksam erweisen, könnten daher auch einen mildernden Effekt bei Erkrankungen desselben Formenkreises, wie BP, PV, RA etc. haben. Um darüber hinaus genauere Erkenntnisse zum Pathomechanismus der EBA zu erlangen, sollten die Signalkaskaden der neutrophilen Granulozyten weiter erforscht werden. An welchen Positionen befinden sich die Schaltstellen, die zur Freisetzung proinflammatorisch und chemotaktisch wirksamer Zytokine, ROS oder der ebenfalls bei EBA schädigend wirkenden Elastase führen? Die Blockade welches Transduktionsweges ist die gewinnbringendste in der Therapie klinisch manifester Autoimmundermatosen, wie EBA? Die Kenntnis über ein genaues Netzwerk der sich jeweils beeinflussenden Signalkaskaden und der entsprechenden Gene kann letztendlich hilfreich zum Verständnis der Pathomechanismen sein. Analysen mittels Western-Blot und Profilen der Genomexpression tragen zur Vervollständigung dieses Netzwerkes bei und sollten daher weiter ergänzt werden.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es neue Erkenntnisse zu Funktionsweisen der Signalkaskaden Immunkomplex-aktivierter neutrophiler Granulozyten im Hinblick auf spezifische Behandlungsmethoden der Autoimmundermatose Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) zu gewinnen. Immunkomplexe insbesondere aus IgG-AK und dem in der Haut vorkommenden Autoantigen COL7 aktivieren bei der EBA neutrophile Granulozyten. Diese setzen daraufhin, getriggert über unterschiedliche Signaltransduktionswege, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) frei, welche letztendlich zur Zerstörung der Hautintegrität durch Spalt- und Blasenbildung an der dermo-epidermalen Junktionszone führen. 33 Substanzen mit inhibierender Wirkung auf Kinasen unterschiedlicher Signalkaskaden wurden *in vitro* bezüglich ihrer Wirkung auf die ROS-Freisetzung durch die als Haupteffektorzellen geltenden, Immunkomplex-aktivierten neutrophilen Granulozyten untersucht. Elf Medikamente, die *in vitro* zu statistisch signifikant verringerten Mengen freigesetzter ROS führten, wurden im Tiermodell der lokal induzierten EBA hinsichtlich ihrer Effizienz die Erkrankungssymptome wie Blasen- und Krustenbildung zu verhindern getestet. Sechs Wirkstoffe führten zu leicht bis deutlich milderer Krankheitsausprägungen. Sie könnten aufgrund ihres spezifischeren Angriffspunktes als Therapieoptionen der EBA für weitere Untersuchungen in Erwägung gezogen werden. GDC-0941 (PI3K α/δ) sowie PHA-665752 (Rezeptortyrosinkinase c-Met) führten *in vivo* klinisch zu deutlich weniger stark ausgeprägten Symptomen der EBA, was sich histologisch bestätigen ließ. Sotrastaurin (PKC δ) wirkte v.a. einer Schwellung der von EBA betroffenen Hautstellen (Ohren) entgegen. NU-7441 (DNA-PK) wie auch Propranolol (β Rezeptor) führten im Mausmodell der lokalen EBA zu einer verringerten klinisch sichtbaren Ausprägung der Erkrankung. Bei Anwendung von BX-795 (PDK-1) war die sichtbar von Schädigung betroffene Oberfläche geringer. In der Ohrdicke oder der histologisch erkennbaren Entzündungsreaktion ließ sich kein Unterschied zwischen beiden Gruppen feststellen.

Die in dieser Arbeit untersuchten Wirkstoffe könnten als Grundlage für weitere Forschung an neuen Therapieansätzen zur Behandlung der EBA und möglicherweise anderer Auto-AK-vermittelter Erkrankungen dienen. Weitere Untersuchungen bezüglich der Wirksamkeit in anderen systemischen *in vivo* Modellen sind notwendig sowie eine lückenlosere Erforschung der Signaltransduktionswege bzw. deren Schaltstellen, die zur Genese der EBA und anderer Autoimmunerkrankungen führen.

Literaturverzeichnis

- [1] FRATER, Harald und ALBAT, Daniela: *Woher kommt Haut / Workherkunft von Haut*. <https://www.wissen.de/wortherkunft/haut>, besucht: 2018-02-04.
- [2] KÖNIGSHOFF, Melanie und BRANDENBURGER, Timo: *Immunsystem*. In: *Biochemie Kurzlehrbuch*, Kapitel 12, Seite 347 f. Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2004.
- [3] SADIK, Christian, ZILLIKENS, Detlef und HERTL, Michael: *Bullöse Autoimmundermatosen*. In: PLEWIG, Gerd, RUZICKA, Thomas, KAUFMANN, Roland und HERTL, Michael (Herausgeber): *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie*, Kapitel 49, Seiten 839–873. Springer, Berlin, Heidelberg, 7. Auflage, 2018.
- [4] MONTAGNA, William. und PARAKKAL, Paul F.: *An Introduction to Skin*. In: *The Structure and Function of Skin*, Kapitel 1, Seite 1 ff. Academic Press, 1974.
- [5] LÜLLMANN-RAUCH, Renate: *Haut und Hautanhangsgebilde*. In: *Histologie Taschenlehrbuch*, Kapitel 22, Seiten 519–526. Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2. Auflage, 2006.
- [6] SCHNEIDER, S.W.: *Haut*. In: SPECKMANN, E.J., HESCHELER, J. und KÖHLING, R. (Herausgeber): *Physiologie*, Seiten 629–635. Elsevier GmbH, München, 6. Auflage, 2013.
- [7] LAUFFER, F. und RING, J.: *Das Immunsystem der Haut*. Aktuelle Rheumatologie, 40:118–123, 2015.
- [8] SCOTT, Danny W. und MILLER, William H. (William Howard): *Structure and Function of the Skin*. In: *Equine Dermatology*, Kapitel 1, Seite 17. Saunders - Elsevier, München, 2. Auflage, 2011.
- [9] SITARU, Cassian: *Blasen bildende Autoimmundermatosen*, 2005. <https://docplayer.org/20004191-5-1-blasen-bildende-autoimmundermatosen.html>, besucht: 2016-03-01.
- [10] ABRAHAMSON, Dale R.: *Recent studies on the structure and pathology of basement membranes*. Journal of Pathology, 149:257–278, 1986.

- [11] BIEBER, K., SUN, S., ISHII, N., KASPERKIEWICZ, M., SCHMIDT, E., HIROSE, M., WESTERMANN, J., YU, X., ZILLIKENS, D. und LUDWIG, R. J.: *Animal models for autoimmune bullous dermatoses*. Experimental Dermatology, 19:2–11, 2010.
- [12] MOHR, Peter: *Der Aufbau der Haut*. <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/hautkrebs/der-aufbau-der-haut.html>, besucht: 2017-09-30.
- [13] SCHMIDT, Enno und ZILLIKENS, Detlef: *The diagnosis and treatment of autoimmune blistering skin diseases*. Deutsches Ärzteblatt international, 108:399–405, 2011.
- [14] WOODLEY, David T., CHANG, Carl, SAADAT, Payam, RAM, Ramin, LIU, Zhi und CHEN, Mei: *Evidence that anti-type VII collagen antibodies are pathogenic and responsible for the clinical, histological, and immunological features of epidermolysis bullosa acquisita*. Journal of Investigative Dermatology, 124:958–964, 2005.
- [15] ISHII, Norito, HAMADA, Takahiro, DAINICHI, Teruki, KARASHIMA, Tadashi, NAKAMA, Takekuni, YASUMOTO, Shinichiro, ZILLIKENS, Detlef und HAHIMOTO, Takashi: *Epidermolysis bullosa acquisita: What's new?* Journal of Dermatology, 37:220–230, 2010.
- [16] GUPTA, Rishu, WOODLEY, David T und CHEN, Mei: *Epidermolysis bullosa acquisita*. Clinics in Dermatology, 30:60–9, 2013.
- [17] SCHMIDT, Enno und ZILLIKENS, Detlef: *Pemphigoid diseases*. The Lancet, 381:320–332, 2013.
- [18] ELLIOT, G.T.: *Two cases of epidermolysis bullosa*. Journal of Cutaneous and Genito-Urinary Diseases (Chicago), 13:10–18, 1895.
- [19] WOODLEY, David T., BRIGGAMAN, Robert A., O'KEEFE, Edward J., INMAN, Alfred O., QUEEN, Laurinda L. und GAMMON, W. Ray: *Identification of the Skin Basement-Membrane Autoantigen in Epidermolysis Bullosa Acquisita*. New England Journal of Medicine, 310:1007–1013, 1984.
- [20] BRIGGAMAN, Robert A. und WHEELER, Clayton E.: *The Epidermal-Dermal Junction*. Journal of Investigative Dermatology, 65:71–84, 1975.
- [21] BRIGGAMAN, Robert A., GAMMON, W. Ray und WOODLEY, David T.: *Epidermolysis Bullosa Acquisita of the Immunopathological Type (Dermolytic Pemphigoid)*. Journal of Investigative Dermatology, 85:79–84, 1985.

- [22] BERTRAM, Franziska, BRÖCKER, Eva B., ZILLIKENS, Detlef und SCHMIDT, Enno: *Prospective analysis of the incidence of autoimmune bullous disorders in Lower Franconia, Germany*. Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 7:434–439, 2009.
- [23] LUDWIG, Ralf J: *Clinical presentation, pathogenesis, diagnosis, and treatment of epidermolysis bullosa acquisita*. ISRN Dermatology, 2013:812029, 2013.
- [24] MAYUZUMI, M., AKIYAMA, M., NISHIE, W., UKAE, S., ABE, M., SAWAMURA, D., HASHIMOTO, T. und SHIMIZU, H.: *Childhood epidermolysis bullosa acquisita with autoantibodies against the non-collagenous 1 and 2 domains of type VII collagen: a case report and a review of the literature*. British Journal of Dermatology, 155:1084–1052, 2006.
- [25] KIM, Jong Hoon, KIM, Yeon Hee und KIM, Soo Chan: *Epidermolysis Bullosa Acquisita: A Retrospective Clinical Analysis of 30 Cases*. Acta Dermato-Venereologica, 91:307–312, 2011.
- [26] JOWKAR, Farideh, SADATI, Maryam S., TAVANA, Samar und AGAH, Mohammad A.: *Epidemiology of Autoimmune Bullous Diseases and Therapeutic Modalities During a 10 Year Period in Iran*. Acta Dermatovenereologica Croatica, 22:246–249, 2014.
- [27] BUIJSROGGE, Jacqueline J. A., DIERCKS, Gilles F. H., PAS, Hendri H. und JONKMAN, Marcel F.: *The many faces of epidermolysis bullosa acquisita after serration pattern analysis by direct immunofluorescence microscopy*. British Journal of Dermatology, 165:92–8, 2011.
- [28] RUSSO, Irene, FERRAZZI, Anna, ZANETTI, Irene und ALAIBAC, Mauro: *Epidermolysis bullosa acquisita in a 17-year-old boy with Crohn's disease*. British Medical Journal Case Reports, 2015:1–3, 2015.
- [29] NAVERSEN, Douglas N. und IGELMAN, J.David: *Q-switched laser management of an explosion tattoo*. Journal of the American Academy of Dermatology, 50(3):479–480, 2004.
- [30] SINGH, Gaurav und LIMAYE, Maneesha: *Epidermis bullosa acquisita in a 4-year-old hispanic boy*. International Journal Of Advances In Case Reports, 2:1114–1116, 2015.
- [31] GAMMON, W Ray, HEISE, Eugene R, BURKE, W A, FINE, J D, WOODLEY, D T und BRIGGAMAN, Robert A: *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*. Journal of Investigative Dermatology, 91:228–232, 1988.

- [32] ZUMELZU, Coralie, LE ROUX-VILLET, Christelle, LOISEAU, Pascale, BUSSON, Marc, HELLER, Michel, AUCOUTURIER, Françoise, PENDARIES, Valérie, LIÈVRE, Nicole, PASCAL, Francis, BRETTE, Marie Dominique, DOAN, Serge, CHARRON, Dominique, CAUX, Frédéric, LAROCHE, Liliane, PETIT, Antoine und PROST-SQUARCIONI, Catherine: *Black Patients of African Descent and HLA-DRB1*15:03 Frequency Overrepresented in Epidermolysis Bullosa Acquisita*. Journal of Investigative Dermatology, 131(12):2386–2393, 2011.
- [33] ROENIGK, Henry H.: *Epidermolysis Bullosa Acquisita*. Archives of Dermatology, 103:1–10, 1971.
- [34] CHEN, Mei, KIM, Gene H., PRAKASH, Lori und WOODLEY, David T.: *Epidermolysis bullosa acquisita: Autoimmunity to anchoring fibril collagen*. Autoimmunity, 45:91–101, 2012.
- [35] PALLER, Amy S., QUEEN, Laurinda L., WOODLEY, David T., LANE, Alfred T., GAMMON, W. Ray und BRIGGAMAN, Robert A.: *Organ-Specific, Phylogenetic, and Ontogenetic Distribution of the Epidermolysis Bullosa Acquisita Antigen*. Journal of Investigative Dermatology, 86:376–379, 1986.
- [36] PALESTINE, Roberta F., KOSSARD, Steven und DICKEN, Charles H.: *Epidermolysis bullosa acquisita: a heterogeneous disease*. Journal of the American Academy of Dermatology, 5:43–53, 1981.
- [37] ACLIMANDOS, W. A.: *Corneal perforation as a complication of epidermolysis bullosa acquisita*. Royal College of Ophthalmologists, Seiten 633–636, 1995.
- [38] BOH, Erin, ROBERTS, Lynne J., LIEU, Tsu San, GAMMON, W. Ray und SONTHEIMER, Richard D.: *Epidermolysis bullosa acquisita preceding the development of systemic lupus erythematosus*. Journal of the American Academy of Dermatology, 22:587–593, 1990.
- [39] GAMMON, W. Ray, WOODLEY, David T., DOLE, Kenneth C. und BRIGGAMAN, Robert A.: *Evidence That Anti-Basement Membrane Zone Antibodies in Bullous Eruption of Systemic Lupus Erythematosus Recognize Epidermolysis Bullosa Acquisita Autoantigen*. Journal of Investigative Dermatology, 84:472–476, 1985.
- [40] BARTON, David D, FINE, Jo David, GAMMON, W. Ray und SAMS JR., W. Mitchell: *Bullous systemic lupus erythematosus: an unusual clinical course and detectable circulating autoantibodies to the epidermolysis bullosa acquisita antigen*. Journal of the American Academy of Dermatology, 15:369–373, 1986.

