

Aus dem Lübecker Institut für experimentelle Dermatologie
der Universität zu Lübeck
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Enno Schmidt

Die Effekte der verschiedenen PI3 Kinase Untereinheiten auf die Aktivierung neutrophiler Granulozyten in vitro

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-aus der Sektion Medizin-

vorgelegt von
Hannah Zillikens
aus Würzburg

Lübeck 2018

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

2. Berichterstatterin/Berichterstatter: Prof. Dr. med. Julia Holle

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2020

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 17.12.2020

Promotionskommission der Sektion Medizin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Struktur der Haut	6
1.1.1. Die dermo-epidermale Junktionszone (DEJ)	7
1.1.2. Typ VII Kollagen (COL7).....	8
1.2. Blasenbildende Autoimmundermatosen	8
1.2.1. Epidemiologie der EBA.....	11
1.2.2. EBA Diagnostik.....	12
1.2.3. EBA Pathogenese	12
1.2.4. Therapeutische Möglichkeiten der EBA.....	16
1.3. Neutrophile Granulozyten	17
1.4. Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K)	19
1.5. Ziel der Arbeit	21
2. Material	22
2.1. Chemikalien und Medien	22
2.1.1. Verdünnungsreihe der PI3K Inhibitoren.....	22
2.1.2. Beschichtung der Platte mit Immunkomplexen.....	23
2.1.3. Chemikalien & Medien für das ROS Release Assay	23
2.1.4. Chemikalien & Medien für die Durchflusszytometrie.....	24
2.1.5. Antikörper für CD-Mix	25
2.1.6. Chemikalien & Medien für das Chemotaxis Assay	26
2.1.7. Chemikalien & Medien für NET Darstellung	27
2.1.8. Chemikalien & Medien für die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der NETs	28
2.1.9. Chemikalien & Medien für Neutrophiles <i>Spreading</i>	28
2.1.10. Chemikalien & Medien für Legendplex	28
2.2. Geräte.....	29
2.3. Verbrauchsmaterial.....	31
3. Methoden.....	33
3.1. Isolation neutrophiler Granulozyten aus humanem Vollblut.....	33
3.1.1. Isolation neutrophiler Granulozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation mit Polymorphprep	33
3.1.2. Isolation neutrophiler Granulozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll Paque Plus.....	34

3.1.3. Isolation neutrophiler Granulozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation mit Pancoll.....	36
3.1.4. Isolation neutrophiler Granulozyten mittels Histopaque- und Percoll-Gradienten.....	36
3.2. Verdünnungen der PI3K Inhibitoren.....	38
3.2.1. Anlegen des Grundstocks der PI3K Inhibitoren	38
3.2.2. Verdünnungsreihe der PI3K Inhibitoren auf 96-well Platte	39
3.3. Bestimmung der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies aus PMNs (ROS-release Assay)	40
3.4. Durchflusszytometrie (FACS)	42
3.5. Chemotaxis.....	46
3.6. Neutrophiles <i>Spreading</i>	48
3.7. Nachweis von <i>Neutrophil extracellular traps</i> (NETs).....	50
3.7.1. Nachweis der NETs durch SytoxGreen Färbung	50
3.7.2. Fluoreszenz-Mikroskopische Darstellung der NETs	50
3.8. Bead-basiertes Immunoassay zur Analyse der Zytokinausschüttung.....	51
3.8.1. Legendplex <i>custom human 6-panel</i>	52
3.8.2. LEGENDplex™ Human Proinflammatory Chemokine Panel (13-plex)	53
4. Ergebnisse.....	54
4.1. PI3K β und δ beeinflussen die ROS Freisetzung von IC-aktivierten PMNs.....	54
4.2. Die Hemmung der PI3K zeigt keinen Einfluss auf die Expression von CD62L auf neutrophilen Granulozyten.....	57
4.3. Die PI3K Inhibitoren zeigen keinen toxischen Effekt auf PMNs.....	59
4.4. Die Hemmung der PI3K α , γ oder δ reduziert die IL-8-induzierte Chemotaxis von PMNs	61
4.5. Neutrophiles <i>Spreading</i> wird durch die Hemmung der PI3K α , β und δ vermindert.....	63
4.6. Die Hemmung der PI3K α und δ moduliert die IC induzierte NET Bildung, während die Inhibierung der PI3K α die PMA induzierte NET Bildung beeinflusst	65
4.7. Copanlisib, TGX-221 und GDC-0941 modulieren die Zytokinausschüttung der PMNs.....	69

5. Diskussion	74
5.1. PI3K in neutrophilen Granulozyten	75
5.2. PI3K in weiteren Zielzellen	79
5.3. Beteiligung der PI3K bei der Pathogenese anderer Erkrankungen	80
5.4. Testung und klinische Phase der PI3K Inhibitoren	81
5.5. Beeinflussung der Zytokinexpression	82
5.6. Limitationen der Versuchsreihe	84
5.7. Ausblick	84
6. Zusammenfassung	86
7. Literaturverzeichnis.....	88
7.1. Abbildungsverzeichnis	110
8. Danksagung.....	111
9. Eigenständigkeitserklärung.....	112
10. Lebenslauf	113

1. Einleitung

1.1. Struktur der Haut

Die Haut ist das größte Organ des Menschen und muss somit komplexe Funktionen erfüllen. Neben der offensichtlichen Schutzfunktion gegen exogene Noxen, Bakterien und Toxine, dient sie auch als Schutz vor Austrocknung. Um jedoch zusätzlich den Austausch zwischen menschlichem Organismus und Außenwelt zu ermöglichen, bedient sich die Haut eines spezifischen Aufbaus aus Epidermis, Dermis und Subcutis [23].

Die äußerste Hautschicht stellt die Epidermis dar. Diese lässt sich, beginnend mit der Untersten, in fünf Abschnitte gliedern: Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum, Stratum lucidum und Stratum corneum. Letztere ist die Hauptschutzbarriere gegen exogene Schäden, sie besteht aus abgestorbenen Keratinozyten, welche von einer abgesonderten Lipidschicht von tieferliegenden Talgdrüsen wasserabweisend und geschmeidig gehalten werden. Vom Stratum basale, der Regenerationsschicht der Epidermis, wandern die aus adulten Stammzellen entwickelten Epithelzellen Richtung Oberfläche. Neben der Zellreproduktion ist das Stratum basale außerdem für die Speicherung von Melanin zuständig und dient als Verankerung an der Basalmembran, dem Übergang zur Dermis. In der Epidermis finden sich neben Keratinozyten und Melanozyten auch Langerhanszellen, die dem Mononukleären-Phagozytose-System (MPS-System) angehören und Merkelzellen (Mechanorezeptor) [118].

In der Dermis befinden sich im Gegensatz zur Epidermis Blutgefäße, Haarfollikel, Nerven, Talgdrüsen und Schweißdrüsen. Sie besteht aus dem straffen kollagenreichen Stratum reticulare und Stratum papillare, welches vor allem lockeres Bindegewebe enthält. Neben Fibroblasten und -zyten ist die Dermis reich an Makrophagen, Mastzellen und dendritischen Zellen, die Bestandteile des angeborenen Immunsystems sind und somit zur Barriere gegen Infektionen beitragen. Die Hauptaufgabe der Dermis ist es die Epidermis mit Nährstoffen zu versorgen, welche durch Diffusion an ihren Zielort gelangen, und durch die absondernden Talgdrüsen eine schützende Fettschicht auf dem Stratum corneum zu bilden [118].

Adipozyten, Blutgefäße und lockeres Bindegewebe sind die Hauptbestandteile der Subcutis. Diese dient als Wärmeisolator und Polster für darunterliegende Strukturen. Auch in der Funktion als Nährstoff- und Energielieferanten spielt sie eine große Rolle [118].

1.1.1. Die dermo-epidermale Junctionszone (DEJ)

Um den Scherkräften standhalten zu können, sind Epidermis und Dermis über komplexe Haftmechanismen verbunden: die dermo-epidermale Junctionszone (DEJ). Die basalen Keratinozyten der Epidermis grenzen mit ihrem basalen Pol unmittelbar an die Basalmembran, die ihrerseits aus vier elektronenmikroskopisch klar voneinander trennbaren Schichten aufgebaut ist (Abb.1): Die Basalmembran besteht aus *Lamina lucida*, *Lamina densa* und *Sublamina densa*. Die *Sublamina densa* verbindet die Basallamina mit der darunterliegenden Dermis über Ankerfibrillen, das Typ VII Kollagen (COL7) [23].

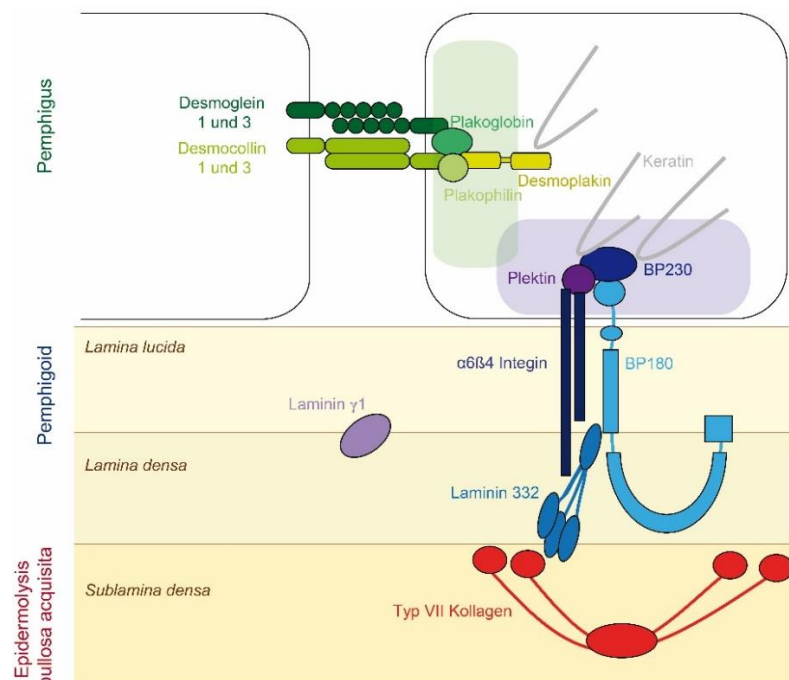


Abbildung 1 Molekularer Aufbau der DEJ (schematisch) Zu sehen sind die Hauptzielstrukturen bei Pemphigus Erkrankungen (in grün) umfassend Pemphigus vulgaris (Dsg 3/ Dsg1 und Dsg3), Pemphigus foliaceus (Dsg 1) und paraneoplastischen Pemphigus (Desmoglein, Enyoplakin, Periplakin und Desmoplakin I+II). Zielstrukturen der Pemphigoid Erkrankungen sind in blau dargestellt, welche vor allem BP180 (Typ XVII Kollagen), BP230, α6β4 Integrin, Laminin γ1 (p200) und Laminin 332 sind. Bei Epidermolysis bullosa acquisita werden Antikörper gegen Typ VII Kollagen (in rot) gebildet. Abbildung modifiziert nach [14].

1.1.2. Typ VII Kollagen (COL7)

COL7 ist der Hauptbestandteil der *Sublamina densa* im Verankerungsmechanismus der Epidermis mit der Dermis und somit mitverantwortlich für die Stabilität und Intaktheit der Haut [23]. Dieser Zustand kann durch unterschiedliche Faktoren gestört werden. COL7 ist aus drei linksgängigen α -Helices aufgebaut, die eine rechtsdrehende Tripelhelixstruktur bilden. Jede Kette wird sowohl am größeren Aminoterminal Ende (nicht-kollagene (NC) 1 Domäne) als auch am kleineren C-terminalen Ende (NC2 Domäne) von globulären, nicht-kollagenen Domänen eingerahmt (Abb. 2). Zwei Tripelhelices lagern sich an der NC2-Domäne Schwanz-zu-Schwanz aneinander an, wobei ein Teil der NC2-Domäne proteolytisch abgespalten wird. Die Dimere werden durch Disulfidbrücken miteinander vernetzt, sodass lange Ankerfibrillen mit großen NC1-Domänen entstehen. Gegen diese NC1-Domäne sind die meisten Autoantikörper gerichtet, wobei sie Homologien zu Adhäsionsmolekülen wie Knorpelmatrixprotein, Fibronectin und von-Willebrand Faktor ausweist [35].

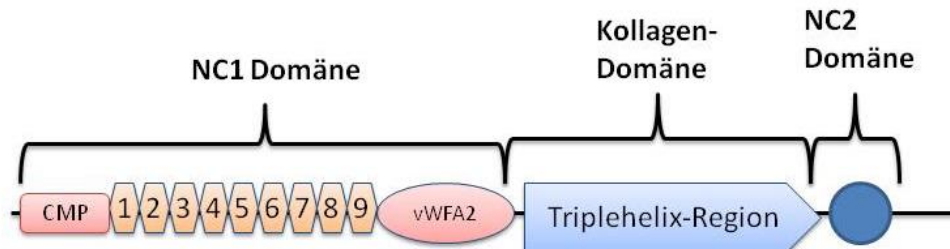


Abbildung 2 Schematische Darstellung der Typ VII Kollagen Struktur. CMP: Knorpelmatrix-Protein; 1–9: Fibronectin III-ähnliche Domänen; vWFA2: von Willebrand Faktor A2; NC Domäne: nicht-kollagenöse Domäne.

1.2. Blasenbildende Autoimmundermatosen

Bullöse Autoimmundermatosen sind charakterisiert durch das Vorhandensein von Autoantikörpern gegen Strukturproteine der Haut, wodurch das Verhältnis der Stabilität gestört ist [114]. Unterschieden werden vier verschiedene Hauptgruppen, kategorisiert nach den Hauptzielstrukturen der jeweilig auftretenden Antikörper: Pemphiguserkrankungen, Pemphigoiderkrankungen, Epidermolysis bullosa

acquisita (EBA) und Dermatitis herpetiformis [127]. Die Pemphiguserkrankungen weisen intraepidermale Blasenbildung mit suprabasaler Akantholyse auf, die übrigen Erkrankungen subepidermale Spaltbildung [189].

Pemphiguserkrankungen sind charakterisiert durch Autoantikörper gegen Desmoglein1 (Dsg1) bzw. Dsg3, wodurch es zu einer Akantholyse und intraepidermalen Blasenbildung kommt. Sie können in mehrere Unterformen eingeteilt werden: Pemphigus foliaceus, paraneoplastischer Pemphigus, Pemphigus vegetans, Pemphigus erythematosus, IgA-Pemphigus und der am häufigsten vorkommende Pemphigus vulgaris (PV) [91]. Beim Pemphigus foliaceus sind ausschließlich Dsg1-Ak detektierbar, somit ist keine Blasenbildung an Schleimhäuten beschrieben. Im Gegensatz dazu findet man beim mukokutanen PV Antikörper gegen Dsg1 und Dsg3 im Serum, was mit einem Auftreten von schlaffen Blasen sowohl an der Haut als auch zu 80% an Schleimhäuten korreliert [122]. Beim mukösen PV jedoch liegen ausnahmslos Antikörper gegen Dsg3 vor.

Das bullöse Pemphigoid (BP) ist die häufigste subepidermale blasenbildende Autoimmunerkrankung [83] und wird den Pemphigoiderkrankungen zugeordnet. Die Krankheit betrifft vor allem bei älteren Menschen - mit weiterhin steigender Inzidenz [8,100]. Autoantikörper, die bei BP oder PV Erkrankungen gebildet werden, können schon vor Beginn der klinischen Symptome mit einer kumulativen Prävalenz von 0,9% für anti-BP180-NC16A IgG, anti-BP230, anti-Dsg1 und anti-Dsg3 nachgewiesen werden [147]. Hauptsymptom ist der Juckreiz mit urticariellen und erythrematösen Plaques und in der bullösen Phase die subepidermale Blasenbildung mit prallgefüllten Blasen. Bei der Mehrheit (85%) der Erkrankten sind zirkulierende Autoantikörper gegen BP180 (auch Typ XVII Kollagen (COL17) oder BP 2 Antigen) nachzuweisen. Auch häufig sind Antikörper gegen BP230 (auch BPAG1-e oder BP 1 Antigen) zu finden [46,79,177,208].

Wenn nur die Schleimhaut durch eine Pemphigoiderkrankung betroffen ist, wird dies als Schleimhautpemphigoid bezeichnet. Zumeist mit ca. 80% ist die Mundhöhle betroffen, aber auch die Schleimhaut der Augen, Nase, Larynx und Ösophagus können befallen sein. Im Serum sind Antikörper gegen BP180 (75%) und Laminin 332 (25%) in selteneren Fällen auch gegen COL17 und $\alpha 6\beta 4$ -Integrin nachzuweisen [122,170].

	Erkrankung	Autoantigene
Pemphiguserkrankungen	Pemphigus vulgaris	Dsg [‡] 3, Dsg 1
	Pemphigus foliaceus	Dsg 1
	Paraneoplastischer Pemphigus	Dsg 3, Dsg 1, Plakine
	IgA Pemphigus	Dsc [¶] 1, Dsg 3
Pemphigoid-Erkrankungen	BP	BP180, BP230
	Pemphigoid gestationis	BP180, BP230
	Schleimhautpemphigoid	BP180, Laminin 5, $\alpha_6\beta_4$ Integrin
	Lineare IgA Dermatoase	LAD-1 [§] Typ VII Kollagen
	EBA	Typ VII Kollagen
	Dermatitis herpetiformis Duhring	Transglutaminase

Tabelle 1: Die zwei Hauptgruppen der bullösen Autoimmunerkrankungen stellen die Pemphigus- und Pemphigoiderkrankungen dar. Aufgeführt sind die Zielantigene der jeweiligen bullösen Autoimmundermatosen [88]; [‡] Dsg: Desmoglein; [¶] Dsc: Desmocollin; [§] LAD-1: lineare IgA-Dermatoase Antigen-1

EBA ist den subepidermalen blasenbildenden Autoimmundermatosen zu zuordnen und wird klinisch in eine mechanobullöse Variante mit Hautinstabilität, Blasen, Narben- und Milienbildung und dystrophen Veränderungen auf mechanisch belasteten Arealen mit nur minimaler klinischer und histologischer Entzündung eingeteilt, wobei der Anteil ein Drittel der EBA Patienten ausmacht. Die anderen zwei Drittel zeigen die entzündliche Variante [22,92], die durch generalisierte subepidermale Blasenbildung gekennzeichnet ist. Durch die meist gegen die globuläre, nicht-kollagene NC1-Domäne des COL7 gerichteten Autoantikörper kommt es zur Hautinstabilität, -abtragung und Blasenbildung [23]. Die Autoantikörper sind meist IgG-Subtypen, v.a der Subklassen IgG1 und IgG4 angehörig [125], seltener in Kombination oder alleine IgA (IgA-EBA) (50-60%) [22,92]. Autoantikörper gegen die NC2-Domäne können ebenfalls vorkommen [78,116].

1.2.1. Epidemiologie der EBA

EBA ist eine sehr seltene blasenbildende Autoimmunerkrankung mit einer Inzidenz von 0.2–0.5/Millionen Einwohner/Jahr, weshalb keine total randomisierten Studien vorliegen [67]. In Deutschland liegt die Erkrankungsrate bei 2,84/Millionen Einwohner. Somit sind in Deutschland etwa 230 Patienten an EBA erkrankt [76]. Die Krankheit betrifft alle Altersgruppen, wobei der Schwerpunkt im Alter von 50 Jahren liegt. Eine Geschlechterprädisposition und ethnische Häufung ist nicht bewiesen, wobei jedoch eine Assoziation mit HLA-DR2 vorliegt [78,189]. Vor allem bei Patienten mit afrikanischem Ursprung, die das Risikoallel HLA-DRB1*15:03 tragen, scheint es ein erhöhtes Risiko an EBA zu erkranken zu geben [127].

Die entzündliche Form der EBA unterteilt sich in vier Untergruppen: BP-, Schleimhautpemphigoid-, lineare IgA- und Brunsting-Perry Pemphigoid-Variante [42,57,78,103,206].

Bei der BP-Variante der EBA (25-50% aller bekannten EBA Fälle [92]) ist häufig Juckreiz beschrieben, jedoch fehlen Narben- und Milienbildung, die so typisch für das BP sind. Wunden sind vor allem am Rumpf, in Hautfalten und an den Extremitäten zu finden [57,58].

Schleimhautbetroffenheit ist in 60% der EBA Patienten vorhanden, wobei die Dominanz über die betroffenen Hautareale nur bei 5-10% der Patienten zutrifft, was bei der Schleimhautpemphigoid-Variante anzutreffen ist [92]. Die Schleimhautpemphigoid-Variante der EBA ist oftmals auch zusammen mit dem Schleimhautpemphigoid klassifiziert [30].

Das klinische Bild der IgA-EBA wird dominiert von gefüllten Blasen, Bläschen, Rötung und urticariellen Plaques. Bläschen sind vor allem ringförmig am Wundrand zu beobachten, was deshalb auch 'string-of-pearls' oder 'crown-of-jewels' Zeichen genannt wird. Dies ist assoziiert mit der linearen IgA Dermatose. Zu 4% sind auch Schleimhautareale betroffen [187].

Die Brunsting-Perry Pemphigoid Variante ist durch subepidermale Blasen, Erosionen, blutige Krusten und atrophische Narben am Kopf und Nacken gekennzeichnet. Es ist keine Schleimhautbeteiligung beschrieben [20], jedoch werden bei den meisten Betroffenen Antikörper gegen COL7 gefunden [22,84,103].

1.2.2. EBA Diagnostik

Die klinischen Symptome der EBA sind unterschiedlich, sodass eine klinische Diagnose alleine nicht ausreichend ist. Um eine Diagnose sicherstellen zu können, sind zusätzliche Laboruntersuchungen notwendig. Für diese wird eine periläsionale Biopsie entnommen und mit direkter Immunfluoreszenz auf lineare IgG- bzw. IgA- oder C3 Ablagerungen entlang der DEJ getestet, und, sofern vorhanden, das Muster der linearen Ig Ablagerung beurteilt. U-förmige Antikörperablagerungen entlang der DEJ sind nur in EBA Patienten auffindbar und somit diagnostisch wegweisend [115,123,188]. Auch der Nachweis von Anti-COL7-Antikörpern im Serum ist EBA spezifisch [23].

Histologisch sind subepidermale Blasen mit geringem Entzündungsinfiltrat nachweisbar, die innerhalb der *Lamina lucida* oder *Sublamina densa* lokalisiert sind. Der immunpathologische Nachweis von Typ-IV-Kollagen an der Blasendecke wird zur Differenzierung von EBA und BP herangezogen, bei dem es sich am Blasenboden befindet [189].

1.2.3. EBA Pathogenese

Die Untersuchungen zur Pathogenese von EBA erfolgten hauptsächlich in Tiermodellen. Autoantikörper gegen COL7 sind nachweislich der Hauptfaktor bei der Verursachung von subepidermalen Blasen [196]. Meistens richten sich die Antikörper gegen die NC1 Domäne der Ankerfibrillen [115]. Die Pathogenese der EBA lässt sich in drei Phasen unterteilen (Abb. 3): (A) Toleranzverlust gegenüber COL7 und Produktion von Autoantikörpern; (B) Zirkulation der Autoantikörper im Blut; (C) Autoantikörper-induzierte Entzündung und subepidermale Blasenbildung [41,117].

Aufbauend auf der Gewissheit, dass EBA durch die Produktion von Antikörpern gegen COL7 hervorgerufen wird, wurde die Beteiligung von Zelltypen untersucht. Da COL7-spezifische T-Zellen in EBA Patienten nachzuweisen sind [87], wurde zuerst die Rolle der T-Zelle untersucht. T-Zell defiziente Mäuse waren geschützt gegenüber des Ausbruchs der immuninduzierten EBA [168], sodass anschließend die CD4+ und CD8+-T-Zellsubtypen definiert werden sollte. Die Abwesenheit von

CD4+-T-Zellen führte zu einer Verzögerung der Antikörperproduktion und den Ausbruch klinischer Symptome. Im Gegensatz dazu zeigte die Depletion CD8+-T-Zellen keine Effekte [168]. Die Immunreaktion B-Zell-negativer Mäuse blieb vollkommen aus. Auch das Fehlen von Dendritischen Zellen und Makrophagen führte zu ähnlichen Resultaten, sodass daraus geschlossen wurde, dass die COL7-abhängige Entwicklung von COL7-spezifischen CD4+-T-Zellen die Anwesenheit von B-Zellen, Dendritischen Zellen und Makrophagen benötigt [168] (Abb. 3A).

Des Weiteren wurde die Beteiligung von diversen Molekülen in Mäusen untersucht. EBA-infizierte Mäuse haben nachweislich ein erhöhtes IFN- γ /IL-4 Verhältnis in drainierenden Lymphknoten als gesunde Mäuse, was mit einer Th1-Polarisierung der T-Helferzellen einhergeht [64]. Zusätzlich führte eine erniedrigte GM-CSF Konzentration zu verminderter Autoantikörperbildung und weniger neutrophilen Granulozyten in den drainierenden Lymphknoten [153]. Eine weitere wichtige Aufgabe hat das *Heat-shock protein 90* (Hsp90), das bei Hemmung sowohl zu einer verminderten Autoantikörperproduktion als auch den Ausbruch der immunoinduzierten EBA bei vorzeitiger Injektion verzögert und den Verlauf der schon vorhandenen EBA Symptome verbessert [87]. Die B-Zellanzahl ist unbeeinflusst, wobei die T-Zell Proliferation jedoch signifikant vermindert wird [87].