- [41] JANNIGER, Camila K, KOWALEWSKI, Cerzay, MAHMOOD, Tariq, LAMBERT, W. Clark und SCHWARTZ, Robert A.: *Detection of anti-basement membrane zone antibodies in bullous systemic lupus erythematosus*. Journal of the American Academy of Dermatology, 24:643–647, 1991.
- [42] GAMMON, W R und BRIGGAMAN, R A: *Epidermolysis bullosa acquisita and bullous systemic lupus erythematosus. Diseases of autoimmunity to type VII collagen*. Dermatologic Clinics, 11:535–47, 1993.
- [43] CAMISA, Charles und SHARMA, Haft M.: *Vesiculobullous systemic lupus erythematosus*. Journal of the American Academy of Dermatology, 9:924–933, 1983.
- [44] CAMISA, Charles: *Vesiculobullous systemic lupus erythematosus. A report of four cases*. Journal of the American Academy of Dermatology, 18:93–100, 1988.
- [45] SHIRAHAMA, Shigeo, FURUKAWA, Fukumi, YAGI, Hirokaki, TANAKA, Toshihiro, HASHIMOTO, Takashi und TAKIGAWA, Masahiro: *Bullous systemic lupus erythematosus: detection of antibodies against noncollagenous domain of type VII collagen*. Journal of the American Academy of Dermatology, 38:844–848, 1998.
- [46] LOHI, Jouni, LEIVO, Ilmo, TANI, Taneli, KIVILUOTO, Tuula, KIVILAAKSO, Eero, BURGESSON, Robert E. und VIRTANEN, Ismo: *Laminins, tenascin and type VII collagen in colorectal mucosa*. Histochemical Journal, 28:431–440, 1996.
- [47] CHEN, Mei, O'TOOLE, Edel a, SANGHAVI, Jigisha, MAHMUD, Nasir, KELLEHER, Dermot, WEIR, Donald, FAIRLEY, Janet a und WOODLEY, David T: *The epidermolysis bullosa acquisita antigen (type VII collagen) is present in human colon and patients with crohn's disease have autoantibodies to type VII collagen*. Journal of Investigative Dermatology, 118:1059–64, 2002.
- [48] REDDY, H., SHIPMAN, a. R. und WOJNAROWSKA, F.: *Epidermolysis bullosa acquisita and inflammatory bowel disease: A review of the literature*. Clinical and Experimental Dermatology, 38:225–230, 2013.
- [49] RECKE, Andreas, SITARU, Cassian, VIDARSSON, Gestur, EVENSEN, Mirja, CHIRIAC, Mircea T., LUDWIG, Ralf J. und ZILLIKENS, Detlef: *Pathogenicity of IgG subclass autoantibodies to type VII collagen: induction of dermal-epidermal separation*. Journal of Autoimmunity, 34:435–444, 2010.
- [50] GUAL, Adrià, GUILABERT, Antonio, IRANZO, Pilar, FLORES, Gustavo, DIAZ, Luis a und MASCARÓ, José M: *IgG autoantibody subclass analysis as a tool to differentiate epidermolysis bullosa acquisita with overlapping features of bullous systemic lupus erythematosus*. Journal of the American Academy of Dermatology, 69:34–36, 2013.

- [51] NIEBOER, C., BOORSMA, D. M., WOERDEMAN, M. J. und KALSBECK, G. L.: *Epidermolysis bullosa acquisita. Immunofluorescence, electron microscopic and immunoelectron microscopic studies in four patients*. British Journal of Dermatology, 102:383–92, 1980.
- [52] YAOITA, H., BRIGGAMAN, R.A., LAWLEY, T. J., PROVOST, T. T. und KATZ, S. I.: *Epidermolysis Bullosa Acquisita: Ultrastructural and Immunological Studies*. Journal of Investigative Dermatology, 76:288–292, 1981.
- [53] SCHMIDT, Enno und ZILLIKENS, Detlef: *Autoimmune and inherited subepidermal blistering diseases: advances in the clinic and the laboratory*. Advances in dermatology, 16:113–57, 2000.
- [54] CHEN, Mei, DOOSTAN, Arvin, BANDYOPADHYAY, Pubali, REMINGTON, Jennifer, WANG, Xinyi, HOU, Yingping, LIU, Ziu und WOODLEY, David T: *The cartilage matrix protein subdomain of type VII collagen is pathogenic for epidermolysis bullosa acquisita*. American Journal of Pathology, 170:2009–2018, 2007.
- [55] HELLBERG, Lars, SAMAVEDAM, Unni K. S. R. L., HOLDORF, Karoline, HÄNSEL, Martin, RECKE, Andreas, BECKMANN, Tina, STEINHORST, Katja, BOEHNCKE, Wolf Henning, KIRCHNER, Tina, MÖCKEL, Nicole, SOLBACH, Werner, ZILLIKENS, Detlef, SCHMIDT, Enno, LUDWIG, Ralf J und LASKAY, Tamás: *Methylprednisolone Blocks Autoantibody-Induced Tissue Damage in Experimental Models of Bullous Pemphigoid and Epidermolysis Bullosa Acquisita through Inhibition of Neutrophil Activation*. Journal of Investigative Dermatology, 133:2390–2399, 2013.
- [56] MUTASIM, Diya F.: *Therapy of autoimmune bullous diseases*. Therapeutics and Clinical Risk Management, 3:29–40, 2007.
- [57] NIEDERMEIER, Andrea, EMING, Rüdiger, PFÜTZE, Martin, NEUMANN, Christine R, HAPPEL, Claudia, REICH, Kristian und HERTL, Michael: *Clinical Response of Severe Mechanobullous Epidermolysis Bullosa Acquisita to Combined Treatment With Immunosorption and Rituximab (Anti-CD20 Monoclonal Antibodies)*. Archives of Dermatology, 143:192–198, 2007.
- [58] SCHMIDT, Enno, BENOIT, Sandrine, BRÖCKER, Eva Bettina, ZILLIKENS, Detlef und GOEBELER, Matthias: *Successful Adjuvant Treatment of Recalcitrant Epidermolysis Bullosa Acquisita With Anti-CD20 Antibody Rituximab*. Archives of Dermatology, 142:147–150, 2006.
- [59] ENGINEER, Leela und AHMED, A. Razzaque: *Emerging treatment for epidermolysis bullosa acquisita*. Journal of the American Academy of Dermatology, 44:818–828, may 2001.

- [60] KASPERKIEWICZ, Michael, SADIK, Christian D., BIEBER, Katja, IBRAHIM, Saleh M., MANZ, Rudolf A., SCHMIDT, Enno, ZILLIKENS, Detlef und LUDWIG, Ralf J.: *Epidermolysis Bullosa Acquisita: From Pathophysiology to Novel Therapeutic Options*. Journal of Investigative Dermatology, 136:24–33, 2016.
- [61] MEYERSBURG, Damian, SCHMIDT, Enno, KASPERKIEWICZ, Michael und ZILLIKENS, Detlef: *Immunoabsorption in Dermatology*. Therapeutic Apheresis and Dialysis, 16:311–320, 2012.
- [62] IWATA, Hiroaki, BIEBER, Katja, TIBURZY, Benjamin, CHROBOK, Navina, KALIES, Kathrin, SHIMIZU, Atsushi, LEINEWEBER, Shimizu, ISHIKO, Akira, VOROBYEV, Artem, ZILLIKENS, Detlef, KÖHL, Jörg, WESTERMANN, Jürgen, SEEGER, Karsten, MANZ, Rudolf und LUDWIG, Ralf J.: *B Cells, Dendritic Cells, and Macrophages Are Required To Induce an Autoreactive CD4 Helper T Cell Response in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita*. Journal of Immunology, 191:2978–2988, 2013.
- [63] HASHIMOTO, Takashi, ISHII, Norito, OHATA, Chika und FURUMURA, Minao: *Pathogenesis of epidermolysis bullosa acquisita, an autoimmune subepidermal bullous disease*. Journal of Pathology, 228:1–7, 2012.
- [64] WING, Kajsia und SAKAGUCHI, Shimon: *Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity*. Nature Immunology, 11:7–13, 2010.
- [65] HERTL, Michael, EMING, Rüdiger und VELDMAN, Christian: *T cell control in autoimmune bullous skin disorders*. Journal of Clinical Investigation, 116:1159–1166, 2006.
- [66] SITARU, Cassian, CHIRIAC, Mircea T, MIHAI, Sidonia, BÜNING, Jürgen, GEBERT, Andreas, ISHIKO, Akira und ZILLIKENS, Detlef: *Induction of complement-fixing autoantibodies against type VII collagen results in subepidermal blistering in mice*. Journal of Immunology, 177:3461–3468, 2006.
- [67] MÜLLER, Ralf, DAHLER, Christiane, MÖBS, Christian, WENZEL, Elke, EMING, Rüdiger, MESSER, Gerald, NIEDERMEIER, Andrea und HERTL, Michael: *T and B cells target identical regions of the non-collagenous domain 1 of type VII collagen in epidermolysis bullosa acquisita*. Clinical Immunology, 135:99–107, 2010.
- [68] BENTZ, Hanne, MORRIS, Nicholas P., MURRAY, Louann W., SAKAI, Lynn Y., HOLLISTER, David W. und BURGESSON, Robert E.: *Isolation and partial characterization of a new human collagen with an extended triple-helical structural domain*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 80:3168–3172, 1983.

- [69] PARENTE, M. Gabriela, CHUNG, Linda C., RYYNÄNEN, Jaana, WOODLEY, David T., WYNN, Kimberley C., BAUER, Eugene A., MATTEI, M G, CHU, M L und UITTO, J: *Human type VII collagen: cDNA cloning and chromosomal mapping of the gene*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 88:6931–6935, 1991.
- [70] BURGESSON, Robert E.: *Type VII collagen, anchoring fibrils, and epidermolysis bullosa*. Journal of Investigative Dermatology, 101:252–255, 1993.
- [71] BRUCKNER-TUDERMAN, Leena: *Can Type VII Collagen Injections Cure Dystrophic Epidermolysis Bullosa?* Molecular Therapy, 17:6–7, 2009.
- [72] GAMMON, W Ray, MURRELL, Dtdte F, JENISON, Mark W, PADILLA, Karen M, PRISAYANH, Phillip S, JONES, Drew A, BRIGGAMAN, Robert A und HUNT III, Stephen W: *Autoantibodies to Type VII Collagen Recognize Epitopes in a Fibronectin-Like Region of the Noncollagenous (NCt) Domain*. Journal of Investigative Dermatology, 100:618–622, 1993.
- [73] ISHII, N., YOSHIDA, M., ISHIDA-YAMAMOTO, A., FRITSCH, A., ELFERT, S., BRUCKNER-TUDERMAN, L. und HASHIMOTO, T.: *Some epidermolysis bullosa acquisita sera react with epitopes within the triple-helical collagenous domain as indicated by immunoelectron microscopy*. British Journal of Dermatology, 160:1090–1093, 2009.
- [74] ISHII, N., YOSHIDA, M., HISAMATSU, Y., ISHIDA-YAMAMOTO, A., NAKANE, H., IIZUKA, H., TANAKA, T. und HASHIMOTO, T.: *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*. British Journal of Dermatology, 150:843–851, 2004.
- [75] LACHMANN, P. J. und HUGHES-JONES, N. C.: *Initiation of complement activation*. Seminars in Immunopathology, 7:143–162, 1984.
- [76] MIHAI, Sidonia, CHIRIAC, Mircea T, TAKAHASHI, Kazue, THURMAN, Joshua M, HOLLERS, V Michael, ZILLIKENS, Detlef, BOTTO, Marina und SITARU, Cassian: *The alternative pathway of complement activation is critical for blister induction in experimental epidermolysis bullosa acquisita*. Journal of Immunology, 178:6514–6521, 2007.
- [77] NAITO, K., MORIOKA, S. und OGAWA, H.: *The pathogenic mechanisms of blister formation in bullous pemphigoid*. Journal of Investigative Dermatology, 79:303–306, 1982.
- [78] HAMMERS, C. M., BIEBER, K., KALIES, K., BANCZYK, D., ELLEBRECHT, C. T., IBRAHIM, S. M., ZILLIKENS, D., LUDWIG, R. J. und WESTERMANN, J.: *Complement-Fixing*

- Anti-Type VII Collagen Antibodies Are Induced in Th1-Polarized Lymph Nodes of Epidermolysis Bullosa Acquisita-Susceptible Mice.* Journal of Immunology, 187:5043–5050, 2011.
- [79] GAMMON, W. R., INMAN, A. O. und WHEELER, C. E.: *Differences in complement-dependent chemotactic activity generated by bullous pemphigoid and epidermolysis bullosa acquisita immune complexes: demonstration by leukocytic attachment and organ culture methods.* Journal of Investigative Dermatology, 83:57–61, 1984.
- [80] SITARU, Cassian, MIHAI, Sidonia, OTTO, Christoph, CHIRIAC, Mircea T., HAUSSER, Ingrid, DOTTERWEICH, Barbara, SAITO, Hitoshi, ROSE, Christian, ISHIKO, Akira und ZILLIKENS, Detlef: *Induction of dermal-epidermal separation in mice by passive transfer of antibodies specific to type VII collagen.* Journal of Clinical Investigation, 115:870–878, 2005.
- [81] HIROSE, M, BRANDOLINI, Laura, ZIMMER, D, GÖTZ, J, WESTERMANN, J, ALLEGRETTI, M, MORICONI, A, RECKE, A, ZILLIKENS, D, KALIES, K und LUDWIG, R J: *The Allosteric CXCR1/2 Inhibitor DF2156A Improves Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita.* Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy, 04, 2013.
- [82] SAMAVEDAM, Unni K. S. R. L., KALIES, Kathrin, SCHELLER, Jürgen, SADEGHI, Hengameh, GUPTA, Yask, JONKMAN, Marcel F., SCHMIDT, Enno, WESTERMANN, Jürgen, ZILLIKENS, Detlef, ROSE-JOHN, Stefan und LUDWIG, Ralf J.: *Recombinant IL-6 treatment protects mice from organ specific autoimmune disease by IL-6 classical signalling-dependent IL-1ra induction.* Journal of Autoimmunity, 40:74–85, 2013.
- [83] SAMAVEDAM, U. K. S. R. L., IWATA, H., MULLER, S., SCHULZE, F. S., RECKE, A., SCHMIDT, E., ZILLIKENS, D. und LUDWIG, R. J.: *GM-CSF Modulates Autoantibody Production and Skin Blistering in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita.* Journal of Immunology, 192:559–571, 2014.
- [84] SADEGHI, Hengameh, LOCKMANN, Anike, HUND, Anna Carina, SAMAVEDAM, Unni K. S. R. L., PIPI, Elena, VAFIA, Katerina, HAUENSCHILD, Eva, KALIES, Kathrin, PAS, Hendri H, JONKMAN, Marcel F, IWATA, Hiroaki, RECKE, Andreas, SCHON, Michael P, ZILLIKENS, Detlef, SCHMIDT, Enno und LUDWIG, Ralf J: *Caspase-1-independent IL-1 release mediates blister formation in autoantibody-induced tissue injury through modulation of endothelial adhesion molecules.* Journal of Immunology, 194:3656–3663, 2015.
- [85] CHIRIAC, Mircea T., ROESLER, J., SINDRILARU, A, SCHARFFETTER-KOCHANKE, K., ZILLIKENS, Detlef und SITARU, Cassian: *NADPH oxidase is required for neutrophil-*