Die Halbwertszeit der Antikörper wird durch den neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn) kontrolliert, der durch die Bindung an IgGs den Abbau hemmt [102]. Die Inhibierung des FcRn führt zu vermehrten Antikörper Abbau, wodurch der Krankheitsausbruch von bullösen Autoimmundermatosen u.a. auch EBA vollkommen blockiert wird [109,164]. Durch Bindung der Autoantikörper an ihr Zielantigen kommt es zur Rekrutierung des Komplementsystems (Abb. 3B). Das Komplementsystem kann durch drei verschiedene Wege aktiviert werden: (i) der klassische Aktivierungsweg hat das C1q als Startprotein; (ii) der alternative Aktivierungsweg, bei dem C3b und Faktor B an bakterielle Lipopolysaccharide binden; und (iii) die Bindung von Mannose durch serumständiges Mannose-bindendes Lektin (MBL), das assoziierte Proteasen aktiviert, die wiederum den klassischen Aktivierungsweg katalysieren. Alle drei Wege konfluieren in der Bildung der Protease mit C5. Durch Fehlen von C5 wird die Antikörper-induzierte EBA blockiert [169]. Um die drei Aktivierungswege näher differenzieren zu können, hemmte man jeweils das Aktivierungsprotein. Diese Untersuchung ergab, dass das Fehlen des Faktor B die stärkste Protektion vor EBA

bewirkt. Eine schwächere Auswirkung wurde bei C1q-defizienten Mäusen beobachtet; die MBL-Hemmung zeigte ähnliche Phänotypen wie der Wildtyp [126].

Der Aufbau und die Intaktheit des Antikörpers spielen auch eine relevante Rolle. Die Notwendigkeit der Fc-Fc-Rezeptor Interaktion für die Blasenbildung bei EBA wurde sowohl durch fehlende Blasenbildung bei Injektion von Hühnchen anti-Maus IgY, das nicht an den murinen Fc-Rezeptor binden kann [163], als auch nach alleiniger Injektion mit F(ab)-Fragmenten beobachtet [169]. Nach Blockierung der Fc-Fc-Interaktion mittels löslichem CD32 [77] oder mithilfe der IgG Glykosylierung [37] zeigten präventive Effekte bezüglich der Blasenbildung.

Das inflammatorische Gewebe regt mit CD18 und ICAM-1 proinflammatorische Zellen, v.a. neutrophile Granulozyten [34,186], an, in das Gewebe auszutreten [49,77]. Diese beiden Moleküle sind nachweislich auch an der Blasenbildung beteiligt [34,151]. Unterstützt wird dieser Prozess durch weitere Zytokine, wovon IL-1, CXCR1/2, GM-CSF und IL-6 bereits bekannt sind [69,152–154], die jedoch nicht an der Blasenbildung teilnehmen.

Nach dem Austritt in das Gewebe findet die Aktivierung der Effektorzellen durch Antikörper-Rezeptor Interaktion statt (Abb. 3C). Innerhalb der Zellen wird eine Signalkaskade angeregt, die u.a die Aktivierung der PI3K β [101] und δ [16,166] (siehe 4.1., Seite 54), p38, AKT und Erk1/2 [67] beinhaltet. Die exakte zeitliche und räumliche Aufteilung und Interaktion der einzelnen Kinasen ist jedoch bis jetzt nicht erforscht und stellt deshalb eine Grundlage der Fragestellung dieser Arbeit dar.

Die intrazelluläre Signalkaskade endet in der Aktivierung einiger Protease (Matrix-Metallo-Protease (MMP), Elastase und Gelatinase B) und Ausschüttung von ROS, die alle einen entscheidende Anteil an der Blasenbildung haben [165].

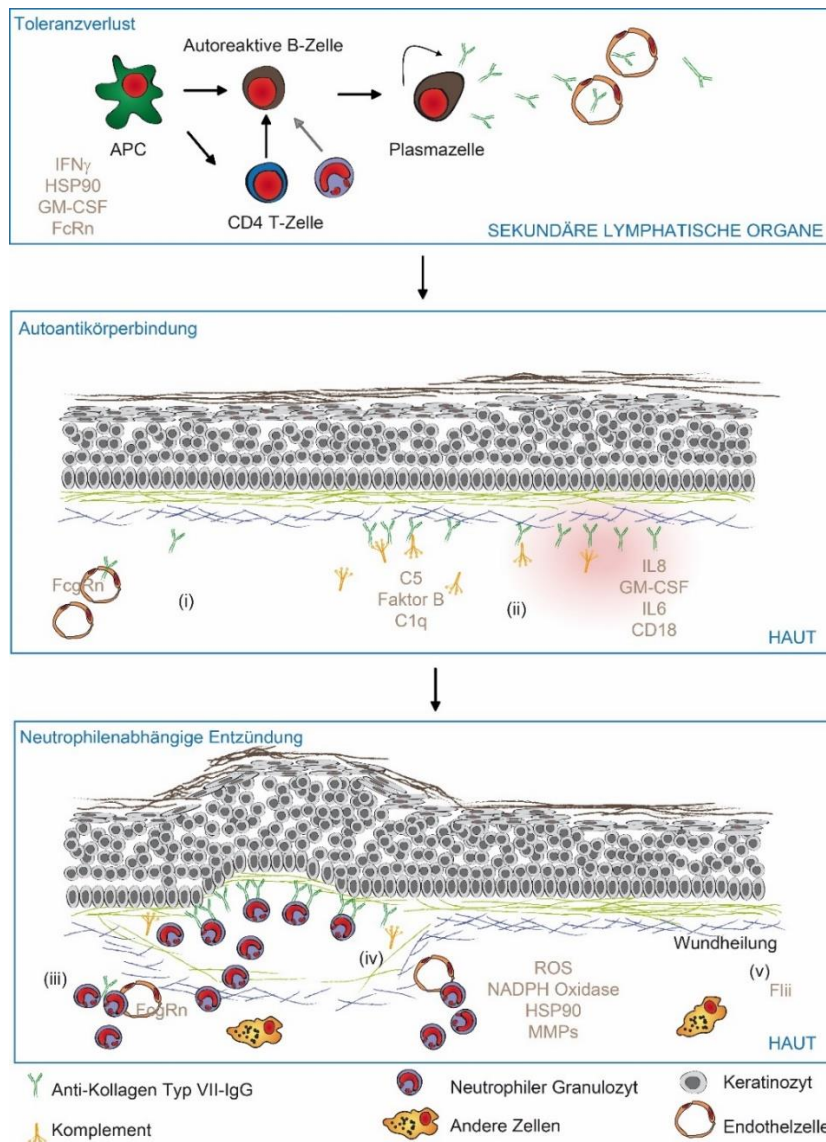


Abbildung 3: Es ist die Pathogenese der EBA dargestellt. Der Toleranzverlust basiert auf der Interaktion von APCs mit autoreaktiven B und T Zellen, die sich über eine klonale Expansion zu reifen Plasmazellen entwickeln. Sie produzieren Autoantikörper gegen COL7, die über die Blutbahn zu den Zielorganen gelangen. Dies führt zum (i) Binden der Antikörper an COL7 in der DEJ, (ii) Komplementaktivierung und Fc-Rezeptor-abhängige Blasenbildung und Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen, (iii) Neutrophilen Rekrutierung und (iv) Aktivierung, Auswanderung ins Gewebe mit ROS und MMP Produktion mit Gewebeerstörung und (v) nachfolgender Wundheilung. (Modifiziert nach [195])

Im Gegensatz zu Initiierung und Aufrechterhaltung der Blasenbildung steht das Ausmaß der Blasenbildung. Dieses wird durch das Aktinfilament-modellierende Protein Flightless I (Flii) reguliert. Flii ist bei Erkrankung mit EBA erhöht nachweisbar [97,99]. Die topische Applikation neutralisierender anti-Flii Antikörper minderte signifikant die Blasenbildung und steigerte die ihre Ausheilung im Mausmodell [98].

1.2.4. Therapeutische Möglichkeiten der EBA

Aufgrund der niedrigen Inzidenz von EBA sind bisher sehr wenige klinische Studien durchgeführt worden. Deshalb basieren die angewendeten Therapieansätze bislang nur auf Expertenmeinung. Zurzeit liegt der Therapieschwerpunkt auf einer generalisierten Immunsuppression, die jedoch nicht zufriedenstellende Ergebnisse liefert. Dazu werden Kortikosteroide angewendet, die bei der EBA oftmals nicht zu einer Remission führt, wie bei anderen bullösen Autoimmunerkrankungen [134]. Daneben zeigt der Anti-CD20 Antikörper Rituximab alleine oder in Kombination mit intravenösen Immunglobulinen (IVIG) in einigen schweren EBA Fällen ein therapeutisches Ansprechen [31,43,134,156,157]. Außerdem wurde die Immunadsorption [158] und extrakorporaler Photochemotherapie getestet und führte einige Male zum Erfolg [134]. Diese Annahmen beruhen jedoch auf Fallberichten, bzw. Fallberichtsammlungen, so dass die Evidenz hier niedrig ist.

Kim et al. zeigten, dass EBA Patienten mit hochdosierten ($>8\text{mg/Tag}$) Methylprednisolon (Median zur Remission: 3 Monate) behandelt, im Gegensatz zu einer niedrigdosierten ($<8\text{mg/Tag}$) Behandlung (Median zur Remission: 12 Monate), eine schnellere Remission erlangen. Jedoch ist hier kein Unterschied zwischen der mechanobullösen und der inflammatorischen EBA Variante zu erkennen [92]. Ein aktueller Vergleich der zwei EBA Typen (mechanobullöse Variante und inflammatorische Variante) bezüglich ihrer Therapiemöglichkeiten ergab, dass der mechanobullöse Typ signifikant auf den aktuellen Therapieansatz mit IVIG oder Rituximab Gabe anspricht. Die inflammatorische Variante jedoch zeigte kein signifikantes Ansprechen auf angewendete Therapien, weshalb die bisherige Therapielage nicht ausreichend ansetzt und neue Therapieoptionen dringend benötigt werden, die den komplexen Ablauf, der dem entzündlichen EBA Typ zugrunde liegt, eindämmen bzw. verhindern kann [78].

Weitere Zielstrukturen der Pathogenese sind identifiziert und stellen somit die Basis von zukünftigen therapeutischen Maßnahmen dar. Ein Ziel wäre die Inhibition des Komplementsystems durch C5 Inhibition mittels anti-C5-Antikörper oder C5aR-Antagonisten oder die Modulation der Autoantikörperbildung [64]. Da die Autoantikörper gegen COL7 den Schwerpunkt der momentanen Forschung darstellen, würden sich drei Optionen darstellen: Es wäre möglich die zurzeit in der

Onkologie [185] verwendete Therapie der HSP90 Inhibitoren weiterzuführen [87]. Eine weitere Option wäre das Entfernen der schon gebildeten Antikörper durch Plasmaphorese, was derzeit schon in anderen Autoimmunerkrankungen wie dem BP zu Erfolgen führt [124] oder man hemmt die durch Antikörper induzierte Gewebeerstörung durch z.B. Unterdrückung von Neutrophilenaktivierung und bewirkt dadurch die Hemmung der Entzündung [165] und ROS Freisetzung [34]. Durch Blockade der Fcγ-Rezeptoren oder intrazellulärer Signalwege wie α /Akt, Erk1/2 und Phosphatidylinositol 3 Kinasen (PI3K) würden Neutrophile nicht aktiviert und die Entzündungsmechanismen würden gehemmt werden [67,88,152,165].

1.3. Neutrophile Granulozyten

Die aktuelle Forschung fokussiert sich auf die Effektorphase der bullösen Autoimmunerkrankungen. Neutrophile Granulozyten zählen mit einem Anteil von circa 65% der Leukozyten zum Hauptbestandteil des zellulären angeborenen Immunsystems und sind somit ein Schwerpunkt der Untersuchungen. Beim Menschen entwickeln sie sich aus myeloiden Vorläuferzellen. Histologisch unterscheidet man zwischen stabförmigen jugendlichen, deren Anteil vor allem bei bakteriellen Entzündungen im Blut erhöht ist, und ausgereiften segmentkernigen Neutrophilen. Sie sind 8,5–10µm große Zellen mit 3-4 Kernsegmenten und rosa bis zartvioletter Zytoplasma [118]. Die Halbwertszeit der neutrophilen Granulozyten im Blut beträgt nur bei 6-7h, nachdem sie ins Gewebe ausgewandert sind, liegt ihre Lebensdauer noch bei 1-2 Tagen [167]. Danach werden sie entweder über den Darmtrakt ausgeschieden oder durch die Makrophagen in Lunge und Milz abgebaut [193].

90% der neutrophilen Granulozyten befinden sich im Knochenmark, die restlichen 10% sind im peripheren Blut zu finden. Unter diesen 10% befinden sich marginale (an das Endothel geheftete) und freie Neutrophile. Die randständigen Neutrophilen sind über spezifische Selektine (u.a. L-Selektin=CD62L) und Integrine (z.B. CD18 [34], LFA-1) an das Endothel der Blutgefäße gebunden [193].

Starke Entzündungsreaktionen sind bei vielen chronischen Erkrankungen und auch bei Autoimmunkrankheiten wie rheumatoide Arthritis (RA), Psoriasis und EBA ein

Hauptsymptom [34,171,193]. Neutrophile Granulozyten sind die ersten Immunzellen, die zum Entzündungsort durch Chemokine wie IL-8 gelockt werden [50] und dort ROS, extrazelluläre fibrilläre Matrix (Neutrophil Extracellular Traps, NETs) und Zytokine freisetzen, die dem Gewebe schaden. Adhäsionsmoleküle, die für die Transmigration in das entzündete Gewebe für die Neutrophilen notwendig sind, wurden bei Erkrankungen wie der RA, dem Systemischen Lupus Erythematosus (SLE) und der Psoriasis erhöht im Serum nachgewiesen [44]. Dies zeigt, einen wichtigen Ansatzpunkt für neue Therapiemöglichkeiten.

Einer ihrer wichtigsten Funktionen ist die Expression von diversen Rezeptoren, mit denen sie die pathogenen Antigene erkennen, anschließend abtöten und phagozytieren können. Darüber hinaus sind diese membranständigen Rezeptoren meist gekoppelt an intrazelluläre Signalkaskaden, wie z.B. über die PI3K, die Enzyme innerhalb der Neutrophilen aktivieren und diese dann reaktive Sauerstoffmetabolite (ROS) produzieren und NETs auswerfen können [101] (Abb. 4).

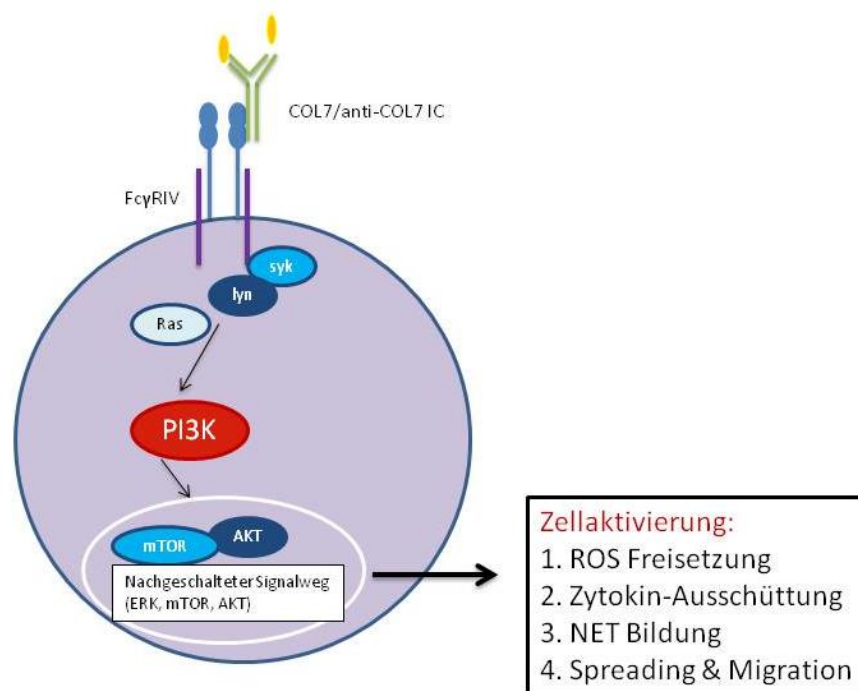


Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung der Signalkaskade in einem neutrophilen Granulozyten nach Immunkomplexaktivierung. Nach Bindung des COL7/anti-COL7-IC an den Fcγ-Rezeptor des Neutrophilen wird eine intrazelluläre Signalkaskade losgelöst, die u.a. über das Ras-System gesteuert wird. Ein Enzym dieser Signalkette ist auch die PI3K, die wiederum auf mTor und AKT stimulierend wirkt und letztendlich zu einer Zellaktivierung des Neutrophilen führt. Dieser reagiert mit ROS Freisetzung, NET Bildung, Migration, *Spreading* und/oder Zytokin-Ausschüttung.

1.4. Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K)

Die PI3K ist eine membranständige Lipidkinase und wird aufgrund des unterschiedlichen Aufbaus und der variierenden Lipidsubstrat-Präferenzen in drei Klassen (Klasse I, II, III) eingeteilt. Säugetiere exprimieren überwiegend die Klasse I. Es sind drei verschiedene Klasse II und eine Klasse III zurzeit bekannt [4,66]. Klasse I ist am besten erforscht, da diese eine entscheidende Rolle, vor allem die häufigste Mutation im PIK3CA Gen, bei Krebserkrankungen spielt [62,105]. Die Hauptfunktion der PI3K ist die Kopplung von extrazellulären und intrazellulären Signalkaskaden und somit die Aktivierung der Zielzelle. Diese Kaskaden werden durch diverse Rezeptoren angestoßen und führen zur Bildung von PIP₃ und Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat in der Zielzelle, die wiederum weitere Kinasen, u.a. AKT (Proteinkinase B) und mTOR, aktivieren [62,198]. Letztendlich führen die Signalkaskaden zur Zellaktivierung und zur Bildung von Wachstumsfaktoren, Hormone, Antigene und Entzündungsstimuli [101]. Daneben können auch kleine Proteine wie Ras und RAB5 direkt zu einer Phosphorylierung und Aktivierung der PI3K führen [62], aber auch die Aktivierung über Insulinrezeptor, *Insulin like Growth Factor Rezeptor* (IGFR) und *Epidermal Growth Factor Rezeptor* (EGFR) ist wichtig für das Verstehen von Pathogenese unterschiedlicher Krankheiten wie z.B. Alzheimer [55].

Zurzeit sind vier verschiedene Isoformen der Klasse I der PI3K bekannt: α , β , γ und δ , die sich in ihrer Funktion und Expression unterscheiden (Abb. 5). Jede der Isoformen besteht aus einer regulatorischen heterodimeren Untereinheit und einem homologem p110 katalytischem Zentrum. Die α -, β - und δ -Isoformen gleichen sich in ihrem Aufbau. Sie enthalten eine p110 Untereinheit und eine regulatorischen *Src homologue 2* (SH2) Einheit aus p50-p85 Untereinheiten. Die γ -Isoform dagegen ist aus einer p110 katalytischen Einheit und entweder einer p101 oder p84 regulatorischen Untereinheit aufgebaut. Diese Unterschiede führen dazu, dass die Isoformen entweder von G-Proteingekoppelten Rezeptoren (γ -, β -Isoform) oder Tyrosinrezeptorenkinasen (α -, β -, δ -Isoform) aktiviert werden können [101].

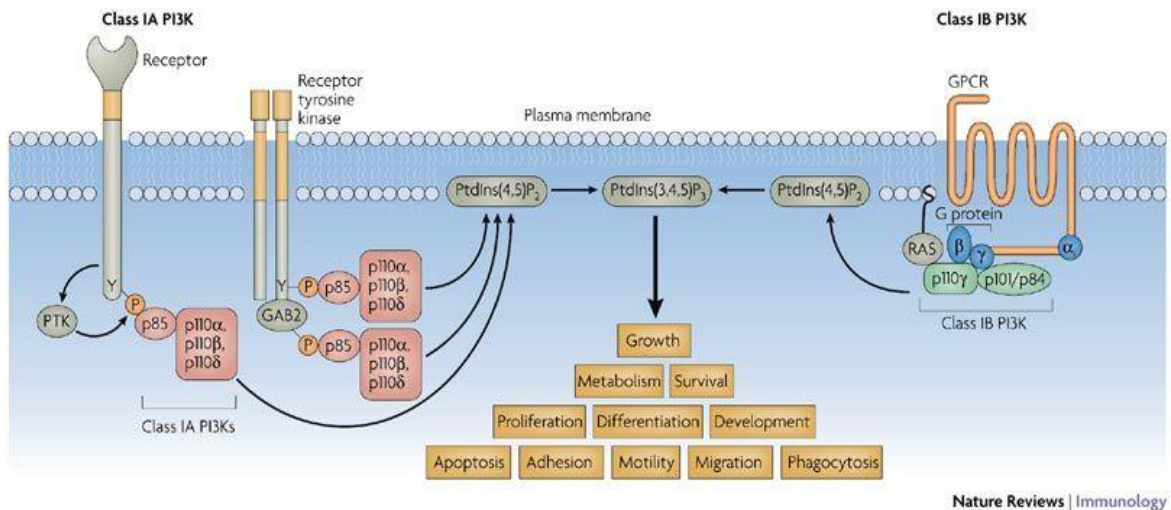


Abbildung 5 Die PI3K unterteilt sich in vier Isoformen α , β , γ und δ , die sich in ihrer Expression und Funktion unterscheiden. Der Aufbau der Subklassen setzt sich aus variierenden Ketten zusammen und spielt in dieser Hinsicht in die unterschiedliche Aktivierung der Isoformen ein. Somit wird die PI3K γ vor allem durch G-Proteingekoppelte Rezeptoren aktiviert, wohingegen die drei anderen Isoformen durch Tyrosinrezeptorkinasen stimuliert werden.

PI3K α und δ werden durch GTPasen der Ras Familie aktiviert, wohingegen PI3K β Zielmolekül von GTPasen der Rho Familie ist [53]. Durch mutierte bzw. gehemmte PI3K α kann das Tumorwachstum, die Tumortransformation und auch die Angiogenese aufgehalten werden [29,133]

In Hinsicht auf die Expression der Isoformen sind die γ - und δ -Form vor allem auf hämatopoetischen Zellen vorhanden, wohingegen die α - und β -Isoform ubiquitär exprimiert werden [101]. Die unspezifische PI3K Hemmung führt zur Unterdrückung der B- und T-Zell- Proliferation [40]. Darauf aufbauend wurden die spezifischeren Funktionen der einzelnen Isoformen untersucht. PI3K γ ist relevant für die Extravasation und anschließende Migration der Immunzellen zu denen auch die Neutrophilen gehören [51,72,174]. Der zusätzliche Verlust der PI3K δ bewirkt einen additiven Effekt auf die Hemmung der Chemotaxis und Migration der Neutrophilen in das entzündete Gewebe [148,149]. Außerdem reguliert PI3K δ und auch β das *Spreading* und die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten nach deren Interaktion mit Oberflächenstrukturen oder Antikörpern, welches zu ROS und Proteasen Ausschüttung führt [16,101].

1.5. Ziel der Arbeit

Dysregulierte neutrophile Granulozyten sind oft begleitend in entzündlichen Prozessen bei Autoimmunkrankheiten wie EBA vorhanden. Untersuchungen haben bisher gezeigt, dass die PI3K ein Schlüsselmolekül in der Signalkaskade der Neutrophilen ist [101]. Zurzeit sind vier Isoformen der PI3K bekannt, die α -, β -, γ - und δ -Isoformen, die sich jeweils in ihrer Funktion und Gewebeexpression unterscheiden.

Ziel meiner Arbeit ist es, die Rolle dieser PI3K Untereinheiten in den verschiedenen Wirkmechanismen der Neutrophilen zu untersuchen. Hierfür ist es notwendig die Signalwege weiter aufzuschlüsseln, sodass die Unterschiede der Aktivität der einzelnen Isoformen auf die entsprechenden Eigenschaften der PMNs deutlich werden. Hierzu habe ich in PMNs acht verschiedene PI3K Inhibitoren in jeweils fünf unterschiedlichen Konzentrationen, die in ihrer Affinität zu den PI3K Isoformen variieren. Folgende Effekte der Inhibitoren auf die Aktivierung von PMs wurden analysiert: (i) das Ausschütten von proteolytischen und zytotoxischen Molekülen wie reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und (ii) proinflammatorischen Zytokinen, (iii) die Produktion von NETs, (iv) die Aktivierung durch Protease-induziertes Spalten (*Shedding*) von CD62L, (v) das Anheften und Ausbreiten an vorbeschichteten Oberflächen (*Spreading*), (vi) die Chemotaxis nach IL-8 Stimulierung und (vii) die möglichen toxischen Effekte der PI3K Inhibitoren. Die Ergebnisse legen nahe, dass die PI3K Isoformen verantwortlich für unterschiedliche Zellfunktionen bei neutrophilen Granulozyten sind und dabei als spezifisches Netzwerk die unterschiedlichen Eigenschaften der PMNs über nachgeschaltete Signalwege mit koordinieren. Die Arbeit liefert wichtige Hinweise zur Entschlüsselung der Signalwege in Neutrophilen dar stellt somit möglicherweise die Grundlage für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze dar.