- dependent autoantibody-induced tissue damage.* Journal of Pathology, 212:56–65, 2007.
- [86] SITARU, Cassian, KROMMINGA, Arno, HASHIMOTO, Takashi, BRÖCKER, Eva B und ZILLIKENS, Detlef: *Autoantibodies to type VII collagen mediate Fcγgamma-dependent neutrophil activation and induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin.* American journal of pathology, 161:301–11, 2002.
- [87] KASPERKIEWICZ, Michael, NIMMERJAHN, Falk, WENDE, Sabina, HIROSE, Misa, IWATA, Hiroaki, JONKMAN, Marcel F., SAMAVEDAM, Unni K. S. R. L., GUPTA, Yask, MÖLLER, Steffen, RENTZ, Ellen, HELLBERG, Lars, KALIES, Kathrin, YU, Xinhua, SCHMIDT, Enno, HÄSLER, Robert, LASKAY, Tamás, WESTERMANN, Jürgen, KÖHL, Jörg, ZILLIKENS, Detlef und LUDWIG, Ralf J.: *Genetic identification and functional validation of FcγRIV as key molecule in autoantibody-induced tissue injury.* Journal of Pathology, 228:8–19, 2012.
- [88] KASPERKIEWICZ, Michael, MÜLLER, Ralf, MANZ, Rudolf, MAGENS, Moritz, HAMMERS, Christoph M, SOMLAI, Csaba, WESTERMANN, Jürgen, SCHMIDT, Enno, ZILLIKENS, Detlef, LUDWIG, Ralf J und OROSZ, Antal: *Heat shock protein 90 inhibition in autoimmunity to type VII collagen: evidence that non-malignant plasma cells are not therapeutic targets.* Blood, 117:6135–6143, 2011.
- [89] HIROSE, Misa, KASPRICK, Anika, BELTISOU, Foteini, SCHULZE DIECKHOFF, Katharina, SCHULZE, Franziska Sophie, SAMAVEDAM, Unni K. S. R. L., HUNDT, Jennifer E, PAS, Hendri H., JONKMAN, Marcel F., SCHMIDT, Enno, KALIES, Kathrin, ZILLIKENS, Detlef, LUDWIG, Ralf J. und BIEBER, Katja: *Reduced Skin Blistering in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita After Anti-TNF Treatment.* Molecular Medicine, 22:918–926, 2016.
- [90] NATHAN, C. F.: *Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes.* Journal of Clinical Investigation, 80:1550–1560, 1987.
- [91] SHIMANOVICH, Iakov, MIHAI, Sidonia, OOSTINGH, Gertie J., ILENCHUK, T. Toney, BRÖCKER, Eva B., OPDENAKKER, Ghislain, ZILLIKENS, Detlef und SITARU, Cassian: *Granulocyte-derived elastase and gelatinase B are required for dermal-epidermal separation induced by autoantibodies from patients with epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid.* Journal of Pathology, 204:519–527, 2004.
- [92] LIU, Z, GIUDICE, G J, ZHOU, X, SWARTZ, S J, TROY, J L, FAIRLEY, J a, TILL, G O und DIAZ, L a: *A major role for neutrophils in experimental bullous pemphigoid.* Journal of clinical investigation, 100:1256–63, 1997.

- [93] SITARU, Cassian und ZILLIKENS, Detlef: *Mechanisms of blister induction by autoantibodies*. Experimental Dermatology, 14:861–875, 2005.
- [94] WATANABE, N, AKIKUSA, B, PARK, S Y, OHNO, H, FOSSATI, L, VECCHIETTI, G, GESSNER, J E, SCHMIDT, R E, VERBEEK, J S, RYFFEL, B, IWAMOTO, I, IZUI, S und SAITO, T: *Mast cells induce autoantibody-mediated vasculitis syndrome through tumor necrosis factor production upon triggering Fcγ receptors*. Blood, 94:3855–63, 1999.
- [95] BIEBER, Katja, WITTE, Mareike, SUN, Shijie, HUNDT, Jennifer E, KALIES, Kathrin, DRÄGER, Sören, KASPRICK, Anika, TWELKMEYER, Trix, MANZ, Rudolf A, KÖNIG, Peter, KÖHL, Jörg, ZILLIKENS, Detlef und LUDWIG, Ralf J: *T cells mediate autoantibody-induced cutaneous inflammation and blistering in epidermolysis bullosa acquisita*. Scientific Reports, 6:38357, 2016.
- [96] KOPECKI, Zlatko, ARKELL, Ruth M, STRUDWICK, Xanthe L, HIROSE, Misa, LUDWIG, Ralf J, KERN, Johannes S, BRUCKNER-TUDERMAN, Leena, ZILLIKENS, Detlef, MURRELL, Dedee F und COWIN, Allison J: *Overexpression of the Flii gene increases dermal-epidermal blistering in an autoimmune ColVII mouse model of epidermolysis bullosa acquisita*. Journal of Pathology, 225:401–413, 2011.
- [97] KOPECKI, Zlatko, YANG, Gink N., ARKELL, Ruth M., JACKSON, Jessica E., MELVILLE, Elizabeth, IWATA, Hiroaki, LUDWIG, Ralf J., ZILLIKENS, Detlef, MURRELL, Dedee F. und COWIN, Allison J.: *Flightless I overexpression impairs skin barrier development, function and recovery following skin blistering*. Journal of Pathology, 232:541–552, 2014.
- [98] LUDWIG, Ralf J., VANHOORELBEKE, Karen, LEYPOLDT, Frank, KAYA, Ziya, BIEBER, Katja, MCLACHLAN, Sandra M., KOMOROWSKI, Lars, LUO, Jie, CABRAL-MARQUES, Otavio, HAMMERS, Christoph M., LINDSTROM, Jon M., LAMPRECHT, Peter, FISCHER, Andrea, RIEMECASTEN, Gabriela, TERSTEEG, Claudia, SONDERMANN, Peter, RAPOPORT, Basil, WANDINGER, Klaus Peter, PROBST, Christian, BELDAQ, Asmaa El, SCHMIDT, Enno, VERKMAN, Alan, MANZ, Rudolf A. und NIMMERJAHN, Falk: *Mechanisms of autoantibody-induced pathology*. Frontiers in Immunology, 8:603, 2017.
- [99] LÜLLMANN-RAUCH, Renate: *Blut- und Blutbildung*. In: *Histologie Taschenlehrbuch*, Kapitel 12, Seite 268. Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2. Auflage, 2006.
- [100] BAINTON, Dorothy F., ULLYOZ, Joan L. und FARQUHAR, Marilyn G.: *The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow*. Journal of Experimental Medicine, 134:907–934, 1971.

- [101] LEIDING, Jennifer W.: *Neutrophil evolution and their diseases in humans*. *Frontiers in Immunology*, 8:1009, 2017.
- [102] SEMERAD, Craig L., LIU, Fulu, GREGORY, Alyssa D., STUMPF, Katherine und LINK, Daniel C.: *G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood*. *Immunity*, 17:413–423, 2002.
- [103] COHEN, A M, ZSEBO, K M, INOUE, H, HINES, D, BOONE, T C, CHAZIN, V R, TSAI, L, RITCH, T und SOUZA, L M: *In vivo stimulation of granulopoiesis by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84:2484–2488, 1987.
- [104] DEMETRI, George G. und GRIFFIN, James D.: *Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Its Receptor*. *Journal of The American Society of Hematology*, 78:2791–2808, 1991.
- [105] THELEN, M, DEWALD, B und BAGGIOLINI, M: *Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst*. *Physiological reviews*, 73:797–821, 1993.
- [106] MARTIN, Coralie, BURDON, Peter C.E., BRIDGER, Gary, GUTIERREZ-RAMOS, Jose Carlos, WILLIAMS, Timothy J. und RANKIN, Sara M.: *Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence*. *Immunity*, 19:583–593, 2003.
- [107] SEZIN, Tanya, KRAJEWSKI, Matthias, WUTKOWSKI, Adam, MOUSAVI, Sadegh, CHAKIEVSKA, Lenche, BIEBER, Katja, LUDWIG, Ralf J., DAHLKE, Markus, RADES, Dirk, SCHULZE, Franziska S., SCHMIDT, Enno, KALIES, Kathrin, GUPTA, Yask, SCHILF, Paul, IBRAHIM, Saleh M., KÖNIG, Peter, SCHWUDKE, Dominik, ZILLIKENS, Detlef und SADIK, Christian D.: *The Leukotriene B4 and its Receptor BLT1 Act as Critical Drivers of Neutrophil Recruitment in Murine Bullous Pemphigoid-Like Epidermolysis Bullosa Acquisita*. *Journal of Investigative Dermatology*, 137:1104–1113, 2017.
- [108] SMITH, C. W., KISHIMOTO, T. K., ABBASS, O., HUGHES, B., ROTHLEIN, R., MCINTIRE, L. V., BUTCHER, E. und ANDERSON, D. C.: *Chemotactic factors regulate lectin adhesion molecule 1 (LECAM-1)-dependent neutrophil adhesion to cytokine-stimulated endothelial cells in vitro*. *Journal of Clinical Investigation*, 87:609–618, 1991.
- [109] LEY, Klaus, LAUDANNA, Carlo, CYBULSKY, Myron I. und NOURSHARGH, Sussan: *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. *Nature Reviews Immunology*, 7:678–689, 2007.
- [110] BEVILACQUA, M. P., POBER, J. S., MENDRICK, D. L., COTRAN, R. S. und GIMBRONE, M. A.: *Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(24):9238–9242, 1987.

- [111] LAWRENCE, M B, SMITH, C W, ESKIN, S G und MCINTIRE, L V: *Effect of venous shear stress on CD18-mediated neutrophil adhesion to cultured endothelium*. Blood, 75:227–237, 1990.
- [112] MANTOVANI, Alberto, CASSATELLA, Marco A., COSTANTINI, Claudio und JAILLON, Sébastien: *Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity*. Nature Reviews Immunology, 11:519–531, 2011.
- [113] BARNADO, A., CROFFORD, L. J. und OATES, J. C.: *Neutrophil extracellular traps (NETs) as targets for biomarkers and therapies in autoimmune diseases*. Journal of Leukocyte Biology, 99:265–278, 2016.
- [114] HENSON, Peter M. und JOHNSTON, Richard B.: *Tissue Injury in Inflammation Oxidants, Proteinases, and Cationic Proteins Peter*. The American Society for Clinical Investigation, 79:669–674, 1987.
- [115] RASSOW, Joachim, HAUSER, Karin, NETZKER, Roland und DEUTZMANN, Rainer: *Duale Reihe: Biochemie*. Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2. Auflage, 2008.
- [116] SCHNEIDER, Claudio, ZANETTI, Margherita und ROMEO, Domenico: *Surface-reactive stimuli selectively increase protein phosphorylation in human neutrophils*. FEBS Letters, 127:4–8, 1981.
- [117] SAMAVEDAM, Unni K. S. R. L., MITSCHKER, Nina, KASPRICK, Anika, BIEBER, Katja, SCHMIDT, Enno, LASKAY, Tamás, RECKE, Andreas, GOLETZ, S., VIDARSSON, Gestur, SCHULZE, Franziska S., ARMBRUST, Mikko, SCHULZE DIECKHOFF, Katharina, PAS, Hendri H., JONKMAN, Marcel F., KALIES, Kathrin, ZILLIKENS, Detlef, GUPTA, Yask, IBRAHIM, Saleh M. und LUDWIG, Ralf J.: *Whole-Genome Expression Profiling in Skin Reveals SYK As a Key Regulator of Inflammation in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita*. Frontiers in Immunology, 9:249, 2018.
- [118] KOVÁCS, Miklós, NÉMETH, Tamás, JAKUS, Zoltán, SITARU, Cassian, SIMON, Edina, FUTOSI, Krisztina, BOTZ, Bálint, HELYES, Zsuzsanna, LOWELL, Clifford A. und MÓCSAI, Attila: *The Src family kinases Hck, Fgr, and Lyn are critical for the generation of the in vivo inflammatory environment without a direct role in leukocyte recruitment*. Journal of Experimental Medicine, 211:1993–2011, 2014.
- [119] KULKARNI, Suhasini, SITARU, Cassian, JAKUS, Zoltan, ANDERSON, Karen E, DAVIDSON, Keith, HIROSE, Misa, JUSS, Jatinder, OXLEY, David, TAMARA, A, CHESSA, M, RAMADANI, Faruk, GUILLOU, Herve, SEGONDS-PICHON, Anne, FRITSCH, Anja, JARVIS, Gavin E, OKKENHAUG, Klaus, LUDWIG, Ralf, ZILLIKENS, Detlef, MÓCSAI, Attila, VANHAESEBROECK, Bart, STEPHENS, Len R, APRIL, Phillip T Hawkins, DAMOULAKIS, George, CHESSA, Tamara A M und HAWKINS, Phillip T: *PI3K β Plays a*

- Critical Role in Neutrophil Activation by Immune Complexes*. Science Signaling, 4:23, 2011.
- [120] SADEGHI, Hengameh, GUPTA, Yask, MÖLLER, Steffen, SAMAVEDAM, Unni K. S. R. L., BEHNEN, Martina, KASPRICK, Anika, BIEBER, Katja, MÜLLER, Susen, KALIES, Kathrin, DE CASTRO MARQUES, Andreia, RECKE, Andreas, SCHMIDT, Enno, ZILLIKENS, Detlef, LASKAY, Tamás, MARIANI, Jean, IBRAHIM, Saleh M. und LUDWIG, Ralf J.: *The retinoid-related orphan receptor alpha is essential for the end-stage effector phase of experimental epidermolysis bullosa acquisita*. Journal of Pathology, 237:111–122, 2015.
- [121] NIMMERJAHN, Falk und RAVETCH, Jeffrey V.: *Fc γ receptors as regulators of immune responses*. Nature Reviews Immunology, 8:34–47, 2008.
- [122] YAMAMORI, Tohru, INANAMI, Osamu, NAGAHATA, Hajime, CUI, Yu Dong und KUWABARA, Mikinori: *Roles of p38 MAPK, PKC and PI3-K in the signaling pathways of NADPH oxidase activation and phagocytosis in bovine polymorphonuclear leukocytes*. FEBS Letters, 467:253–258, 2000.
- [123] NÉMETH, Tamás, VIRTIC, Oana, SITARU, Cassian und MÓCSAI, Attila: *The Syk tyrosine kinase is required for skin inflammation in an in vivo mouse model of epidermolysis bullosa acquisita*. Journal of Investigative Dermatology, 137:2131–2139, 2017.
- [124] DIDICHENKO, S A, TILTON, B, HEMMINGS, B A, BALLMER-HOFER, K und THELEN, M: *Constitutive activation of protein kinase B and phosphorylation of p47phox by a membrane-targeted phosphoinositide 3-kinase*. Current Biology, 6:1271–1278, 1996.
- [125] KLIPPEL, A, KAVANAUGH, W M, POT, D und WILLIAMS, L T: *A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain*. Molecular and Cellular Biology, 17:338–344, 1997.
- [126] CHU, Julia Y., DRANSFIELD, Ian, ROSSI, Adriano G. und VERMEREN, Sonja: *Non-canonical PI3K-Cdc42-Pak-Mek-Erk Signaling Promotes Immune-Complex-Induced Apoptosis in Human Neutrophils*. Cell Reports, 17:374–386, 2016.
- [127] MCLEISH, K R, KNALL, C, WARD, R A, GERWINS, P, COXON, P Y, KLEIN, J B und JOHNSON, G L: *Activation of mitogen-activated protein kinase cascades during priming of human neutrophils by TNF-alpha and GM-CSF*. Journal of Leukocyte Biology, 64:537–545, 1998.
- [128] SLUSS, H K, BARRETT, T, DÉRIJARD, B und DAVIS, R J: *Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases*. Molecular and Cellular Biology, 14:8376–8384, 1994.