2. Material

2.1. Chemikalien und Medien

2.1.1. Verdünnungsreihe der PI3K Inhibitoren

Tabelle 1: PI3K Inhibitoren

Copanisib	GDC-0941	IC-87114	AMG319	AS-604850	TGX-221	Alpelisib	HS-173	Name
0,5 nM	3,0 nM	-	33 µM	4,5 µM	5,0 µM	5,0 nM	0,8 nM	IC50 α
3,7 nM	33 nM	75 µM	2,7 µM	>20 µM	5,0 nM	-	-	IC50 β
6,4 nM	75 nM	29 µM	850 nM	0,55 µM	>10 µM	-	-	IC50 γ
0,7 nM	3,0 nM	0,5 µM	18 nM	>20 µM	0,1 µM	-	-	IC50 δ
480,52	513,64	397,43	385,4	285,22	364,44	441,47	422,46	MW
0,01mg/ml (Wasser)	44 mg/mL	0.66 mg/mL	77 mg/mL	57 mg/mL	12 mg/mL	88 mg/mL	84 mg/mL	Löslichkeit (DMSO)
n.a	1,9	2,5	2,6	3,5	2,7	2,3	2,4	1 mM (1mg/x mL)
n.a	100 µl 1 mM plus 900 µl DMSO	100 µl 1 mM plus 900 µl DMSO	100 µl 1 mM plus 900 µl DMSO	100 µl 1 mM plus 900 µl DMSO	100 µl 1 mM plus 900 µl DMSO	100 µl 1 mM plus 900 µl DMSO	100 µl 1 mM plus 900 µl DMSO	100 µM
1 mg/210 ml	100 µl 100 nM plus 900 µl DMSO	100 µl 100 nM plus 900 µl DMSO	100 µl 100 nM plus 900 µl DMSO	100 µl 100 nM plus 900 µl DMSO	100 µl 100 nM plus 900 µl DMSO	100 µl 100 nM plus 900 µl DMSO	100 µl 100 nM plus 900 µl DMSO	10 µM
100 µl 10 mM plus 900 µl DMSO	100 µl 10 nM plus 900 µl DMSO	100 µl 10 nM plus 900 µl DMSO	100 µl 10 nM plus 900 µl DMSO	100 µl 10 nM plus 900 µl DMSO	100 µl 10 nM plus 900 µl DMSO	100 µl 10 nM plus 900 µl DMSO	100 µl 10 nM plus 900 µl DMSO	1 µM
100 µl 1 nM plus 900 µl DMSO	100 µl 1 nM plus 900 µl DMSO	100 µl 1 nM plus 900 µl DMSO	100 µl 1 nM plus 900 µl DMSO	100 µl 1 nM plus 900 µl DMSO	100 µl 1 nM plus 900 µl DMSO	100 µl 1 nM plus 900 µl DMSO	100 µl 1 nM plus 900 µl DMSO	0.1 µM
100 µl 0.1 nM plus 900 µl DMSO	100 µl 0.1 nM plus 900 µl DMSO	100 µl 0.1 nM plus 900 µl DMSO	100 µl 0.1 nM plus 900 µl DMSO	100 µl 0.1 nM plus 900 µl DMSO	100 µl 0.1 nM plus 900 µl DMSO	100 µl 0.1 nM plus 900 µl DMSO	100 µl 0.1 nM plus 900 µl DMSO	0.01 µM

2.1.2. Beschichtung der Platte mit Immunkomplexen

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Medien

Immunkomplexkomponente	Herstellung
anti-hCOL7 IgG1-Ak; Stockkonzentration von 0,894mg/ml	"Chimäre human-murine IgG1-Autoantikörper gegen Typ VII-Kollagen wurden rekombinant im HEK-293-Freestyle-System exprimiert und durch Protein G-Affinitätschromatographie aus Zellkulturüberstand aufgereinigt." [150]
humanes COL7 E-F (hCOL7); Stocklösung (c=0,49mg/ml)	"Das humane Typ VII-Kollagen-Fragment hCOL7EF-GST wurden rekombinant in Escherichia coli Novablue (Merck (D)) exprimiert und durch Glutathion-Affinitätschromatographie aus Zellkulturüberstand aufgereinigt." [150]
Humanes Serum Albumin (HSA) (Stock: 200 mg/ml)	20µg/ml HSA in 50mM Carbonate/Bicarbonatepuffer (pH 9.6) [9]; Baxter (D)
Polyklonales Kaninchen anti-HSA IgG)	Endkonzentration 1:400 in PBS (~10µg/ml HSA-spezifisches IgG) [9]; Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
mCOL7	Stock:1,13mg/ml; Endkonzentration 0,5µg/50µl/well [172]
RamCOL7-IgG	1:25 in Waschpuffer [172]

2.1.3. Chemikalien & Medien für das ROS Release Assay

Chemikalien & Medien	Zusammensetzung bzw. Hersteller
Blockpuffer	1% BSA, 0,05% Tween-20 Sigma-Aldrich, St. Louis (USA) in 1x DPBS
Carbonatpuffer pH 9,6	0,05M Na ₂ CO ₃ Merck, Darmstadt (D),

	0,05M NaHCO ₃ Merck, Darmstadt (D)
CL-Medium	RPMI 1640 ohne Phenolrot, mit Glutamin und 2 g/L NaHCO ₃ Biochrom GmbH, Berlin (D), 1% FCS (hitze-inaktiviert) Sigma-Aldrich, St. Louis (USA), 2 g/L Glucose (100 g/L Glucose) Lonza Group AG, Basel (CH), 25 mM N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanesulfonic-Säure (HEPES) Lonza Group AG, Basel (CH)
DMSO	Sigma-Aldrich, Hamburg (D)
DPBS (2x) (ohne Magnesium/Calcium), pH 7,2-7,3	16g/L NaCl Carl Roth, Karlsruhe (D), 40mg/L KCl Merck, Darmstadt (D), 2300mg/L Na ₂ HPO ₄ Carl Roth, Karlsruhe (D), KH ₂ PO ₄ Merck, Darmstadt (D), Ampuwa Spüllösung Plastipur® Fresenius Kabi, Bad Homburg (D)
Luminol >= 97% (3-Aminophthalhydrazide)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Lyse-Puffer	Ampuwa Spüllösung Plastipur® Fresenius Kabi, Bad Homburg (D)
DPBS (1x) (ohne Mg/Ca)	0.137 M NaCl, 0.05 M NaH ₂ PO ₄ , pH 7.4
Polymorphprep	AXIS-SHIELD, Rodeløkka Oslo (N)
RPMI 1640	Mit Phenolrot, HEPES und L-Glutamin; Lonza Group AG, Basel (CH)
Trypanblau 0,4% zur Mikroskopie	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Waschpuffer	0,05% Tween-20 in 1x DPBS

2.1.4. Chemikalien & Medien für die Durchflusszytometrie

Chemikalien & Medien	Zusammensetzung bzw. Hersteller
Annexin Bindepuffer	100mM HEPES, 140mM NaCl, 25mM CaCl ₂ , pH 7.4.; Thermo Fisher scientific, Waltham, MA (USA)

Cluster of Differentiation (CD)-Mix	anti-CD45 (8µl), anti-CD193 (38µl), anti-CD16 (38µl), anti-CD14 (38µl), anti-CD66b (38µl), anti-CD62L (38µl), FITC Annexin V (31µl) und Annexin Bindepuffer (771µl)
FACS-Puffer	0,5% BSA, 2 mM EDTA in 1x PBS
Fixation-Puffer	2% PFA (Paraformaldehyd) in 1x DPBS
FACS-Clean	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (D)
FACS-Flow	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (D)
FACS-Rinse	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (D)
FITC-Annexin V 90 µg/ mL	Biolegend, San Diego (USA)
Zombie NIR	Biolegend, San Diego (USA)
Zombie-Master Mix (MM)	1:1000 Zombie NIR in Annexin Bindepuffer

2.1.5. Antikörper für CD-Mix

Antikörper	Hersteller
Anti-humanes CD14 (PE/Cy7) 150 µg/ mL, Clone HC D14	Biolegend, San Diego (USA)
Anti-humanes CD16 (Pacific Blue) 0,5 mg/ mL, Clone 3G8	Biolegend, San Diego (USA)
Anti-humanes CD193 (CCR3) (PE) 100 µg/ mL, Clone 5E8	Biolegend, San Diego (USA)
Anti-humanes CD45 (Brilliant Violet 510) 100 µg/ mL, Clone H130	Biolegend, San Diego (USA)
Anti-humanes CD62L (PerCP/Cy5,5) 100 µg/ mL, Clone DREG-56	Biolegend, San Diego (USA)
Anti-humanes CD66b (APC) 200 µg/ mL, Clone G10F5	Biolegend, San Diego (USA)

2.1.6. Chemikalien & Medien für das Chemotaxis Assay

Chemikalien & Medien	Zusammensetzung bzw. Hersteller
0,2% Hexabromidlösung	0,004% 5%iges Hexadimethrine bromide in Releasepuffers
5% Hexadimethrine bromide (Polybrene®)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Blockpuffer	10% BSA in Carbonatpuffer
Calcium- und Magnesium-Lösung	26,5% CaCl ₂ x 2 H ₂ O-Lösung (1,8M) und 20,3% MgCl ₂ x 6H ₂ O-Lösung (1M) in Plastipur®
Coating-Puffer (pH 9,0)	0,1M NaHCO ₃ -Lösung wird mit 0,1M Na ₂ CO ₃ -Lösung auf pH 9,0 gegentitriert
Ethanolische NaOH 1M	20g NaOH-Plätzchen; Carl Roth, Karlsruhe (D), 250mL Plastipur®, 250mL Ethanol 96%
Ficoll Paque Plus	GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala (S)
HES-steril® 6% Infusionslösung	Fresenius Kabi, Bad Homburg (D)
Rekombinantes humanes IL-8 (CXCL8), 8.4kDa Protein mit 72 Aminosäureresten	PeproTech Germany, Hamburg (D)
Puffer für IL-8	Calcium- und Magnesium-Lösung in 1x DPBS (1:2000)
Releasepuffer	1% BSA-Lösung (10%) in 1x DPBS
Schwefelsäure 25% (H ₂ SO ₄), EMSURE	Merck, Darmstadt (D)
Turbo-TMB-ELISA	Thermo scientific, Pinneberg (D)

Waschlösungen für Chemotaxiskammer:	SDS (1TL)/ NaOH (1EL Plätzchen) in 2L Plastipur®, 2M NaCl
Zellpuffer	5% BSA-Lösung (10%) in 1x DPBS

2.1.7. Chemikalien & Medien für NET Darstellung

Chemikalien & Medien	Zusammensetzung bzw. Hersteller
RPMI 1640 medium modifiziert pH 7,4	NaHCO ₃ Konzentration von 2,2 auf 3,2g/l erhöht, um pH 7,4 bei 10% CO ₂ zu erhalten. HEPES-gepuffertes (Biochrom, Berlin (D)) oder Bicarbonat-gepuffertes RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)) versetzt mit 0,5% HSA, Baxter (D) und 4mM L-Glutamin (Biochrom, (D))
Bicarbonatpuffer	0,05M, pH 9.6, (5,3g Na ₂ CO ₃ (105,99g/mol) + 4,29g NaHCO ₃ (84,01g/mol) ad 1l H ₂ O, pH 9,6 mit 0,05M HCl anpassen)
Blockpuffer	1% Biotin-freies BSA in PBS
Histopaque 1119	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Lymphozytenisolationsmedium 1077	Carl Roth, Karlsruhe (D)
RMPI1640	Mit Phenolrot, + 2g/l NaHCO ₃ , ohne HEPES, mit L-Glutamin+ 0,5% HSA
Percoll	GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala (S)
PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
SYTOX Green Nukleinsäure-Färbemittel (Stock 5mM); Endkonzentration: 5µM	Thermo Fisher scientific, Waltham, MA (USA)
Waschpuffer	PBS (50ml) + 0,05% Tween20 (25µl)

2.1.8. Chemikalien & Medien für die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der NETs

Chemikalien & Medien	Hersteller
4 % Paraformaldehyd in PBS	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
RNase-freies Wasser	Ampuwa, Fresenius Kabi, Bad Homburg (D)

2.1.9. Chemikalien & Medien für Neutrophiles *Spreading*

Chemikalien & Medien	Hersteller
CASY Lösung	OLS OMNI Life Science, Bremen (D)
CL Medium	RPMI 1640+ 1,39g/l NaCl+ 20nM HEPES
Pancoll	PAN Biotech, Aidenbach (D)
Waschpuffer	PBS+ 1% BSA+ 0,05% Tween20

2.1.10. Chemikalien & Medien für Legendplex

Chemikalien & Medien	Zusammensetzung bzw. Hersteller
Assaypuffer	Legendplex Kit, Biolegend, San Diego (USA)
<i>Beads</i>	Legendplex Kit, Biolegend, San Diego (USA)
Detektions-Antikörper	Legendplex Kit, Biolegend, San Diego (USA)
<i>Raw Beads</i>	Legendplex Kit, Biolegend, San Diego (USA)
SA-PE (Streptavidin-Phycoerythrin)	Legendplex Kit, Biolegend, San Diego (USA)
Standardpulver	Legendplex Kit, Biolegend, San Diego (USA)

Waschpuffer	Legendplex Kit, Biolegend, San Diego (USA)
Zytokine für <i>custom human 6-Panel</i>	Humanes IL-1 α , humanes IFN- γ , humanes TNF- α , humanes IL-6, humanes IL-17 α und humanes IL-1R α .
Zytokine für <i>LEGENDplex™ Human Proinflammatory Chemokine Panel (13-plex)</i>	IL-8, Eotaxin, RANTES, MIP-1 α , MIG, MIP-3 α , MIP-1 β , I-TAC, IP10, TARC, MCP-1, ENA-78 und GRO α

2.2. Geräte

Tabelle 3: Verwendete Laborgeräte

Laborgerät	Hersteller
4-8°C KÜHLSCHRANK	Liebherr, Biberach an der Riß (D)
-20°C Gefrierschrank Liebherr Premium	Liebherr, Biberach an der Riß (D)
-80°C Gefrierschrank	Liebherr, Biberach an der Riß (DE)
-80°C Gefrierschrank <i>Ultra Low Temperature Freezer C660 Premium</i>	New Brunswick Scientific (UK)
Autoklav	Webeco, Selmsdorf (D)
Boyden Chamber (Chemotaxiskammer) AP48 (48-well)	Neuro Probe Inc., Gaithersburg, MD (USA)
CO ₂ Inkubator <i>Hera Cell 150i</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
ELISA-Reader <i>Victor3 Wallac 1420</i>	Wallac, Perkin-Elmer, MA (USA)
Eppendorf Pipetten Research® (0.5-10 μ l, 0.1-2.5 μ l 2-20 μ l, 10-100 μ l, 20-200 μ l; 100-1000 μ l)	Eppendorf, Hamburg (D)
Eppendorf Pipette Research® (multi-channel) (0,5-10 μ l, 10-100 μ l, 30-300 μ l)	Eppendorf, Hamburg (D)
Feinwaage <i>Analytical Plus</i>	Ohaus, Parsippany, NJ (USA)
<i>GloMax GM3000</i>	Promega, Fitchburg, WI (USA)

GraphPad Prism 6	GraphPad Software, La Jolla (USA)
<i>heat-stir-plate CB162</i>	Stuart, Staffordshire (UK)
Wärmeschrank Inkubator	Binder, Tuttlingen (D)
Lichtmikroskop	Helmut Hund, Wetzlar (D)
Laborzentrifuge 1-14	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz (D)
<i>MACSQuant</i> Analyzer 10	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (D)
Magnetrührer <i>MR3002</i>	Heidolph Instruments, Schwabach (D)
<i>Multipipette plus</i>	Eppendorf, Hamburg (D)
<i>Multipipette stream</i>	Eppendorf, Hamburg (D)
Nasskammer	Plastikbox mit Deckel
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen (D)
Office 365	Microsoft, Redmond (USA)
pH-Meter pH 526 WTW	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim (D)
Pipetten <i>eLINE elektronische Pipette</i>	Sartorius, Goettingen (D)
Pipetten <i>Sartorius</i>	Sartorius, Goettingen (D)
<i>Pipetus</i> Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt (D)
SigmaPlot 13.0	Systat, Erkrath (D)
Schüttelinkubator <i>Certomat IS</i>	B.Braun, Melsungen (D)
Standzylinder 100ml	Behr Labortechnik, Düsseldorf (D)
Schüttler <i>Duomax 1030</i>	Heidolph Instruments, Schwabach (D)
Sterilbank <i>Biowizard</i>	Kojair Tech Oy, Vilppula (FI)
Tecan infinite M200 Pro reader	Tecan Group, Männedorf (CH)
Vacuumpumpe WISA	Steinkopf Laborausrüster, Lübeck (D)
Vortex <i>Genie 2</i>	Scientific Industries, Bohemia, NY (USA)
Wasserbad	Köttermann Labortechnik, Uetze/ Hänigsen (D)

Workbench LaminAir HB 2448	Heraeus, Hanau (D)
xCELLigence	ACEA Biosciences, San Diego (USA)
Zellzähler <i>CASY Model TT</i>	Schärfe System GmbH, Reutlingen (D)
Zentrifuge <i>Rotina 420</i>	Hettich, Tuttlingen (D)
Zentrifuge Rotixa 50 RS	Hettich, Tuttlingen (D)
Zentrifuge <i>Centrifuge 5804R</i>	Eppendorf, Hamburg (D)
Zentrifuge <i>Centrifuge 5810R</i>	Eppendorf, Hamburg (D)

2.3. Verbrauchsmaterial

Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
1,5ml, 2ml Gefäße <i>SafeSeal</i> Gefäß ("Mikroreaktionsgefäß")	Sarstedt, Nümbrecht (D)
5ml, 15ml, 50ml Tubes	Sarstedt, Nümbrecht (D)
24-well Platte	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
40µm Nylon Mesh 96 well Platte	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Abdeckplatte mit Kondensationsringen	Greiner Bio-one, Frickenhausen (D)
Chemotaxisfilter für AP48-Boyden Kammer, Porengröße 3 µm	Neuro Probe Inc., Gaithersburg, MD (USA)
<i>Chromafil CA-20/ 25 S</i> (0.2µm)	Macherey-Nagel, Düren (D)
Deckgläschen 18x18mm	Carl Zeiss, Oberkochen (D)
Einmalspritze 1ml, INjektR-F, steril	B.Braun AG, Melsungen (D)
ELISA-Platten <i>high-binding</i> , 96-well, <i>transparent</i>	Greiner Bio-one, Frickenhausen (D)
Filter 0,2µm	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Filtermembran, Spritzenaufsatz 0,45µm, steril	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Fluotrac 600 schwarze <i>high-binding</i> 96-well Platte	Greiner Bio-One, Frickenhausen (D)

Kryoröhrchen 1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Microplatten <i>E-Plate 96</i>	ACEA Biosciences Inc, San Diego, CA (USA)
Microplatten weiß, <i>high-binding 96-well</i>	Greiner Bio-one, Frickenhausen (D)
Microplatten transparent, <i>non-binding 96-well</i> , flacher Boden	Greiner Bio-one, Frickenhausen (D)
Microplatten transparent, <i>non-binding 96-well</i> , runder Boden	Greiner Bio-one, Frickenhausen (D)
Microplatten <i>96-well, V-Boden</i>	Greiner Bio-one, Frickenhausen (D)
Objektträger <i>Superfrost Plus</i>	Menzel-Gläser, Braunschweig (D)
Pasteur-Glaspipette	Karl-Hecht GmbH, Sondheim (D)
Pipettenspitzen für multi-channel Pipetten (ep T.I.P.S.) (20-200µl, 20-300µl)	Eppendorf, Hamburg (D)
Pipettenspitzen für Research® 10µl, 200µl, 1000µl	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Pipettenspitzen 200µl, 300µl	Eppendorf, Hamburg (D)
Plastik-Pasteur Pipetten 1ml/Einmal-Pipette	BioSigma, Cona (I)
Klebefolie, optisch-klar	Sarstedt, Nümbrecht (D)
<i>Safety-Multifly 21G</i> 200mm lang	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Serologische Pipetten 5ml, 10ml, 25ml	Sarstedt, Nümbrecht (D)
<i>S-Monovette</i> 9ml (1,6mg EDTA/ml Blut)	Sarstedt, Nümbrecht (D)
<i>S-Monovette</i> 8,2ml (Tri-Natriumcitrat-Lösung 0,106 mol/l; 0,82ml Citrat-Lösung)	Sarstedt, Nümbrecht (D)
<i>S-Monovette</i> Li-Heparin	Sarstedt, Nümbrecht (D)

3. Methoden

3.1. Isolation neutrophiler Granulozyten aus humanem Vollblut

Zur Untersuchung der Pathogenese und Therapie Autoantikörper-induzierter Gewebsschädigung wurde ein Ethikantrag zur Blutabnahme gestellt. Der Ethikrat prüfte diesen unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten und erhob keine Bedenken gegen die Durchführung dieser Studie (Aktenzeichen: 09-140, 13.11.2009). Die Blutentnahmen wurden an gesunden Spendern durchgeführt.

3.1.1. Isolation neutrophiler Granulozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation mit Polymorphprep

Zur Gewinnung von humanen polymorphkernigen Lymphozyten (PMNs: eosinophile, basophile und neutrophile Granulozyten) für das *ROS release Assay* und die Durchflusszytometrie wird die Methode der Dichtegradienten-Zentrifugierung angewendet. Hierfür wird eine venöse Blutentnahme an einem humanen Blutspender von drei Standard EDTA-Röhrchen durchgeführt. Das Vollblut wird in 18ml und 9ml aufgeteilt und 1:1 langsam auf das vorbereitete Polymorphprep in zwei 50ml Tubes geschichtet und bei 23°C mit 500xg für 35min ohne Akzeleration und Bremse zentrifugiert. Es entsteht ein kontinuierlicher Gradient (Abb. 6), der dazu dient die einzelnen Zelltypen voneinander trennen zu können.

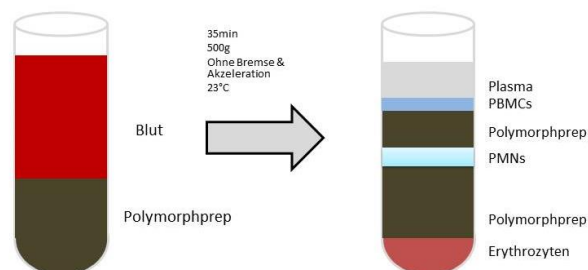


Abbildung 6 50ml Tube mit Polymorphprep-Vollblut-Gradient vor und nach Zentrifugierung

Es wird zunächst das Plasmaband der mononukleären Zellen (PBMCs) beider Tubes mittels einer Glaspipette abgezogen und verworfen. Dadurch ist es nun möglich, das untere Zellband, welches die polymorphkernigen Lymphozyten enthält, auch mit Hilfe einer Glaspipette abzutragen und diese in ein frisches 50ml Tube zu geben. Dieses wird mit RPMI auf 50ml aufgefüllt und bei 4°C mit 300xg für 10 min bei maximaler Akzeleration und Bremse (9/9) zentrifugiert. Es entsteht ein aus Erythrozyten und Lymphozyten bestehendes Zellpellet mit Überstand. Der Überstand wird mit einem Vakuumsauger vorsichtig abgesogen und das Zellpellet mit 5ml destilliertem Wasser lysiert. 5ml des Lysestoppers (2x PBS) müssen nach genau 45s hinzugegeben werden und das Tube wird mit 1xPBS auf 50ml aufgefüllt. Das nun durch erneute Zentrifugierung bei 4°C mit 300xg für 10min entstehende Pellet enthält die polymorphkernigen Lymphozyten. Der Überstand wird gleichermaßen abgesogen und das Pellet mit 10ml CL-Medium resuspendiert und wiederholt zentrifugiert. Der Überstand des gewaschenen Lymphozyten-Pellet wird abgesogen und das Pellet in 2ml CL-Medium gelöst und für weitere Verwendung auf Eis gelagert.

Für die Zellzählung werden 10µl Zellsuspension 1:10 mit 10µl Trypanblau und 80µl CL Medium in einem Mikroreaktionsgefäß verdünnt. Von dieser Lösung werden nun 10µl in eine zuvor vorbereitete Neubauer Zählkammer gegeben und vier Quadranten unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Dabei sind lebende Zellen ungefärbt und tote Zellen blau. Der Mittelwert der vier Quadranten wird gebildet und mit 10 (Verdünnungsfaktor) und 10^4 (Kammerfaktor) multipliziert. Die Einheit des Ergebnisses beträgt Zellen/ml und wird nun auf die gewünschte Zellzahl von 2×10^6 /ml hochgerechnet. Die benötigte Gesamtzellanzahl berechnet sich mit der Anzahl der belegten wells. Da 100µl Zellen/well benötigt werden, wären dies bei einer vollbelegten 96-well Platte ca. 12ml Zellsuspension.

3.1.2. Isolation neutrophiler Granulozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll Paque Plus

Um die Isolation von PMNs für die Chemotaxis durchzuführen, werden drei Citrat-Röhrchen mit Vollblut von einem humanen Blutspender benötigt. Zwei 50ml Tubes gefüllt mit je 13ml 6% HES und 13ml DPBS ohne Ca/Mg werden mit je eineinhalb

der blutgefüllten Citrat-Röhrchen gemischt und gut geschüttelt. Diese müssen für mindestens 1,5h bei RT ruhen, sodass sich ein Überstand bilden kann. Ein neues 50ml Tube wird währenddessen mit 8ml Ficoll vorbereitet. Nach der Wartezeit wird der Überstand der zwei Tubes mit einer Glaspipette abgezogen, vorsichtig auf das Ficoll geschichtet und für 24min bei 850xg, Akzeleration Stufe 3, Bremse Stufe 1 und RT zentrifugiert (Abb. 7). Der Überstand wird mit einer Vakuumpipette in kreisenden Bewegungen abgesaugt, sodass der PBMC-Ring vollständig eliminiert wird.

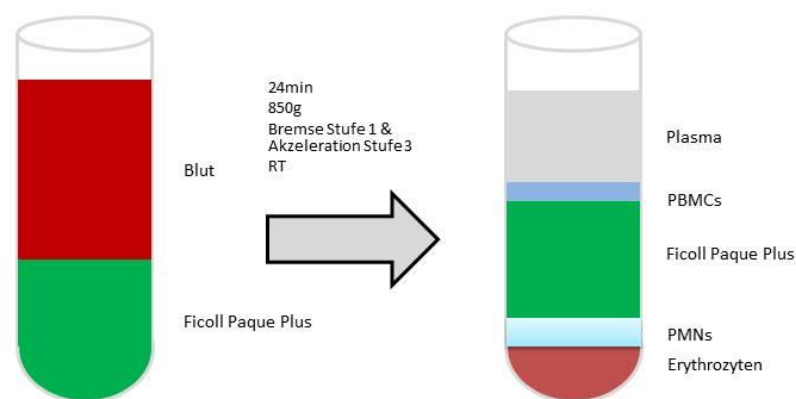


Abbildung 7 Schichtung des Ficolltubes vor und nach der Zentrifugierung

Das Pellet wird nun wie im oben genannten Prozess (siehe 3.1.) lysiert, mit DPBS auf 50ml aufgefüllt und für 10min bei 250xg, Akzeleration 7, Bremse 3 und 8°C zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand abgesaugt, das weiße Pellet mit 50ml DPBS resuspendiert und in derselben Einstellung erneut zentrifugiert. Das Pellet wird vom Überstand befreit, in 2ml Zellpuffer gelöst und bis zur Zellzählung auf Eis gelagert. Die Zellzählung, durchgeführt in einer Neubauerkammer, ist in Unterpunkt 3.1.1. beschrieben. Ausgezählte Zellen werden jedoch für den Chemotaxis Versuchsaufbau (Boyden Chamber) auf 4×10^6 Zellen/ml hochgerechnet und die gesamt benötigte Zellsuspension beträgt 3ml.