- [129] MÓCSAI, Attila, RULAND, Jürgen und TYBULEWICZ, Victor L. J.: *The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions*. Nature Reviews Immunology, 10:387–402, 2010.
- [130] OKAMURA, N., CURNUTTE, J. T., ROBERTS, R. L. und BABIOR, B. M.: *Relationship of protein phosphorylation to the activation of the respiratory burst in human neutrophils. Defects in the phosphorylation of a group of closely related 48-kDa proteins in two forms of chronic granulomatous disease*. Journal of Biological Chemistry, 263:6777–6782, 1988.
- [131] NAUSEEF, W. M., VOLPP, B. D., MCCORMICK, S., LEIDAL, K. G. und CLARK, R. A.: *Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: Protein kinase C promotes cytoskeletal and membrane association of cytosolic oxidase components*. Journal of Biological Chemistry, 266:5911–5917, 1991.
- [132] EL BENNA, J., FAUST, L. P. und BABIOR, B. M.: *The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47(phox) during neutrophil activation. Phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases*. Journal of Biological Chemistry, 269:23431–23436, 1994.
- [133] EL BENNA, Jamel, FAUST, La Rosa P., JOHNSON, Jennifer L. und BABIOR, Bernard M.: *Phosphorylation of the Respiratory Burst Oxidase Subunit p47[IMAGE] as Determined by Two-dimensional Phosphopeptide Mapping*. Journal of Biological Chemistry, 271:6374–6378, 1996.
- [134] FORMAN, Henry Jay, ZHOU, Huanfang, GOZAL, Evelyne und TORRES, Martine: *Modulation of the alveolar macrophage superoxide production by protein phosphorylation*. Environmental Health Perspectives, 106:1185–1190, 1998.
- [135] PEVERI, P., HEYWORTH, P. G. und CURNUTTE, J. T.: *Absolute requirement for GTP in activation of human neutrophil NADPH oxidase in a cell-free system: role of ATP in regenerating GTP*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 89:2494–2498, 1992.
- [136] KNAUS, Ulla G., MORRIS, Sharron, DONG, Hui Jia, CHERNOFF, Jonathan und BOKOCH, Gary M.: *Regulation of human leukocyte p21-activated kinases through G protein-coupled receptors*. Science, 269:221–223, 1995.
- [137] LUDWIG, Ralf J.: *Signalling and targeted therapy of inflammatory cells in epidermolysis bullosa acquisita*. Experimental Dermatology, 26:1179–1186, 2017.
- [138] TUKAJ, Stefan, HELLBERG, Lars, UECK, Christopher, HANSEL, Martin, SAMAVEDAM, Unni K. S. R. L., ZILLIKENS, Detlef, LUDWIG, Ralf J., LASKAY, Tamas und KASPERKIEWICZ, Michael: *Heat shock protein 90 is required for ex vivo neutrophil-driven*

- autoantibody-induced tissue damage in experimental epidermolysis bullosa acquisita*. Experimental Dermatology, 24:471–473, 2015.
- [139] TUKAJ, Stefan und WEGRZYN, Grzegorz: *Anti-Hsp90 therapy in autoimmune and inflammatory diseases: a review of preclinical studies*. Cell Stress and Chaperones, 21:213–218, 2016.
- [140] MÓCSAI, A, LIGETI, E, LOWELL, C A und BERTON, G: *Adhesion-dependent degranulation of neutrophils requires the Src family kinases Fgr and Hck*. Journal of Immunology, 162:1120–6, 1999.
- [141] EVENOU, J. P., WAGNER, J., ZENKE, G., BRINKMANN, V., WAGNER, K., KOVARIK, J., WELZENBACH, K. A., WEITZ-SCHMIDT, G., GUNTERMANN, C., TOWBIN, H., COTTENS, S., KAMINSKI, S., LETSCHKA, T., LUTZ-NICOLADONI, C., GRUBER, T., HERMANN-KLEITER, N., THUILLIE, N. und BAIER, G.: *The Potent Protein Kinase C-Selective Inhibitor AEB071 (Sotrastaurin) Represents a New Class of Immunosuppressive Agents Affecting Early T-Cell Activation*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 330:792–801, 2009.
- [142] KISHIMOTO, Akira, YOSHIMI, Takai, TERUTOSHI, Mori, KIKKAWA, Ushio und NISHIZUKA, Yasutomi: *Activation of Calcium and Phospholipid-dependent Protein Kinase by Diacylglycerol, Its Possible Relation to Phosphatidylinositol Turnover*. Journal of Biological Chemistry, 255:2273–2276, 1980.
- [143] MELLOR, Harry und PARKER, Peter J: *The extended protein kinase C superfamily*. Biochemical Journal, 332:281–292, 1998.
- [144] CHANG, Z und BEEZHOLD, D: *Protein kinase C activation in human monocytes: regulation of PKC isoforms*. Immunology, 80:360–366, 1993.
- [145] NEL, AE, BOUIC, P, LATTANZE, G R, STEVENSON, H C, MILLER, P, DIRIENZO, W, STEFANINI, G F und GALBRAITH, R M: *Reaction of T lymphocytes with anti-T3 induces translocation of C-kinase activity to the membrane and specific substrate phosphorylation*. Journal of immunology, 138:3519–3524, 1987.
- [146] DE WEERD, A., KHO, M., KRAAIJEVELD, R., ZUIDERWIJK, J., WEIMAR, W. und BAAN, C.: *The protein kinase C inhibitor sotrastaurin allows regulatory T cell function*. Clinical and Experimental Immunology, 175:296–304, 2014.
- [147] HAUSCHILDT, Sunna, STEFFENS, Ute, WAGNER-ROOS, Luise und BESSLER, Wolfgang G: *Role of protein kinase C and phosphatidylinositol metabolism in lipopeptide-induced leukocyte activation as signal transducing mechanism*. Molecular Immunology, 25:1081 – 1086, 1988.

- [148] MECKLENBRÄUKER, Ingrid, SAIJO, Kaoru, ZHENG, Nai Ying, LEITGES, Michael und TARAKHOVSKY, Alexander: *Protein kinase C δ controls self-antigen-induced B-cell tolerance*. Nature, 416:860–865, 2002.
- [149] GUO, Beichu, SU, Thomas T. und RAWLINGS, David J.: *Protein kinase C family functions in B-cell activation*. Current Opinion in Immunology, 16:367–373, 2004.
- [150] LANE, T A, LAMKIN, G E und WANCEWICZ, E: *Modulation of endothelial cell expression of intercellular adhesion molecule 1 by protein kinase C activation*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 161:954–952, 1989.
- [151] SMALLWOOD, Joan I. und MALAWISTA, Stephen E.: *Protein kinase C isoforms in human neutrophil cytoplasts*. Journal of Leukocyte Biology, 51:84–92, 1992.
- [152] COMBADIBRE, By Christophe, BENNA, Jamel El, PEDRUZZI, Eric, HAKIM, Jacques und PBRIANIN, Axel: *Stimulation of the Human Neutrophil Respiratory Burst by Formyl Peptides is Primed by a Protein Kinase Inhibitor, Staurosporine*. Blood, 82:2890–2898, 1993.
- [153] SKVARA, Hans, DAWID, Markus, KLEYN, Elise, WOLFF, Barbara, MEINGASSNER, Josef G., KNIGHT, Hilary, DUMORTIER, Thomas, KOPP, Tamara, FALLAHI, Nasanin, STARY, Georg, BURKHART, Christoph, GRENET, Olivier, WAGNER, Juergen, HIJAZI, Youssef, MORRIS, Randall E., MCGEOWN, Claire, RORDORF, Christiane, GRIFFITHS, Christopher E.M., STINGL, Georg und JUNG, Thomas: *The PKC inhibitor AEB071 may be a therapeutic option for psoriasis*. Journal of Clinical Investigation, 118:3151–3159, 2008.
- [154] FRIMAN, S., ARNS, W., NASHAN, B., VINCENTI, F., BANAS, B., BUDDE, K., CIBRIK, D., CHAN, L., KLEMPNAUER, J., MULGAONKAR, S., NICHOLSON, M., WAHLBERG, J., WISSING, K. M., ABRAMS, K., WITTE, S. und WOODLE, E. S.: *Sotrastaurin, a novel small molecule inhibiting protein-kinase C: Randomized phase II study in renal transplant recipients*. American Journal of Transplantation, 11:1444–1455, 2011.
- [155] BUDDE, K., SOMMERER, C., BECKER, T., ASDERAKIS, A., PIETRUCK, F., GRINYO, J. M., RIGOTTI, P., DANTAL, J., NG, J., BARTEN, M. J. und WEBER, M.: *Sotrastaurin, a novel small molecule inhibiting protein kinase C: First clinical results in renal-transplant recipients*. American Journal of Transplantation, 10:571–581, 2010.
- [156] PASCHER, A., DE SIMONE, P., PRATSCHKE, J., SALAMÉ, E., PIRENNE, J., ISONEIMI, H., BIJARNIA, M., KRISHNAN, I. und KLUPP, J.: *Protein kinase c inhibitor sotrastaurin in de novo liver transplant recipients: A randomized phase ii trial*. American Journal of Transplantation, 15:1283–1292, 2015.

- [157] FOLKES, Adrian J, AHMADI, Khatereh, ALDERTON, Wendy K, ALIX, Sonia, BAKER, Stewart J, BOX, Gary, CHUCKOWREE, S, CLARKE, Paul A, DEPLEDGE, Paul, ECCLES, Suzanne A, FRIEDMAN, Lori S, HAYES, Angela, HANCOX, Timothy C, KUGEN-DRADAS, Arumugam, LENSUN, Letitia, MOORE, Pauline, OLIVERO, Alan G, PATEL, Sonal, PERGL-WILSON, Giles H, RAYNAUD, Florence I, ROBSON, Anthony, SAGHIR, Nahid, SOHAL, Sukhjot, ULTSCH, Mark H, VALENTI, Melanie, WALLWEBER, Heidi J A, WAN, Nan Chi, WORKMAN, Paul, ZHYVOLOUP, Alexander, ZVELEBIL, Marketa J und SHUTTLEWORTH, Stephen J: *The Identification of 2-(1H-Indazol-4-yl)-6-(4-methanesulfonyl-piperazin- 1-ylmethyl)-4-morpholin-4-yl-thieno[3,2-d]pyrimidine (GDC-0941) as a Potent, Selective, Orally Bioavailable Inhibitor of Class I PI3 Kinase for the Treatment of Cancer*. Journal of Medicinal Chemistry, 51:5522–5532, 2008.
- [158] JUNTILA, Teemu T., AKITA, Robert W., PARSONS, Kathryn, FIELDS, Carter, LEWIS PHILLIPS, Gail D., FRIEDMAN, Lori S., SAMPATH, Deepak und SLIWKOWSKI, Mark X.: *Ligand-Independent HER2/HER3/PI3K Complex Is Disrupted by Trastuzumab and Is Effectively Inhibited by the PI3K Inhibitor GDC-0941*. Cancer Cell, 15:429–440, 2009.
- [159] WALLIN, Jeffrey J., GUAN, Jane, PRIOR, Wei Wei, LEE, Leslie B., BERRY, Leanne, BELMONT, Lisa D., KOEPPEN, Hartmut, BELVIN, Marcia, FRIEDMAN, Lori S. und SAMPATH, Deepak: *GDC-0941, a novel class I selective PI3K inhibitor, enhances the efficacy of docetaxel in human breast cancer models by increasing cell death In Vitro and In Vivo*. Clinical Cancer Research, 18:3901–3911, 2012.
- [160] EHRHARDT, Michael, CRAVEIRO, Rogerio B, HOLST, Martin I, PIETSCH, Torsten und DILLOO, Dagmar: *The PI3K inhibitor GDC-0941 displays promising in vitro and in vivo efficacy for targeted medulloblastoma therapy*. Oncotarget, 6:802–813, 2015.
- [161] SARKER, Debashis, ANG, Joo Ern, BAIRD, Richard, KRISTELEIT, Rebecca, MORENO, Victor, CLARKE, Paul A, RAYNAUD, Florence I, LEVY, Gallia, JOSEPH, A, MAZINA, Kathryn, LIN, Ray, WU, Jenny, FREDRICKSON, Jill, SPOERKE, Jill M, MARK, R, YAN, Yibing, FRIEDMAN, Lori S, KAYE, Stan B, DERYNCK, Mika K, BONO, Johann S De, LEVY, Gallia, WU, Jenny und KAYE, Stan: *First-in-human Phase I study of Pictilisib (GDC-0941), a potent pan-class I phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) inhibitor , in patients with advanced solid tumors*. Clinical Cancer Research, 21:77–86, 2015.
- [162] SCHMID, Peter, PINDER, Sarah E., WHEATLEY, Duncan, MACASKILL, Jane, ZAMMIT, Charles, HU, Jennifer, PRICE, Robert, BUNDRED, Nigel, HADAD, Sirwan, SHIA, Alice, PURUSHOTHAM, Arnie, THOMPSON, Alastair und AL, Et: *Phase II randomized preoperative window-of-opportunity study of the PI3K inhibitor pictilisib plus anastrozo-*

- le compared with anastrozole alone in patients with estrogen receptor-positive breast cancer.* Journal of Clinical Oncology, 34:1987–1994, 2016.
- [163] SADHU, Chanchal, MASINOVSKY, Boris, DICK, Ken, SOWELL, C. G. und STAUNTON, Donald E: *Essential Role of Phosphoinositide 3-Kinase delta in Neutrophil Directional Movement.* Journal of Immunology, 170:2647–2654, 2003.
- [164] RANDIS, Tara M., PURI, Kamal D., ZHOU, Hairu und DIACOVO, Thomas G.: *Role of PI3K δ and PI3K γ in inflammatory arthritis and tissue localization of neutrophils.* European Journal of Immunology, 38:1215–1224, 2008.
- [165] CHIU, Honyin, MALLYA, Sharmila, NGUYEN, Phuongthao, MAI, Annie, JACKSON, Leandra V., WINKLER, David G., DINITTO, Jonathan P., BROPHY, Erin E., MCGOVERN, Karen, KUTOK, Jeffery L. und FRUMAN, David A.: *The Selective phosphoinositide-3-kinase p110 δ inhibitor IPI-3063 potently suppresses b cell survival, proliferation, and differentiation.* Frontiers in Immunology, 8:747, 2017.
- [166] DURAND, C. A., HARTVIGSEN, K., FOGELSTRAND, L., KIM, S., IRITANI, S., VANHAESEBROECK, B., WITZTUM, J. L., PURI, K. D. und GOLD, M. R.: *Phosphoinositide 3-Kinase p110-delta Regulates Natural Antibody Production, Marginal Zone and B-1 B Cell Function, and Autoantibody Responses.* The Journal of Immunology, 183:5673–5684, 2009.
- [167] ALI, Khaled, BILANCIO, Antonio, THOMAS, Matthew, PEARCE, Wayne, GILFILLAN, Alasdair M., TKACZYK, Christine, KUEHN, Nicolas, GRAY, Alexander, GIDDINGS, June, PESKETT, Emma, FOX, Roy, BRUCE, Ian, WALKER, Christoph, SAWYER, Carol, OKKENHAUG, Klaus, FINAN, Peter und VANHAESEBROECK, Bart: *Essential role for the p110delta phosphoinositide 3-kinase in the allergic response.* Nature, 431:1007–1011, 2004.
- [168] FELDMAN, Richard I., WU, James M., POLOKOFF, Mark A., KOCHANNY, Monica J., DINTER, Harald, ZHU, Daguang, BIROC, Sandra L., ALICKE, Bruno, BRYANT, Judi, YUAN, Shendong, BUCKMAN, Brad O., LENTZ, Dao, FERRER, Mike, WHITLOW, Marc, ADLER, Marc, FINSTER, Silke, CHANG, Zheng und ARNAIZ, Damian O.: *Novel small molecule inhibitors of 3-phosphoinositide-dependent kinase-1.* Journal of Biological Chemistry, 280:19867–19874, 2005.
- [169] MOSER, C. V., KYNAST, K., BAATZ, K., RUSSE, O. Q., FERREIROS, N., COSTIUK, H., LU, R., SCHMIDTKO, A., TEGEDER, I., GEISSLINGER, G. und NIEDERBERGER, E.: *The Protein Kinase IKK Is a Potential Target for the Treatment of Inflammatory Hyperalgesia.* Journal of Immunology, 187:2617–2625, 2011.

- [170] ZABKIEWICZ, Joanna, PEARN, Lorna, HILLS, Robert K., MORGAN, Rhys G., TONKS, Alex, BURNETT, Alan K. und DARLEY, Richard L.: *The PDK1 master kinase is over-expressed in acute myeloid leukemia and promotes PKC-mediated survival of leukemic blasts*. Haematologica, 99:858–864, 2014.
- [171] YAGI, M., KANTARCI, A., IWATA, T., OMORI, K., AYILAVARAPU, S., ITO, K., HASTURK, H. und VAN DYKE, T. E.: *PDK1 regulates chemotaxis in human neutrophils*. Journal of Dental Research, 88:1119–1124, 2009.
- [172] PARK, Sung gyoo, SCHULZE-LUEHRMAN, Jan, HAYDEN, Matthew S, HASHIMOTO, Naoko, OGAWA, Wataru, KASUGA, Masato und GHOSH, Sankar: *Phosphoinositide-dependent kinase 1 integrates T cell receptor and CD28 co-receptor signaling to effect NF- κ B induction and T cell activation*. Nature immunology, 10:158–166, 2009.
- [173] PARK, Sung Gyoo, LONG, Meixiao, KANG, JUNG AH, KIM, Woo Seok, LEE, Cho Rong, IM, Sin Hyeog, STRICKLAND, Ian, SCHULZE-LUEHRMANN, Jan, HAYDEN, Matthew S. und GHOSH, Sankar: *The Kinase PDK1 Is Essential for B-Cell Receptor Mediated Survival Signaling*. Public Library of Science One, 8:55378, 2013.
- [174] FUJIWARA, S, KAWANO, Y, YUKI, H, OKUNO, Y, NOSAKA, K, MITSUYA, H und HATA, H: *PDK1 inhibition is a novel therapeutic target in multiple myeloma*. British Journal of Cancer, 108:170–178, 2012.
- [175] HOPE, Heidi R, ANDERSON, Gary D, BURNETTE, Barry L, COMPTON, Robert P, DEVRAJ, Rajesh V, HIRSCH, Jeffrey L, KEITH, Robert H, LI, Xiong, MBALAVIELE, Gabriel, MESSING, Dean M, SAABYE, Matthew J, SCHINDLER, John F, SELNESS, Shaun R, STILLWELL, Loreen I, WEBB, Elizabeth G, ZHANG, Jian und MONAHAN, Joseph B: *Anti-Inflammatory Properties of a Novel N -Phenyl Pyridinone Inhibitor of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase : Preclinical-to-Clinical Translation*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 331:882–895, 2009.
- [176] PEARSON, Gray, ROBINSON, Fred, BEERS GIBSON, Tara, XU, Bing E, KARANDIKAR, Mahesh, BERMAN, Kevin und COBB, Melanie H: *Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions*. Endocrine Reviews, 22:153–183, 2001.
- [177] XING, Li: *Discovery of Atropisomer PH- 797804 as a Potent , Selective and Efficacious P38 MAP Kinase Inhibitor as Clinical Candidate*. JSM Chemnistry, 2:1013, 2014.
- [178] SINGH, Dave, SIEW, Leonard, CHRISTENSEN, Jared, PLUMB, Jonathan, CLARKE, Graham W., GREENAWAY, Steve, PERROS-HUGUET, Christelle, CLARKE, Nick, KILTY, Iain und TAN, Lisa: *Oral and inhaled p38 MAPK inhibitors: Effects on inhaled LPS*

- challenge in healthy subjects*. European Journal of Clinical Pharmacology, 71:1175–1184, 2015.
- [179] MOLIFE, L. Rhoda, YAN, Li, VITFELL-RASMUSSEN, Joanna, ZERNHELT, Adriane M., SULLIVAN, Daniel M., CASSIER, Philippe A., CHEN, Eric, BIONDO, Andrea, TETTEH, Ernestina, SIU, Lillian L., PATNAIK, Amita, PAPADOPOULOS, Kyriakos P., DE BONO, Johann S., TOLCHER, Anthony W. und MINTON, Susan: *Phase 1 trial of the oral AKT inhibitor MK-2206 plus carboplatin/ paclitaxel, docetaxel, or erlotinib in patients with advanced solid tumors*. Journal of Hematology and Oncology, 7:1, 2014.
- [180] QI, Lei, TOYODA, Hidemi, XU, Dong qing, ZHOU, Ye, SAKURAI, Naoto, AMANO, Keis-hirou, KIHIRA, Kentaro, HORI, Hiroki, AZUMA, Eiichi und KOMADA, Yoshihiro: *PDK1-mTOR signaling pathway inhibitors reduce cell proliferation in MK2206 resistant neuroblastoma cells*. Cancer Cell International, 15:91, 2015.
- [181] ZHANG, Yan, WANG, Xiao, YANG, Hui, LIU, Huanrong, LU, Yun, HAN, Limei und LIU, Guangwei: *Kinase AKT controls innate immune cell development and function*. Immunology, 140:143–52, 2013.
- [182] KITZ, Alexandra, MARCKEN, Marine de, GAUTRON, Anne Sophie, MITROVIC, Mitja, HAFLER, David A und DOMINGUEZ-VILLAR, Margarita: *AKT isoforms modulate Th1-like Treg generation and function in human autoimmune disease*. EMBO Reports, 17:1169–83, 2016.
- [183] MONTALVO-ORTIZ, Brenda L, CASTILLO-PICHARDO, Linette, HERNÁNDEZ, Eliud, HUMPHRIES-BICKLEY, Tessa, DE LA MOTA-PEYNADO, Alina, CUBANO, Luis A, VLAAR, Cornelis P und DHARMAWARDHANE, Suranganie: *Characterization of EHOp-016, novel small molecule inhibitor of Rac GTPase*. Journal of biological chemistry, 287:13228–13238, 2012.
- [184] CASTILLO-PICHARDO, Linette, HUMPHRIES-BICKLEY, Tessa, DE LA PARRA, Columba, FORESTIER-ROMAN, Ingrid, MARTINEZ-FERRER, Magaly, HERNANDEZ, Eliud, VLAAR, Cornelis, FERRER-ACOSTA, Yancy, WASHINGTON, Anthony V., CUBANO, Luis A., RODRIGUEZ-ORENGO, Jose und DHARMAWARDHANE, Suranganie: *The Rac Inhibitor EHOp-016 Inhibits Mammary Tumor Growth and Metastasis in a Nude Mouse Model*. Translational Oncology, 7:546–55, 2014.
- [185] GREGORY, Kwiatkowski, DOWNEY, P, DINAUER, Mary, WORKU, David J, CLAUSEN, Björn E, FOERSTER, Irmgard, MARKS, Peter, GLOGAUER, Michael, MARCHAL, Christophe C, ZHU, Fei, WORKU, Aelaf, DOWNEY, Gregory P und KWIATKOWSKI, David J: *Selective Effects on Neutrophil Functions Rac1 Deletion in Mouse Neutrophils Has*

- Rac1 Deletion in Mouse Neutrophils Has Selective Effects on Neutrophil Functions 1.* Journal of Immunology, 170:5652–5657, 2003.
- [186] FURGE, K. A., ZHANG, Y. W. und VANDE WOUDE, G. F.: *Met receptor tyrosine kinase: Enhanced signaling through adapter proteins.* Oncogene, 19:5582–5589, 2000.
- [187] CHRISTENSEN, James G., SCHRECK, Randall, BURROWS, Jon, KURUGANTI, Poonam, CHAN, Emily, LE, Phuong, CHEN, Jeffrey, WANG, Xueyan, RUSLIM, Lany, BLAKE, Robert, LIPSON, Kenneth E., RAMPHAL, John, DO, Steven, CUI, Jingrong J., CHERRINGTON, Julie M. und MENDEL, Dirk B.: *A Selective Small Molecule Inhibitor of c-Met Kinase Inhibits c-Met-Dependent Phenotypes in Vitro and Exhibits Cytoreductive Antitumor Activity in Vivo.* Cancer Research, 63:7345–7355, 2003.
- [188] SMOLEN, Gromoslaw A, SORDELLA, Raffaella, MUIR, Beth, MOHAPATRA, Gayatri, BARMETTLER, Anne, ARCHIBALD, Heidi, KIM, Woo J, OKIMOTO, Ross A, BELL, Daphne W, SGROI, Dennis C, CHRISTENSEN, James G, SETTLEMAN, Jeffrey und HABER, Daniel A: *Amplification of MET may identify a subset of cancers with extreme sensitivity to the selective tyrosine kinase inhibitor PHA-665752.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 103:2316–21, 2006.
- [189] PURI, Neelu, KHRAMTSOV, Andrey, AHMED, Salman, NALLASURA, Vidya, HETZEL, Jeremy T., JAGADEESWARAN, Ramasamy, KARCZMAR, Greg und SALGIA, Ravi: *A selective small molecule inhibitor of c-Met, PHA665752, inhibits tumorigenicity and angiogenesis in mouse lung cancer xenografts.* Cancer Research, 67:3529–3534, 2007.
- [190] YANG, Yanan, WISLEZ, Marie, FUJIMOTO, Nobukazu, PRUDKIN, Ludmila, IZZO, Julie G, UNO, Futoshi, JI, Lin, HANNA, Amy E, LANGLEY, Robert R, LIU, Diane, JOHNSON, Faye M, WISTUBA, Ignacio und KURIE, Jonathan M: *A selective small molecule inhibitor of c-Met, PHA-665752, reverses lung premalignancy induced by mutant K-ras.* Molecular Cancer Therapeutics, 7:952–60, 2008.
- [191] BENKHOUCHA, M., SANTIAGO-RABER, M. L., SCHNEITER, G., CHOFFLON, M., FUNAKOSHI, H., NAKAMURA, T. und LALIVE, P. H.: *Hepatocyte growth factor inhibits CNS autoimmunity by inducing tolerogenic dendritic cells and CD25+Foxp3+ regulatory T cells.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 107:6424–6429, 2010.
- [192] GLODDE, Nicole, BALD, Tobias, BOORN-KONIJNENBERG, Debby van den, NAKAMURA, Kyohei, O'DONNELL, Jake S., SZCZEPANSKI, Sabrina, BRANDES, Maria, EICKHOFF, Sarah, DAS, Indrajit, SHRIDHAR, Naveen, HINZE, Daniel, ROGAVA, Meri, SLUIS, Tetje C. van der, RUOTSALAINEN, Janne J., GAFFAL, Evelyn, LANDSBERG, Jennifer, LUDWIG, Kerstin U., WILHELM, Christoph, RIEK-BURCHARDT, Monika, MÜLLER, Andreas J., GEBHARDT, Christoffer, SCOLYER, Richard A., LONG, Ge-

- orgina V., JANZEN, Viktor, TENG, Michele W.L., KASTENMÜLLER, Wolfgang, MAZZONE, Massimiliano, SMYTH, Mark J., TÜTING, Thomas und HÖLZEL, Michael: *Reactive Neutrophil Responses Dependent on the Receptor Tyrosine Kinase c-MET Limit Cancer Immunotherapy*. *Immunity*, 47:789–802, 2017.
- [193] LEAHY, Justin J.J., GOLDING, Bernard T., GRIFFIN, Roger J., HARDCASTLE, Ian R., RICHARDSON, Caroline, RIGOREAU, Laurent und SMITH, Graeme C.M.: *Identification of a highly potent and selective DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) inhibitor (NU7441) by screening of chromenone libraries*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14:6083–6087, 2004.
- [194] ZHAO, Yan, THOMAS, Huw D., BATEY, Michael A., COWELL, Ian G., RICHARDSON, Caroline J., GRIFFIN, Roger J., CALVERT, A. Hilary, NEWELL, David R., SMITH, Graeme C.M. und CURTIN, Nicola J.: *Preclinical evaluation of a potent novel DNA-dependent protein kinase inhibitor NU7441*. *Cancer Research*, 66:5354–5362, 2006.
- [195] TOULANY, Mahmoud, MAIER, Julia, IIDA, Mari, REBHOLZ, Simone, HOLLER, Marina, GROTTKE, Astrid, JÜKER, Manfred, WHEELER, Deric L, ROTHBAUER, Ulrich und RODEMANN, H Peter: *Akt1 and Akt3 but not Akt2 through interaction with DNA-PKcs stimulate proliferation and post-irradiation cell survival of K-RAS-mutated cancer cells*. *Cell Death Discovery*, 3:17072, 2017.
- [196] GAVANDE, Navnath S, VANDERVERE-CAROZZA, Pamela S, HINSHAW, Hilary D, JALLAL, Shadia I, SEARS, Catherine R, PAWELCZAK, Katherine S und TURCHI, John J: *DNA repair targeted therapy: the past or future of cancer treatment?* *Pharmacological Therapies*, 160:65–83, 2017.
- [197] TSAI, Alexander K., KHAN, Asra Y, WORGIO, Christina E, WANG, Lucy L, LIANG, Yuan-yuan und DAVILA, Eduardo: *A multikinase and DNA-PK inhibitor combination immunomodulates melanomas, suppresses tumor progression, and enhances immunotherapies*. *Cancer Immunology Research*, 5:790–803, 2017.
- [198] FERGUSON, Brian J., MANSUR, Daniel S., PETERS, Nicholas E., REN, Hongwei und SMITH, Geoffrey L.: *DNA-PK is a DNA sensor for IRF-3-dependent innate immunity*. *eLife*, 2012:1–17, 2012.
- [199] GLENNON, R A, DUKAT, M, WESTKAEMPER, R B, ISMAIEL, A M, IZZARELLI, D G und PARKER, E M: *The binding of propranolol at 5-hydroxytryptamine_{1D} beta T355N mutant receptors may involve formation of two hydrogen bonds to asparagine*. *Molecular Pharmacology*, 49:198–206, 1996.
- [200] PRICHARD, B. N C und GILLAM, P. M S: *Use of Propranolol (Inderal) in Treatment of Hypertension*. *British Medical Journal*, 2:725–727, 1964.