3.1.3. Isolation neutrophiler Granulozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation mit Pancoll

Bei dieser Methode werden pro Blutspender 20ml Blut abgenommen und für den Versuchsaufbau des *Spreadings* isoliert. Dies wird 1:2 mit 1%PVA bei RT gemischt, in einen 100ml-Standzylinder überführt und für 30-45min bei RT stehen gelassen. Währenddessen ist ein 50ml Tube mit 10ml Pancoll vorbereitet worden, worauf der Überstand des 100ml-Standzylinders langsam geschichtet wird. Das Tube wird für 20min ohne Bremse bei Akzeleration Stufe 3 mit 850xg bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die PMNs durch vorheriger Resuspension mit 1ml destilliertem Wasser in ein frisches 50ml Tubes überführt. Hierzu werden weitere 4ml destilliertes Wasser gegeben und für insgesamt 45s lysiert. Die Lyse wird mit 5ml 2xPBS abgestoppt und das Tube mit 1xPBS (ohne Ca/Mg) auf 50ml aufgefüllt. Es wird erneut für 10min bei 200xg mit sowohl Bremse als auch Akzeleration auf Stufe 6 und 8°C zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgekippt und das Zellpellet mit 50ml 1xPBS (ohne Ca/Mg) gelöst. Danach wird das Tube wie zuvor zentrifugiert, der Überstand wieder abgekippt und das Pellet diesmal mit 5-10ml 1xPBS (ohne Ca/Mg) resuspendiert, bevor es auf Eis gelagert wird.

Die PMNs werden mit dem CASY Zellzähler automatisch ausgezählt. Dafür müssen 5µl Zellsuspension in 5ml CASY Lösung verdünnt werden. Das Zellpellet wird kurz vor Gebrauch nochmals zentrifugiert und danach mit 6ml CL-Medium gelöst, sodass die Konzentration auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt ist.

3.1.4. Isolation neutrophiler Granulozyten mittels Histopaque- und Percoll-Gradienten

Für die Isolation des NET-Assays wird zunächst eine humane Blutspende von 2-3 Li-Heparin Monovetten benötigt. Das Blut wird in einem 50ml Tube ohne „Kügelchen“ der Monovetten zusammengeführt und mit PBS auf 25ml (falls das Volumen noch nicht erreicht ist) aufgefüllt. In einem neuen 50ml Tube schichtet man zunächst 12,5ml Histopaque 1119 und 12,5ml Lymphozytenisolationsmedium 1077 langsam darauf. Auf den Gradienten werden 25ml des (verdünnten) Bluts pipettiert.

Anschließend wird das Tube für 5min bei 15xg ohne Bremse und Akzeleration (jeweils Stufe 1) zentrifugiert. Vor Ablauf der 5min wird die Zentrifuge auf 170xg umgestellt und die Zellen für weitere 25min auf dieser Drehzahl zentrifugiert (Abb. 8).

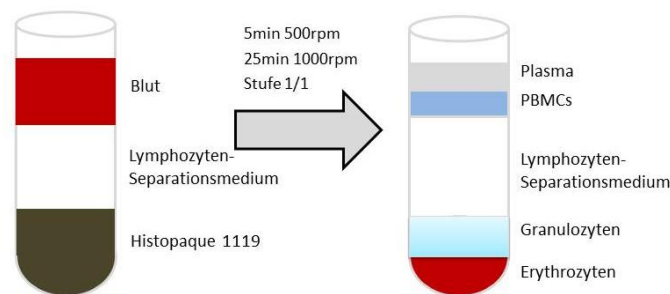


Abbildung 8 Gradient aus Histopaque und Lymphozytenseparationsmedium zur Trennung der Granulozyten von mononukleären Zellen (PBMCs) und Erythrozyten.

Mit 3,5ml Transferpipetten werden die verschiedenen Zellschichten getrennt abgenommen und bis auf die Granulozyten-Schicht verworfen. Diese werden mit PBS in einem neuen Tube auf 50ml aufgefüllt und erneut für 10min bei 670xg mit maximaler Bremse und Akzeleration (beides Stufe 9) zentrifugiert. Währenddessen kann man den Percoll-Gradienten vorbereiten. Zunächst wird das Percoll 10:1 mit 10x PBS verdünnt (d.h. 36ml Percoll+4ml 10x PBS). Nun werden in 15ml Tubes die Percoll-Gradienten angesetzt (85%, 80%, 75%, 70%, 65%). Die Verdünnung findet hier mit RPMI Medium statt, d.h., für eine 85% Lösung benötigt man 8,5ml verdünntes Percoll und 1,5ml RPMI Medium. In ein frisches 15ml Tube wird dann jeweils 2ml der Verdünnungen, beginnend mit der konzentriertesten (85%) Lösung, der Percoll-Gradient vorsichtig aufgeschichtet. Der Überstand des zentrifugierten Tubes wird abgekippt und das Granulozyten-Pellet in 2ml RPMI Medium resuspendiert. Hiervon werden nun 2ml auf den Percoll-Gradienten pipettiert und anschließend für 25min bei 670xg und ohne Bremse und Akzeleration (jeweils Stufe 1) zentrifugiert (Abb. 9).

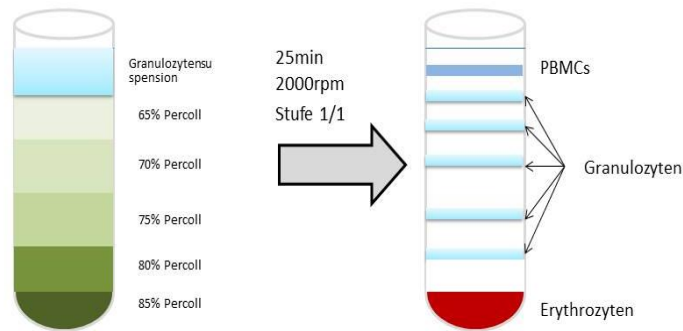


Abbildung 9 Percoll-Gradient zur weiteren Aufreinigung der Granulozyten.

Der oberste Zellring aus PBMCs wird verworfen, die nachfolgenden Granulozytenringe mit einer Transferpipette abgenommen und in ein neues 50ml Tube überführt, welches mit PBS auf 50ml aufgefüllt wird. Hierauf folgt eine weitere Zentrifugierung für 10min bei 670xg auf Stufe 9. Der Überstand wird abgekippt und das Zellpellet mit 5ml *RPMI 1640 Medium modifiziert* resuspendiert. Für die Zellzählung in einer Neubauer Zählkammer benötigt man 10µl der Lösung bestehend aus 50µl der Zellsuspension, 100µl PBS und 100µl Kristallviolett. Die Zellanzahl wird auf $1 \times 10^6/\text{ml}$ in *RPMI 1640 Medium mod.* angesetzt.

3.2. Verdünnungen der PI3K Inhibitoren

3.2.1. Anlegen des Grundstocks der PI3K Inhibitoren

Die insgesamt acht PI3K Inhibitoren (Tabelle 1, Seite 22) wurden bis zur Verwendung nach Anweisung des Herstellers gelagert. Um den Grundstock der Substanzen anzulegen, wurden von allen Substanzen bis auf Copanlisib 5mg durch Hinzugabe von 1ml DMSO in ihrem Liefergefäß gelöst und durch vortexen gemischt. Anschließend sind die Volumina von 1ml in frische 15 bzw. 20ml Tubes transferiert worden und mit DMSO auf die berechneten Volumenmengen, um eine 1mM Stockkonzentration zu erhalten, aufgefüllt worden. Das Lösungsproblem bei IC-87114 wurde durch Erwärmen im Wasserbad bei 40°C gelöst. Von den 1mM Stocklösungen wurden 2x1,5ml in Kryoröhrchen abgefüllt, beschriftet und bei -80°C

gelagert. Copanlisib wurde anstelle von DMSO in H₂O gelöst, um eine 10µM Stockkonzentration zu erhalten. Dafür musste 1mg in 210ml H₂O gelöst werden. Auch hier wurde das Gemisch zur vollständigen Lösung im Wasserbad erwärmt. Danach wurde die 10µM Stocklösung von Copanlisib mit einem 0,2µm Filter filtriert und auch in 2x1,5ml Kryoröhrchen zur Lagerung bei -80°C abgefüllt.

3.2.2. Verdünnungsreihe der PI3K Inhibitoren auf 96-well Platte

Als erstes werden fünf 1,5ml Mikroreaktionsgefäße (E1-5) mit jeweils 900µl DMSO befüllt. In E1 wird 100µl der vorbereiteten 1mM Stocklösung (c_0) (siehe 3.2.1.) des PI3K Inhibitors gegeben, sodass eine Lösung mit $c_1=100\mu\text{M}$ entsteht. Um eine homogene Lösung zu bekommen, wird das Mikroreaktionsgefäß gevortext. Dann wird aus der c_1 -Lösung 100µl in E2 pipettiert, somit erlangt man durch eine 1:10 Verdünnung eine $c_2=10\mu\text{M}$ Lösung. Die Verdünnungsreihe wird fortgeführt bis zu E5. Schließlich besteht die angelegte Reihe aus $c_0=1\text{mM}$, $c_1=100\mu\text{M}$, $c_2=10\mu\text{M}$, $c_3=1\mu\text{M}$, $c_4=0,1\mu\text{M}$ und $c_5=0,01\mu\text{M}$. Dieses Verfahren wird für alle PI3K Stocklösungen aus 3.2.1. durchgeführt. Für Copanlisib werden jedoch nur drei Verdünnung der 10µM Stocklösung angefertigt, d.h., man hat eine Verdünnungsreihe bestehend aus $c_0=10\mu\text{M}$, $c_1=1\mu\text{M}$, $c_2=0,1\mu\text{M}$, $c_3=0,01\mu\text{M}$.

Zur erleichterten Lagerung der Verdünnungsreihen werden diese auf fünf transparente 96-well *non-binding* Platten transferiert (Abb.10). Auf vier dieser Platten sind 100µl/well der Substanzen, in Platte Nr.5 nur 50µl/well vorhanden. Die Platten werden mit Folie verschlossen und beschriftet bei -80°C bis zu weiterem Gebrauch gelagert.

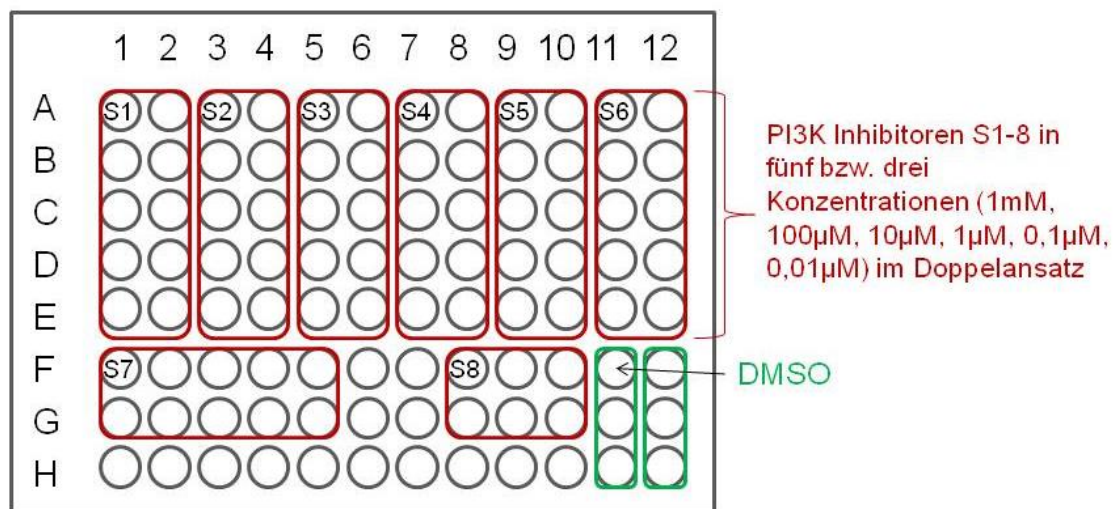


Abbildung 10 Belegung der transparenten 96-well Platte mit der Verdünnungsreihe der PI3K Inhibitoren in fünf Konzentrationen (1mM, 100µM, 10µM, 1µM, 0,1µM und 0,01µM) und DMSO.

3.3. Bestimmung der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies aus PMNs (ROS-release Assay)

Die charakteristische Eigenschaft der Neutrophilen ist die Freisetzung von reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) im inflammatorischen Milieu zur Bekämpfung von Pathogenen [197]. Hierfür benötigen sie einen Stimulus, der in diesem Versuchsaufbau durch die Stimulation mit Immunkomplexen (IC) aus humanen COL7 (hCOL7) und einem monoklonalen humanen IgG1-Ak (anti-hCOL7 IgG1-Ak) besteht. Letztendlich wird die ROS-Freisetzung mittels Chemolumineszenz ermittelt.