- [201] DUFF, Henry J., MITCHELL, L. Brent und WYSE, D. George: *Antiarrhythmic efficacy of propranolol: Comparison of low and high serum concentrations*. Journal of the American College of Cardiology, 8:959–965, 1986.
- [202] MIZGALA, H F, KHAN, A S und DAVIES, R O: *Propranolol in the prophylactic treatment of angina pectoris*. Canadian Medical Association Journal, 100:213–216, 1969.
- [203] ALDERMAN, E L, DAVIES, R O, CROWLEY, J J, LOPES, M G, BROOKER, J Z, FRIEDMAN, J P, GRAHAM, A F, MATLOF, H J und HARRISON, D C: *Dose response effectiveness of propranolol for the treatment of angina pectoris*. Circulation, 51:964–975, 1975.
- [204] LÉAUTÉ-LABRÈZE, Christine, ROQUE, Eric Dumas de la, HUBICHE, Thomas, BORALEVI, Franck, THAMBO, Jean Benoît und TAÏEB, Alain: *Propranolol for Severe Hemangiomas of Infancy*. New England Journal of Medicine, 358:2649–2651, 2008.
- [205] DENOYELLE, Françoise, LEBOULANGER, Nicolas, ENJOLRAS, Odile, HARRIS, Robert, ROGER, Gilles und GARABEDIAN, Eréa Noël: *Role of Propranolol in the therapeutic strategy of infantile laryngotracheal hemangioma*. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology, 73:1168–1172, 2009.
- [206] KUM, Jina JY und KHAN, Zia A: *Mechanisms of propranolol action in infantile hemangioma*. Dermato-Endocrinology, 6:979699, 2014.
- [207] BORGESSEN, S E: *Treatment of migraine with propranolol*. Postgraduate Medical Journal, 52:163–165, 1976.
- [208] STEPHEN, Stewart A.: *Unwanted effects of Propranolol*. The American Journal of Cardiology, 18:463–472, 1966.
- [209] JOHNSON, Malcolm: *Molecular mechanisms of beta2-adrenergic receptor function, response, and regulation*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 117:18–24, 2006.
- [210] AZZI, Mounia, CHAREST, Pascale G, ANGERS, Stéphane, ROUSSEAU, Guy, KOHOUT, Trudy, BOUVIER, Michel und PIÑEYRO, Graciela: *Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100:11406–11411, 2003.
- [211] ZHANG, Dong, MA, Qing Yong, HU, Heng Tong und ZHANG, Min: *Beta2-adrenergic antagonists suppress pancreatic cancer cell invasion by inhibiting CREB, NF κ B and AP-1*. Cancer Biology and Therapy, 10:19–29, 2010.

- [212] WEISBERG, Ellen, MANLEY, Paul W., BREITENSTEIN, Werner, BRÜGGEN, Josef, COWAN-JACOB, Sandra W., RAY, Arghya, HUNTLY, Brian, FABBRO, Dorian, FENDRICH, Gabriele, HALL-MEYERS, Elizabeth, KUNG, Andrew L., MESTAN, Jürgen, DALEY, George Q., CALLAHAN, Linda, CATLEY, Laurie, CAVAZZA, Cara, MOHAMMED, Azam, NEUBERG, Donna, WRIGHT, Renee D., GILLILAND, D. Gary und GRIFFIN, James D.: *Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl*. Cancer Cell, 7:129–141, 2005.
- [213] CILLONI, Daniela und SAGLIO, Giuseppe: *Molecular pathways: BCR-ABL*. Clinical Cancer Research, 18:930–937, 2012.
- [214] *Clinical trials using the compound AZD2281*. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/clinical-trials/intervention/C48375>, besucht: 2017-11-14.
- [215] GU, Jing Jin, RYU, Jae Ryun und PENDERGAST, Ann Marie: *Abl Tyrosine Kinases in T-cell signaling*. Immunological Reviews, 228:170–183, 2009.
- [216] CARRÀ, Giovanna, TORTI, Davide, CRIVELLARO, Sabrina, PANUZZO, Cristina, TAULLI, Riccardo, CILLONI, Daniela, GUERRASIO, Angelo, SAGLIO, Giuseppe und MOROTTI, Alessandro: *The BCR-ABL/NF- κ B signal transduction network: a long lasting relationship in Philadelphia positive Leukemias*. Oncotarget, 7:66287–66298, 2016.
- [217] CUI, Lingling, CHEN, Cuixia, XU, Ting, ZHANG, Juechao, SHANG, Xin, LUO, Jixian, CHEN, Liang, BA, Xueqing und ZENG, Xianlu: *c-Abl Kinase Is Required for β 2 Integrin-Mediated Neutrophil Adhesion*. Journal of Immunology, 182:3233–3242, 2009.
- [218] CARSWELL, E. A., OLD, L. J., KASSEL, R. L., GREEN, S., FIORE, N. und WILLIAMSON, B.: *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 72:3666–3670, 1975.
- [219] D'AURIA, L., MUSSI, A., BONIFATI, C., MASTROIANNI, A., GIACALONE, B. und AMEGLIO, F.: *Increased serum IL-6, TNF-alpha and IL-10 levels in patients with bullous pemphigoid: Relationships with disease activity*. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 12:11–15, 1999.
- [220] LÓPEZ-ROBLES, Eréndira, AVALOS-DÍAZ, Esperanza, VEGA-MEMIJE, Elisa, HOJYOTOMOKA, Teresa, VILLALOBOS, Ricardo, FRAIRE, Saúl, DOMÍGUEZ-SOTO, Luciano und HERRERA-ESPARZA, Rafael: *TNF-alpha and IL-6 are mediators in the blistering process of pemphigus*. International Journal of Dermatology, 40:185–188, 2001.

- [221] HARAOUI, Boulos und BYKERK, Vivian: *Etanercept in the treatment of rheumatoid arthritis*. Therapeutics and Clinical Risk Management, 3:99–105, 2007.
- [222] LIN, M H, HSU, C K und LEE, J: *Successful Treatment of Recalcitrant Pemphigus Vulgaris and Pemphigus Vegetans With Etanercept and Carbon Dioxide Laser*. Archives of Dermatology, 141:680, 2005.
- [223] GUBINELLI, Emanuela, BERGAMO, Fabio, DIDONA, Biagio, ANNESSI, Giorgio, ATZORI, Francesco und RASKOVIC, Desanka: *Pemphigus foliaceus treated with etanercept*. Journal of the American Academy of Dermatology, 55:1107–1108, 2006.
- [224] JOHN, H, WHALLETT, A und QUINLAN, M: *Successful biologic treatment of ocular mucous membrane pemphigoid with anti-TNF- α* . Eye, 21:1433–1434, 2007.
- [225] KENNEDY, Jeremy Scott, DEVILLEZ, Richard L und HENNING, Jeffrey Scott: *Recalcitrant cicatricial pemphigoid treated with the anti-TNF- α agent etanercept*. Journal of Drugs in Dermatology, 9:68–70, 2010.
- [226] MCCAIN, M. E., QUINET, R. J. und DAVIS, W. E.: *Etanercept and infliximab associated with cutaneous vasculitis*. Rheumatology, 41:116–117, 2002.
- [227] JETHWA, H. und MANN, S.: *Crohn's disease unmasked following etanercept treatment for ankylosing spondylitis*. British Medical Journal Case Reports, 2013:bcr2013009166, 2013.
- [228] LEHMANN, Claudia, BETTE, Stefanie und ENGELE, Jürgen: *High extracellular glutamate modulates expression of glutamate transporters and glutamine synthetase in cultured astrocytes*. Brain Research, 1297:1–8, 2009.
- [229] KARLSSON, a, NIXON, J B und MCPHAIL, L C: *Phorbol myristate acetate induces neutrophil NADPH-oxidase activity by two separate signal transduction pathways: dependent or independent of phosphatidylinositol 3-kinase*. Journal of Leukocyte Biology, 67:396–404, 2000.
- [230] DECHATELET, L R, LONG, G D, SHIRLEY, P S, BASS, D A, THOMAS, M J, HENDERSON, F W und COHEN, M S: *Mechanism of the luminol-dependent chemiluminescence of human neutrophils*. Journal of Immunology, 129:1589–1593, 1982.
- [231] BIEBER, Katja, KOGA, Hiroshi und NISHIE, Wataru: *In vitro and in vivo models to investigate the pathomechanisms and novel treatments for pemphigoid diseases*. Experimental Dermatology, 26:1163–1170, 2017.
- [232] HOFF, Florian: *How to Prepare Your Specimen for Immunofluorescence Microscopy*, 2015. <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/how-to-prepare-your-specimen-for-immunofluorescence-microscopy/>, besucht: 2018-06-12.

- [233] ROSKOSKI, Robert: *A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors*. Pharmacological Research, 100:1–23, 2015.
- [234] PATTERSON, H., NIBBS, R., MCINNES, I. und SIEBERT, S.: *Protein kinase inhibitors in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases*. Clinical and Experimental Immunology, 176:1–10, 2014.
- [235] BOREL, J F: *Comparative study of in vitro and in vivo drug effects on cell-mediated cytotoxicity*. Immunology, 31:631–41, 1976.
- [236] MCMARTIN, C., PURDON, G. E.E., SCHENKEL, L., DESAULLES, P. A., MAIER, R., BRUGGER, M., RITTEL, W. und SIEBER, P.: *Differences between in vitro and in vivo potencies of corticotrophins: an interpretation in terms of metabolic stability*. Journal of Endocrinology, 73:79–89, 1977.
- [237] MARROUM, Patrick J.: *History and evolution of the dissolution test*. Dissolution Technologies, 21:11–16, 2014.
- [238] SITARU, A. G., SESARMAN, A., MIHAI, S., CHIRIAC, M. T., ZILLIKENS, D., HULTMAN, P., SOLBACH, W. und SITARU, C.: *T Cells Are Required for the Production of Blister-Inducing Autoantibodies in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita*. Journal of Immunology, 184:1596–1603, 2010.
- [239] JACKSON, Shaun P, SCHOENWAEELDER, Simone M, GONCALVES, Isaac, NESBITT, Warwick S, YAP, Cindy L, WRIGHT, Christine E, KENCHE, Vijaya, ANDERSON, Karen E, DOPHEIDE, Sacha M, YUAN, Yuping, STURGEON, Sharelle A, PRABAHARAN, Hishani, THOMPSON, Philip E, SMITH, Gregg D, SHEPHERD, Peter R, DANIELE, Nathalie, KULKARNI, Suhasini, ABBOTT, Belinda, SAYLIK, Dilek, JONES, Catherine, LU, Lucy, GIULIANO, Simon, HUGHAN, Sascha C, ANGUS, James A, ROBERTSON, Alan D und SALEM, Hatem H: *PI 3-kinase p110 β : a new target for antithrombotic therapy*. Nature Medicine, 11:507–514, 2005.
- [240] WECKBECKER, Gisbert, PALLY, Charles, BEERLI, Christian, BURKHART, Christoph, WIECZOREK, Grazyna, METZLER, Barbara, MORRIS, Randall E, WAGNER, Juer-gen und BRUNS, Christian: *Effects of the novel protein kinase C inhibitor AEB071 (Sotrastaurin) on rat cardiac allograft survival using single agent treatment or combination therapy with cyclosporine, everolimus or FTY720*. Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation, 23:543–552, 2010.
- [241] SOOD, Anil K., BHATTY, Robert, KAMAT, Aparna A., LANDEN, Charles N., HAN, Liz, THAKER, Premal H., LI, Yang, GERSHENSON, David M., LUTGENDORF, Susan und COLE, Steven W.: *Stress hormone-mediated invasion of ovarian cancer cells*. Clinical Cancer Research, 12:369–375, 2006.

- [242] ZHOU, Chengfang, CHEN, Xiang, ZENG, Weiqi, PENG, Cong, HUANG, Gang, LI, Xian'an, OUYANG, Zhengxiao, LUO, Yi, XU, Xuezheng, XU, Biaobo, WANG, Weili, HE, Ruohui, ZHANG, Xu, ZHANG, Liyang, LIU, Jie, KNEPPER, Todd C., HE, Yijing, MCLEOD, Howard L., ZHOU, Chengfang, CHEN, Xiang, ZENG, Weiqi, PENG, Cong, HUANG, Gang, LI, Xian'an, OUYANG, Zhengxiao, LUO, Yi, XU, Xuezheng, XU, Biaobo, WANG, Weili, HE, Ruohui, ZHANG, Xu, ZHANG, Liyang, LIU, Jie, KNEPPER, Todd C., HE, Yijing und MCLEOD, Howard L.: *Propranolol induced G0/G1/S phase arrest and apoptosis in melanoma cells via AKT/MAPK pathway*. *Oncotarget*, 7:68314–68327, 2016.
- [243] HIRAI, H., SOOTOME, H., NAKATSURU, Y., MIYAMA, K., TAGUCHI, S., TSUJIOKA, K., UENO, Y., HATCH, H., MAJUMDER, P. K., PAN, B. S. und KOTANI, H.: *MK-2206, an Allosteric Akt Inhibitor, Enhances Antitumor Efficacy by Standard Chemotherapeutic Agents or Molecular Targeted Drugs In vitro and In vivo*. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9:1956–1967, 2010.
- [244] WALLUF-BLUME, Dagmar: *Verordnung über Arzneimittel für seltene Krankheiten in Sicht*, 1999. https://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=pol2_{_}50_{_}1999, besucht: 2018-06-11.
- [245] ZYLKA-MENHORN, Vera: *Folgeschäden vermeiden*. *Deutsches Ärzteblatt*, 105:2412, 2008.
- [246] WINDELER, Jürgen, KOCH, Klaus, LANGE, Stefan und LUDWIG, Wolf Dieter: *Zu guter Letzt ist alles selten*. *Deutsches Ärzteblatt*, 107:A 2032–2034, 2010.
- [247] NAYLOR, Tara L., TANG, Huaping, RATSCH, Boris A., ENNS, Andreas, LOO, Alice, CHEN, Liqing, LENZ, Peter, WATERS, Nigel J., SCHULER, Walter, DÖRKEN, Bernd, YAO, Yung Mae, WARMUTH, Markus, LENZ, Georg und STEGMEIER, Frank: *Protein kinase C inhibitor sotrastaurin selectively inhibits the growth of CD79 mutant diffuse large B-cell lymphomas*. *Cancer Research*, 71:2643–2653, 2011.
- [248] ANRATHER, Josef, RACCHUMI, Gianfranco und IADECOLA, Costantino: *NF- κ B regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox*. *Journal of Biological Chemistry*, 281:5657–5667, 2006.
- [249] CAPSONI, F., ONGARI, A.M., REALI, E., BOSÈ, F. und G.F., Altomare: *The protein kinase C inhibitor AEB071 (sotrastaurin) modulates migration and superoxide anion production by human neutrophils in vitro*. *International of Immunopathology and Pharmacology*, 25:617–626, 2012.

- [250] PARK, Hee Young, LEE, Jin, GONZÁLEZ, Salvador, MIDDELKAMP-HUP, Maritza A., KAPASI, Sameer, PETERSON, Shaun und GILCHREST, Barbara A.: *Topical Application of a Protein Kinase C Inhibitor Reduces Skin and Hair Pigmentation*. Journal of Investigative Dermatology, 122:159–166, 2004.
- [251] HAWKINS, Phillip T., STEPHENS, Len R., SUIRE, Sabine und WILSON, Michael: *PI3K Signaling in Neutrophils*. Current Topics in Microbiology and Immunology, 346:183–202, 2010.
- [252] STARK, Anne Katrien, SRISKANTHARAJAH, Srividya, HESSEL, Edith M. und OKKENHAUG, Klaus: *PI3K inhibitors in inflammation, autoimmunity and cancer*. Current Opinion in Pharmacology, 23:82–91, 2015.
- [253] CONDLIFFE, Alison M, DAVIDSON, Keith, ANDERSON, Karen E, ELLSON, Chris D, CRABBE, Tom, OKKENHAUG, Klaus, VANHAESEBROECK, Bart, TURNER, Martin, WEBB, Louise, WYMAN, Matthias P, HIRSCH, Emilio, RUCKLE, Thomas, CAMPS, Montserrat, ROMMEL, Christian, JACKSON, Shaun P, CHILVERS, Edwin R, STEPHENS, Len R und HAWKINS, Phillip T: *Sequential activation of class IB and class IA PI3K is important for the primed respiratory burst of human but not murine neutrophils*. Blood, 106:1432–1440, 2005.
- [254] GRAVEEL, Carrie R., TOLBERT, David und VANDE WOUDE, George F.: *MET: A critical player in tumorigenesis and therapeutic target*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 5:1–18, 2013.
- [255] BOZULIC, Lana, SURUCU, Banu, HYNX, Debby und HEMMING, Brian A.: *PKBalpha/Akt1 Acts Downstream of DNA-PK in the DNA Double-Strand Break Response and Promotes Survival*. Molecular Cell, 30:203–213, 2008.
- [256] GHONIM, Mohamed A., PYAKUREL, Kusma, JU, Jihang, RODRIGUEZ, Paulo C., LAMMI, Matthew R., DAVIS, Christian, ABUGHAZLEH, Mohammad Q., MANSY, Moselhy S., NAURA, Amarjit S und BOULARES, A. Hamid: *DNA-PK inhibition blocks asthma in mice and modulates human endothelial and CD4+ T cell function without causing SCID*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 135:425–440, 2015.
- [257] BOSMANN, M., GRAILER, J. J., ZHU, K., MATTHAY, M. A., SARMA, J. V., ZETOONE, F. S. und WARD, P. A.: *Anti-inflammatory effects of 2 adrenergic receptor agonists in experimental acute lung injury*. The FASEB Journal, 26:2137–2144, 2012.
- [258] SCANZANO, Angela und COSENTINO, Marco: *Adrenergic regulation of innate immunity: a review*. Frontiers in Pharmacology, 6:171, 2015.

- [259] HENG, Madalene C.Y. und HENC, Ming Kiat: *Beta-Adrenoceptor Antagonist-Induced Psoriasiform Eruption: Clinical and Pathogenetic Aspects*. International Journal of Dermatology, 27:619–627, 1988.
- [260] ADAMU, Umar, AISHA, Abdullahi, STEPHEN, Aiyedun und JOSEPH, Thomas: *Metoprolol-induced Psoriasiform Drug Eruption: A Case Report*. International Journal of Medical and Pharmaceutical Case Reports, 9:1–4, 2017.
- [261] EL JAMALI, Amina, VALENTE, Anthony J und CLARK, Robert A: *Regulation of phagocyte NADPH oxidase by hydrogen peroxide through a Ca²⁺/c-Abl signaling pathway*. Free Radical Biology and Medicine, 48:798–810, 2010.
- [262] BARUZZI, Anna, IACOBUCCI, Ilaria, SOVERINI, Simona, LOWELL, Clifford A., MARTINELLI, Giovanni und BERTON, Giorgio: *c-Abl and Src-family kinases cross-talk in regulation of myeloid cell migration*. FEBS Letters, 584:15–21, 2010.
- [263] WEISBERG, E., MANLEY, P., MESTAN, J., COWAN-JACOB, S., RAY, A. und GRIFFIN, J. D.: *AMN107 (nilotinib): A novel and selective inhibitor of BCR-ABL*. British Journal of Cancer, 94:1765–1769, 2006.
- [264] CHEN, Jia, TANG, Haiyang, HAY, Nissim, XU, Jingsong und YE, Richard D: *Akt isoforms differentially regulate neutrophil functions*. Blood, 115:4237–46, 2010.
- [265] YAP, Timothy A, YAN, Li, PATNAIK, Amita, FEAREN, Ivy, OLMOS, David, PAPADOPOULOS, Kyriakos, BAIRD, Richard D, DELGADO, Liliana, TAYLOR, Adekemi, LUPINACCI, Lisa, RIISNAES, Ruth, POPE, Lorna L, HEATON, Simon P, THOMAS, George, GARRETT, Michelle D, SULLIVAN, Daniel M, BONO, Johann S de und TOLCHER, Anthony W: *First-in-man clinical trial of the oral pan-AKT inhibitor MK-2206 in patients with advanced solid tumors*. Journal of Clinical Oncology, 29:4688–4695, 2011.
- [266] GORLICK, Richard, MARIS, John M, HOUGHTON, Peter J, LOCK, Richard, CAROL, Hernan, KURMASHEVA, Raushan T, KOLB, E Anders, KEIR, Stephen T, REYNOLDS, C Patrick, KANG, Min H, BILLUPS, Catherine A und SMITH, Malcolm A: *Testing of the Akt/PKB inhibitor MK-2206 by the Pediatric Preclinical Testing Program*. Pediatric Blood & Cancer, 59:518–24, 2012.
- [267] DEFEO-JONES, Deborah, BARNETT, Stanley F, FU, Sheng, HANCOCK, Paula J, HASKELL, Kathleen M, LEANDER, Karen R, MCAVOY, Elizabeth, ROBINSON, Ronald G, DUGGAN, Mark E, LINDSLEY, Craig W, ZHAO, Zhijian, HUBER, Hans E und JONES, Raymond E: *Tumor cell sensitization to apoptotic stimuli by selective inhibition of specific Akt/PKB family members*. Molecular Cancer Therapeutics, 4:271–9, 2005.

- [268] HUMPHRIES-BICKLEY, Tessa, CASTILLO-PICHARDO, Linette, CORUJO-CARRO, Francheska, DUCONGE, Jorge, HERNANDEZ-O'FARRILL, Eliud, VLAAR, Cornelis, RODRIGUEZ-ORENGO, Jose F., CUBANO, Luis und DHARMAWARDHANE, Suran-ganie: *Pharmacokinetics of Rac inhibitor EHOp-016 in mice by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 981-982:19–26, 2015.
- [269] MÓCSAI, Attila, ZHOU, Meijuan, MENG, Fanying, TYBULEWICZ, Victor L. und LOWELL, Clifford A.: *Syk is required for integrin signaling in neutrophils*. Immunity, 16:547–558, 2002.
- [270] AL-SHAMI, Amin, MAHANNA, Wahib und NACCACHE, Paul H.: *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-activated signaling pathways in human neutrophils. Selective activation of Jak2, Stat3, and Stat5B*. Journal of Biological Chemistry, 273:1058–1063, 1998.
- [271] HURTADO-NEDELEC, Margarita, CSILLAG-GRANGE, Marie José, BOUSSETTA, Tarek, BELAMBRI, Sahra Amel, FAY, Michèle, CASSINAT, Bruno, GOUGEROT-POCIDALO, Marie Anne, DANG, Pham My Chan und EL-BENNA, Jamel: *Increased reactive oxygen species production and p47phox phosphorylation in neutrophils from myeloproliferative disorders patients with JAK2 (V617F) mutation*. Haematologica, 98:1517–24, 2013.
- [272] VERSTOVSEK, Srdan, TAM, Constantine S, WADLEIGH, Martha, SOKOL, Lubomir, SMITH, Catherine C, BUI, Lynne A, SONG, Chunyan, CLARY, Douglas O, OLSZYNSKI, Patrycja, CORTES, Jorge, KANTARJIAN, Hagop und SHAH, Neil P: *Phase I evaluation of XL019, an oral, potent, and selective JAK2 inhibitor*. Leukemia Research, 38:316–22, 2014.
- [273] XU, Xuehua und JIN, Tian: *The novel functions of the PLC/PKC/PKD signaling axis in G protein-coupled receptor-mediated chemotaxis of neutrophils*. Journal of Immunology Research, 2015:14–19, 2015.
- [274] DALE, M M und PENFIELD, A: *Comparison of the effects of indomethacin, RHC80267 and R59022 on superoxide production by 1,oleyl-2,acetyl glycerol and A23187 in human neutrophils*. British Journal of Pharmacology, 92:63–68, 1987.
- [275] TUKAJ, Stefan, BIEBER, Katja, KLESZCZYŃSKI, Konrad, WITTE, Mareike, CAMES, Rebecca, KALIES, Kathrin, ZILLIKENS, Detlef, LUDWIG, Ralf J., FISCHER, Tobias W. und KASPERKIEWICZ, Michael: *Topically Applied Hsp90 Blocker 17AAG Inhibits Autoantibody-Mediated Blister-Inducing Cutaneous Inflammation*. Journal of Investigative Dermatology, 137:341–349, 2017.

- [276] SOLDIN, Offie P und MATTISON, Donald R: *Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics*. Clinical Pharmacokinetics, 48:143–157, 2009.
- [277] FRANCONI, Flavia und CAMPESI, Ilaria: *Sex and gender influences on pharmacological response: An overview*. Expert Review of Clinical Pharmacology, 7:469–485, 2014.
- [278] TANNENBAUM, Cara und DAY, Danielle: *Age and sex in drug development and testing for adults*. Pharmacological Research, 121:83–93, 2017.
- [279] SIMON, A Katharina, HOLLANDER, Georg A und MCMICHAEL, Andrew: *Evolution of the immune system in humans from infancy to old age*. Proceedings. Biological sciences, 282, 2015.
- [280] KASPRICK, Anika: *Die Beteiligung von Mastzellen in der Autoimmunerkrankung Epi-dermolysis bullosa acquisita*. Dissertation, Universität zu Lübeck, 2013. <https://www.zhb.uni-luebeck.de/epubs/ediss1322.pdf>.

6 Anhang

6.1 Medien und Puffer

Tabelle 6.1 Angesetzte Medien und Puffer

Medium/Puffer	Inhaltsstoffe
Bindungspuffer für ROS-Assay	250 ml PBS 2,5 g BSA biotinfrei (sterilfiltriert)
Beschichtungspuffer (0,05 M; pH=9,6)	250 ml A.dest. (endotoxinfrei) 1,325 g Natriumcarbonat Na_2CO_3 (106 g/mol) 1,05 g Natriumhydrogencarbonat $NaHCO_3$ (84 g/mol)
CL-Medium	472,5 ml RPMI 1640 w Glutamine, w/o Glukose, w/o Phenol red 12,5 ml HEPES Bufer solution 1M 5 ml FCS 10 ml Glukose (10%)
FACS Puffer	1% BSA in PBS)
RPMI-Halbmedium	25 ml RPMI 1640 w L-Glutamine, w 25mM Hepes 25 ml A.dest (endotoxinfrei)
Ketamin-Xylazin Narkose	10 mg/ml Ketamin Xylazin 1,5 mg/ml
Luminol-Lösung	2 mg Luminol 8 μ l NaOH 2M 1 ml A.dest.
Lyse-Puffer	40 ml Aqua dest. 10 ml 0,9% Natriumchlorid
Waschpuffer (pH=7,2)	5 L 1xPBS Phosphorsäure bis pH=7,2 2,5 ml Tween 20

6.2 Anträge, Bescheinigungen, Zertifikate



Im Fokus das Leben
Universität zu Lübeck

Medizinische Fakultät

Ethik-Kommission

Vorsitzender:

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

Universität zu Lübeck

Stellv. Vorsitzende:

Frau Prof. Dr. med. M. Schrader

Ratzeburger Allee 160

23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Dr. Angelika Hüppe

Tel.: +49 451 500 5854

Fax: +49 451 500 5872

angelika.hueppe@uk-sh.de

Aktenzeichen: 09-140

Datum 13.11.2009

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Hr. Prof. Dr. Ludwig
Klinik für Dermatologie und Venerologie

im Haus

Sitzung der Ethik-Kommission am 06. Oktober 2009, Nachreichung vom 06.11.2009

Antragsteller: Hr. Prof. Dr. Ludwig

Titel: Pathogenese und Therapie Autoantikörper-induzierter Gewebsschädigung

Sehr geehrter Herr Ludwig,

der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft. Die Kommission hat keine Bedenken mehr.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muss die Kommission umgehend benachrichtigt werden. Nach Abschluss des Projektes bitte ich um Übersendung eines knappen Schlussberichtes (unter Angabe unseres Aktenzeichens), aus dem der Erfolg/Misserfolg der Studie sowie Angaben darüber, ob die Studie abgebrochen oder geändert bzw. ob Regressansprüche geltend gemacht wurden, ersichtlich sind. Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Studie und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß

Prof. Dr. Dr. H. Raspe
Vorsitzender

anwesende Kommissionsmitglieder: ☒

☒ Prof. Dr. Dr. H.-H. Raspe
(Sozialmedizin, Vorsitzender der EK)
☒ Prof. Dr. Schweiger (Psychiatrie)
☒ Prof. Dr. Dendorfer (Pharmakologie)
☒ Frau Prof. E. Stubbe (Theologin)
Prof. Dr. Borek (Medizin- und
Wissenschaftsgeschichte)

Frau H. Müller
(Pflege)
Dr. Kaiser
(Kinderchirurgie)
☒ Herr Dr. Fieber
(Richter am Amtsgericht Ahrensburg)
☒ Prof. Schwinger (Humangenetik)

☒ Herr Prof. Dr. Mönig
(Medizinische Klinik I)
☒ Frau Prof. Dr. M. Schrader
(Plastische Chirurgie, Stellv. Vors.)
☒ Herr D. Stojan
(Präsident des Amtsgerichtes Lübeck)

Schleswig-Holstein
Der echte Norden



Schleswig-Holstein
Ministerium für Energie-
wende, Landwirtschaft,
Umwelt und ländliche Räume

Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt
und ländliche Räume | Postfach 71 51 | 24171 Kiel

Frau
Dr. Katja Bieber
Institut für Experimentelle Dermatologie
Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Ihr Zeichen:
Ihr Antrag vom: 20.10.2015
Mein Zeichen: V 242 - 79228/2015 (108-8/15)
Meine Nachricht vom: /

Anja Hinz
Anja.Hinz@melur.landsh.de
Telefon: +49 431 988-7128
Fax: +49-431-988-6-157128

nachrichtlich:
Herrn Dr. B. Schmelting
Gemeinsame Tierhaltung
der Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23562 Lübeck

09. Dezember 2015

Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Sehr geehrte Frau Dr. Bieber,

gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206), zuletzt geändert durch Gesetz vom 28. Juli 2014 (BGBl. I S. 1308), erteile ich Ihnen die Genehmigung, im Rahmen des Versuchsvorhabens

Inhibition von intrazellulären Signalwegen bei Epidermolysis bullosa acquisita

zu Versuchszwecken Eingriffe und Behandlungen an Tieren vorzunehmen.

Die Genehmigung ist mit folgenden Nebenbestimmungen verbunden:

1. Es dürfen bis zu 528 Mäuse verwendet werden.
2. Die Genehmigung ist bis zum 31. Dezember 2018 befristet.
3. Ort der Durchführung:
Universität zu Lübeck, Gemeinsame Tierhaltung



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK
GEMEINSAME TIERHALTUNG

Leitung
Dr. med. vet. Barthel Schmelting, Ph.D.
Fachtierarzt für Versuchstierkunde
Tierschutzbeauftragter der Universität
Ratzeburger Allee 160
23562 Lübeck
Tel. +49 451 500 2875
Fax +49 451 500 4193
schmelting@gth.uni-luebeck.de

Teilnahmebescheinigung

Frau Katharina Schulze Dierckhoff

hat vom 06.10. – 12.10.2015 an einem 40-stündigen Kurs der Universität zu Lübeck

„Einführung in die Versuchstierkunde“

erfolgreich teilgenommen (20h Theorie, 20 h Praxis mit abschließender schriftlicher Leistungskontrolle).

Folgende Kursinhalte wurden vermittelt (mit * gekennzeichnete Teile ebenfalls praktisch):

Einführung in die Versuchstierkunde /Tierschutz und Tierversuche

Ersatz- und Ergänzungsmethoden

Biologie der wichtigsten Versuchstierarten

(Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Schwein, Schaf, Fische (Zebrafisch))

Biologie, Anatomie*, Physiologie, Verhalten (Maus, Ratte)* / Umgang mit Versuchstieren (Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Minipig, Schaf, Fische)* / Erkennen von Schmerzen, Leiden und Schäden / Nager: Ernährung und Fütterung / Nager: Zucht und Genetik

Pflege und Haltung

Tierhaltungsräume, Barriere, Haltungseinheiten, Käfigsysteme*, Mindestraumbedarf / Fütterung

Hygiene in Versuchstierhaltungen

Reinigung, Desinfektion / Mikrobiologischer Status von Versuchstieren / Gesundheitsüberwachung des Tierbestandes, Verhinderung von Infektionen / Versuchstierkrankheiten (Erkennen, Behandeln, Schutzmaßnahmen / Einflüsse auf Versuchsergebnisse) / Arbeiten, Hygieneprinzip unter Umsetzstationen*

Ethische Grundlagen für tierexperimentelles Arbeiten

Rechtliche Grundlagen für tierexperimentelles Arbeiten

2010/63EU und Umsetzung durch das Tierschutzgesetz, Tierschutzversuchstierverordnung, Versuchstiermeldeverordnung / Tierschutzbeauftragter / §15 Kommission

Durchführung und Planung von Tierversuchen

Versuchsplanung und Protokollführung* / Literaturrecherche / Biometrische Statistik / analoge und digitale Dokumentation* / Narkose*, Schmerzausschaltung / Abbruchkriterien zur Leidensbegrenzung / Sicheres handling von Nagern, Kaninchen und Schaf* / Methoden der Applikation Nager*, Kaninchen, Probenentnahme Nager* (ip, sc, iv, po, laterale Schwanzvene, retrobulbär, mandibulär, intrakardial)* / Tierschutzgerechte Tötung von Versuchstieren* / Sektion Maus* / 3R-Prinzip / Weiterbildungsmöglichkeiten

Lübeck, den 16.10.2015

Dr. B. Schmelting, Ph.D.

IM FOCUS DAS LEBEN
WISSEN SCHÜTZT TIERE

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematischer Aufbau der Haut (Querschnitt) und ihrer Strukturproteine - Zielantigene bullöser Autoimmundermatosen	3
1.2	Klassifikation bullöser Autoimmunerkrankungen	4
1.3	Aufbau von COL7 und der COL7-Ankerfibrillen	9
1.4	Schematische Darstellung pathologischer Mechanismen bei EBA	10
1.5	Beispielhafte Signalkaskade zur Freisetzung von ROS aus aktivierten neutrophilen Granulozyten	13
2.1	Polymorphprep Dichtegradient	28
2.2	Schema der Plattenbelegung	29
2.3	Pipettierschema zur Verdünnung der Medikamente auf die gewünschten Konzentrationen	30
2.4	Kontrolle der Neutrophilenstimulation durch hCOL7-anti-hCOL7-IgG1 Immunkomplexe	31
2.5	Durchflusszytometrische Analyse zur Bestimmung der Reinheit isolierter humaner PMN's	32
2.6	Behandlungsschema im <i>in vivo</i> Modell der lokalen EBA	33
2.7	Score zur Analyse HE-gefärbter Gewebeschnitte	36
3.1	Relative ROS-Freisetzung im Freisetzungsversuch - hemmende STI	41
3.2	Relative ROS-Freisetzung im Freisetzungsversuch - aktivierende STI	42
3.3	Relative ROS-Freisetzung im Freisetzungsversuch - wirkungslose STI	45
3.4	Lokale EBA in GDC-0941- und Lösungsmittel-behandelten Mäusen	49
3.5	Lokale EBA in Sotrastaurin- und Lösungsmittel-behandelten Mäusen	51
3.6	Lokale EBA in PHA-665752- und Lösungsmittel-behandelten Mäusen	53
3.7	Lokale EBA in NU7441- und Lösungsmittel-behandelten Mäusen	55
3.8	Lokale EBA in Propranolol HCl- und Lösungsmittel-behandelten Mäusen	57
3.9	Lokale EBA in BX-795- und Lösungsmittel-behandelten Mäusen	59
3.10	Lokale EBA in EHop-016- und Lösungsmittel-behandelten Mäusen	61
3.11	Lokale EBA in MK-2206 2HCl- und Lösungsmittel-behandelten Mäusen	63
3.12	Lokale EBA in IC-87114- und Lösungsmittel-behandelten Mäusen	65
3.13	Lokale EBA in Nilotinib- und Lösungsmittel-behandelten Mäusen	67

3.14 Lokale EBA in PH-797804- und Lösungsmittel-behandelten Mäusen	69
3.15 Lokale EBA in Enbrel- und Lösungsmittel-behandelten Mäusen	70
4.1 Übersicht der Wirksamkeit getesteter Substanzen im <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Modell .	72

Tabellenverzeichnis

2.1	verwendete Reagenzien und Chemikalen	20
2.2	verwendete Laborgeräte, Verbrauchsmaterialien und Software	22
2.3	Lösung und Konzentration ausgewählter Substanzen für die <i>in vitro</i> -Testung ihres Einflusses auf die Signaltransduktion zur ROS-Freisetzung in aktivierten neutrophilen Granulozyten	24
2.4	Trägersubstanzen und Dosierungen der Medikamente für die <i>in vivo</i> Versuche .	26
6.1	Angesetzte Medien und Puffer	118

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mich durch ihre wertvolle Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit begleitet haben.

Ich danke dem gesamten Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie (LIED), insbesondere der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Ralf Ludwig, und dem Direktor der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie Lübeck, Herrn Prof. Dr. Detlef Zillikens für die Möglichkeit der Versuchsdurchführung in ihrem Forschungslabor sowie für die Bereitstellung aller benötigten Materialien.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Ralf Ludwig danke ich für das spannende Thema, das er mir überließ, und an dem ich mit Hilfe seiner Anregungen und fachlichen Ratschläge gerne arbeitete.

Ein ganz besonders großer Dank gilt meiner Betreuerin und Mentorin Frau Dr. rer. physiol. Katja Bieber, die mich während der gesamten Arbeit sowohl mit ihrer fachlichen Kompetenz wie auch mit tatkräftiger Unterstützung bei der Arbeit mit den Versuchstieren begleitete. Als Ansprechpartnerin stand sie immer bereit und begeisterte mich durch ihre immerwährende Motivation und den Spaß an ihrer Arbeit.

Weiter möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Tamàs Laskay bedanken, der ebenfalls das Mentoring übernahm.

Allen Mitgliedern der Forschungsgruppen des LIEDs und den Doktoranden, mit denen ich während des Promotionsvorhabens zusammen gearbeitet habe, möchte ich für die gemeinsame Zeit im Labor mit einer tollen Arbeitsatmosphäre und ständiger gegenseitiger Hilfsbereitschaft danken. Melanie Hegenbarth möchte ich besonders für die Unterstützung und die gemeinsame Arbeit mit den Versuchstieren danken. Hervorzuheben sind im Besonderen auch Astrid Fischer und Claudia Kauderer, die mich geduldig die Methoden meiner Doktorarbeit lehrten, für Rat und Tat bereitstanden und mir so den Einstieg in das experimentelle Arbeiten erleichterten. Auch für die Bereitstellung der Antikörper für die Tierversuche bedanke ich mich herzlich bei Astrid Fischer. Für die technische Unterstützung hinsichtlich der Gewebeproben bedanke ich mich bei dem Routinelabor der Dermatologie der Universität zu Lübeck und insbesondere bei Rebecca Cames und Diana Scheppen.

Ich danke dem Graduiertenkolleg 1727 (GRK1727) Modulation von Autoimmunität und der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG) für die Förderung durch ein Stipendium, was mir die Niederlegung meines Studiums für die Dauer der Forschungsarbeit im Labor erlaubte.

Das GRK bildete einen Rahmen zum wissenschaftlichen Austausch, der mir die Möglichkeit der Präsentation meiner Ergebnisse und anschließender Diskussion gab.

Ich bedanke mich an dieser Stelle herzlich bei allen Probanden, die mit ihrer Blutspende meine Arbeit ermöglichten.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und Freunden danken. Mit eurer Unterstützung und Geduld konnte ich mein Promotionsvorhaben erfolgreich umsetzen. Dass ihr meine schwankenden Launen und meine Verzweiflung an einem ganz bestimmten Text-Satzprogramm ertragen habt, war bestimmt nicht immer ganz leicht. Danke, dass ihr auch in diesen Zeiten für mich da wart und mir darüber hinaus immer neue Zuversicht zugesprochen habt. All eure Unterstützung und Hilfe hat zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Danke!

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Schulze Dieckhoff
Vorname: Katharina
Geburtsdatum: 17.11.1992



Hochschulstudium

2012 / 10: Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
2014 / 08: 1. Staatsexamen M1 (1,5)
2017 / 02-07: Erasmus-Semester an der Universität Caen in Frankreich
2018 / 10: 2. Staatsexamen M2 – schriftlicher Teil

Famulaturen

2015: Anästhesiologie: Sana Kliniken Lübeck
Neurologie: Sana Kliniken Lübeck
Klinik für Dermatologie Lübeck - Labormedizin
2016: Pädiatrie: St. Franziskus Hospital Münster
2017: Hausärztliche Gemeinschaftspraxis St. Lorenz, Lübeck
Praxis für Kinder und Jugendmedizin, Lübeck

Zeitraum der Dissertation

2015 / 09: Beginn der experimentellen Doktorarbeit im LIED
(Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie) (Freisemester)
2017/2018: Semester zur Verfassung der Dissertation
2018 / 10: Fertigstellung der Dissertation

Schulische Ausbildung

1999-2003: Grundschule am Kinderbach, Münster
2003-2012: Geschwister-Scholl-Gymnasium, Münster, Abitur

9 Publikationen

1. Misa Hirose, Anika Kasprick, Foteini Beltisou, Katharina Schulze Dieckhoff, Franziska Sophie Schulze, Unni Samavedam, Jennifer E Hundt, Hendri H. Pas, Marcel F. Jonkman, Enno Schmidt, Kathrin Kalies, Detlef Zillikens, Ralf J. Ludwig, and Katja Bieber. *Reduced Skin Blistering in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita After Anti-TNF Treatment. Molecular Medicine*, 2016, doi: 10.2119/molmed.2015.00206
2. Unni K. Samavedam, Nina Mitschker, Anika Kasprick, Katja Bieber, Enno Schmidt, Tamás Laskay, Andreas Recke, S. Goletz, Gestur Vidarsson, Franziska S. Schulze, Mikko Armbrust, Katharina Schulze Dieckhoff, Hendri H. Pas, Marcel F. Jonkman, Kathrin Kalies, Detlef Zillikens, Yask Gupta, Saleh M. Ibrahim, and Ralf J. Ludwig. *Whole-Genome Expression Profiling in Skin Reveals SYK As a Key Regulator of Inflammation in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita. Frontiers in Immunology*, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.00249