Am Vortag des Versuchs wird eine weiße 96-well *high-binding* Platte mit 2,5µl/ml hCOL7 Antigen vorbereitet. Hierfür benötigt man ein frisches Tube mit 5ml Carbonatpuffer aus dem man 25µl herauspipettiert und verwirft. Diese 25µl werden mit hCOL7 aus der Stocklösung ($c=0,49\text{mg/ml}$) aufgefüllt. Die Proteinlösung wird gevortext und jeweils 50µl/well in die 96-well Platte gegeben. Diese wird nun über Nacht mit Folie verschlossen bei 4°C inkubiert.

Die 96-well Platte vom Vortag wird dreimal mit je 250µl/well Waschpuffer gereinigt und anschließend mit 250µl/well Blockpuffer befüllt und mit frischer Folie

verschlossen für 1h auf dem Tischschüttler inkubiert. Währenddessen setzt man frisch die Antikörperlösung mit einer Endkonzentration von 1,8µg/mL an und lagert diese auf Eis.

Nach 1h wird die 96-*well* Platte erneut dreimal mit 250µl/*well* gewaschen, nach Plattenbelegung mit 100 µl/*well* der angesetzten AK-Lösung befüllt und für 1,5h mit Folie verschlossen auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend nach wiederholtem zweimaligem Waschen mit je 250µl/*well*, wird die 96-*well* Platte mit 100µl/*well* CL-Medium einmal gewaschen und anschließend mit einer vorbereiteten Inhibitorenplatte (siehe 3.2.2.) und circa 12ml CL-Medium an einem sterilen Platz gebracht. Dort wird diese nach Plattenbelegung (Abb. 11) befüllt: 2µl/*well* der Inhibitoren oder DMSO und 98µl/*well* CL-Medium in die *well*s und 100µl/*well* CL-Medium Positiv- und Negativkontrollen. Kurz bevor die Platte maschinell gemessen werden soll, werden die PMNs (2×10^6 /ml) (siehe 3.1.1.) 1:20 mit Luminol versetzt und davon 100µl/*well* auf die 96-*well* gegeben.

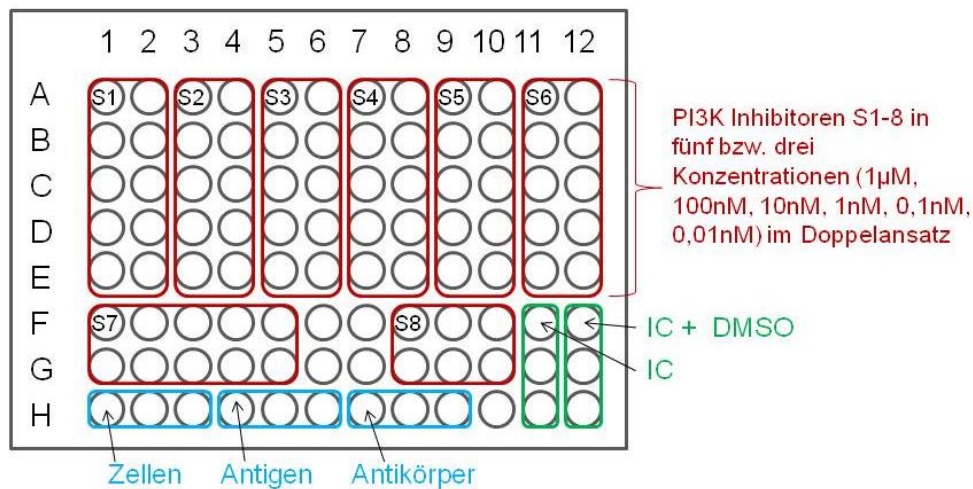


Abbildung 11 Pipettierschema der 96-*well* Platte im ROS Release Assay. Die 96-*well* Platte wird bis auf die blau umrandeten Felder mit IC beschichtet. Zu den Negativkontrollen, in denen es nicht zur Immunkomplexbildung kommt, zählen blau markierte Felder, die nur Zellen, nur Antigen oder Antikörper enthalten. Die Positivkontrollen sind grün markiert und beinhalten IC mit oder ohne DMSO. Rot markierte Felder stellen jeweils im Doppelansatz die fünf verschiedenen Konzentrationen (1µM, 100nM, 10nM, 1nM, 0,1nM, 0,01nM) der acht PI3K Inhibitoren dar. Zu allen *well*s werden 100µl 2×10^6 /ml PMNs mit 1:20 Luminol hinzugefügt und anschließend die Lumineszenz bei 450nm ausgewertet.

Die Messung der Lumineszenz erfolgt bei 450nm für 60-66 Zyklen. Dabei dienen *wells* mit nur Zellen oder Zellen mit Antikörper oder Antigen als Negativkontrolle und *wells* mit IC bzw. IC+DMSO als Positivkontrolle.

3.4. Durchflusszytometrie (FACS)

Die vollständige Belegung der 96-Platte und die Aufreinigung der Neutrophilen gleicht dem Prozess des ROS-Assays (siehe 3.1.1. und 3.3.). In diesem Versuchsaufbau wird jedoch eine transparente *high-binding* 96-*well* Platte verwendet und die isolierten neutrophilen Granulozyten ohne Luminol 100µl/*well* (2×10^6 /ml) auf die Platte hinzugefügt und für 2h bei 37°C/5%CO₂ inkubiert.

Für die FACS-Färbung einer 96-*well* Platte werden ein Zombie-Master-Mix (Zombie-MM) und ein Cluster of Differentiation (CD)-Mix benötigt, die getrennt in einem Mikroreaktionsgefäß angesetzt (Zusammensetzung siehe 2.1.) und bis zur Nutzung im Dunkeln auf Eis gelagert werden. Der Zombie-MM muss vor Gebrauch für 15 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert werden.

Nach 2h Inkubationszeit wird die 96-*well* Platte bei 1200rpm mit maximaler Bremse und Akzeleration bei 4°C oder RT für 6min zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand vorsichtig, d.h. mit der Pipettenspitze nicht bis auf den Plattenboden kommend, mit einer Vakuumpipette abgesaugt und mit 40µl/*well* Annexin Bindepuffer resuspendiert. Zusätzlich werden 10µl/*well* von dem angesetzten Zombie-MM hinzugegeben und das Ganze für 15min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss fügt man 10µl/*well* des CD-Mixes hinzu und die Platte wird für weitere 15min bei RT im Dunkeln inkubiert. Es folgen nun mehrere Zentrifugierungsschritte mit 1200rpm, die jeweils 6min bei 4°C oder RT andauern. Nach der ersten Zentrifugierung wird der Überstand in jedem *well* mit der Vakuumpipette abgesaugt und die Zellpellets mit 200µl/*well* Annexin Bindepuffer resuspendiert. Dem zweiten Zentrifugieren folgt eine Resuspension mit 200µl/*well* FACS Puffer. Nach der dritten Zentrifugierung wird das Zellpellet in 100µl/*well* Fixationspuffer gelöst und anschließend für 20min im Dunkeln bei RT inkubiert. Danach werden noch 100µl/*well* FACS Puffer hinzugefügt und nochmals zentrifugiert. Im finalen Schritt resuspendiert man das Zellpellet mit 100µl/*well* FACS Puffer. Die fixierte 96-*well*

Platte kann nun bis zu sieben Tage im Dunkeln bei 4°C bis zur Analyse gelagert werden.

Vor der Messung muss die 96-well Platte mit einer 40µm *Nylon Mesh Platte* gefiltert werden, damit eventuell entstandene Zellklumpen eliminiert werden können. Dafür pipettiert man den well-Inhalt der ursprünglichen 96-well Platte auf die Nylon Mesh Platte. Die Filterplatte wird bei 1200rpm für 10s zentrifugiert, mit 100µl/well FACS Puffer gespült und anschließend erneut für 10s zentrifugiert. Der well-Inhalt wird nun auf eine V-Boden 96-well Platte übertragen, die für die Messung in der FACS Maschine geeignet ist.

Die durch die Durchflusszytometrie detektierten Zellen umfassen lebende und auch durch Apoptose oder Nekrose abgestorbene Zellen (Abb. 12). Verglichen mit der Trypanblau Färbung ist die Prüfung mittels der Durchflusszytometrie eine Vitalfärbung. Hier werden die Zellen mit FITC Annexin V und Zombie NIR angefärbt, um sie auf ihre Vitalität zu überprüfen. FITC Annexin V bindet Calcium-abhängig an Membranlipide wie Phosphatidylserin, das normalerweise ein Bestandteil der inneren Zellmembran darstellt, aber bei der Apoptose von den Zellen auf deren Außenmembran gekehrt wird. Um allerdings apoptotische von nekrotischen Zellen unterscheiden zu können, wird zusätzlich Zombie NIR verwendet. Späte apoptotische und nekrotische Zellen färben aufgrund der Anlagerung von Annexin an die DNA im Zellkern ebenfalls positiv, sodass Zombie NIR, das auf Zellen mit zerstörter, durchlässiger Membran abzielt, und dort mit freien Amingruppen reagiert, den Unterschied zwischen frühen apoptotischen und nekrotischen Zellen zulässt (www.biolegend.com, Zugriff am 10.11.2017). Die Messung erfolgte am *MACS Quant Analyzer 10*.

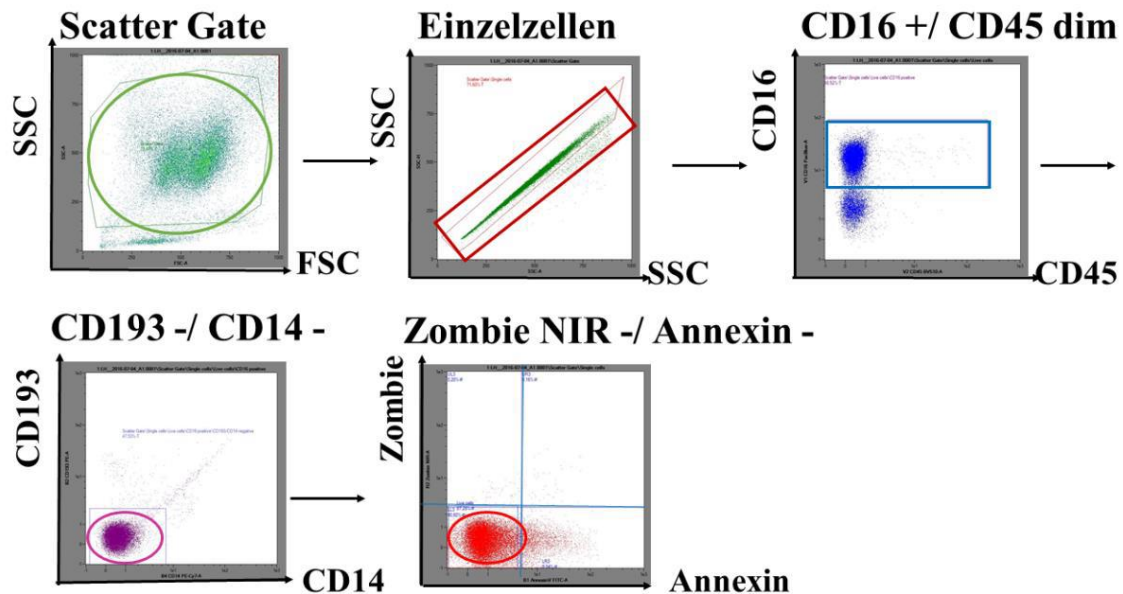


Abbildung 12 Gating Strategie zur Quantifizierung lebendiger neutrophiler Granulozyten. Für die durchflusszytometrische Analyse neutrophiler Granulozyten wurden Zellen mittels Polymorphprep aus humanem Vollblut isoliert (siehe 3.1.1.). Dargestellt sind nacheinander die ausgewählten Gates detektierter Granulozyten, auf die sich die relative Menge lebendiger Zellen bezieht. Dafür ist im *Scatter Gate* (grüner Kreis) die Zellpopulation der Granulozyten ausgewählt worden, wovon dann der Anteil an Einzelzellen (rotes Rechteck) bestimmt wurde. Anschließend sind die CD16 Positiven aber Negativen für CD45 Zellen (blaues Rechteck) ausgewählt worden. Die übriggebliebenen Zellen sind weiter auf CD193 und CD14 Negativität (pinker Kreis) geprüft worden. Durch diese zwei Gates wurden Makrophagen, Lymphozyten, eosinophile und basophile Granulozyten ausgeschlossen. Am Ende sind die reinen Neutrophilen nun mit Zombie NIR und Annexin V auf ihre Vitalität getestet worden, sodass der rote Kreis den Anteil der vitalen Neutrophilen an der Gesamtzellpopulation repräsentiert.

Für den quantitativen Nachweis der Aktivität Neutrophiler werden anti-humane CD62L und CD66b Antikörper eingesetzt. Dabei dient das Glykoprotein CD62L (L-Selektin) peripheren Blutzellen, also Lymphozyten, Neutrophilen, Monozyten, Eosinophilen und hämatopoetischen Vorläuferzellen, als Rezeptor bei der Wanderung aus der Blutbahn in das Zielgewebe. Dort angelangt, werden die Zellen u.a. durch Antigen präsentierende Zellen (APC) aktiviert, wodurch es zum Abspalten von CD62L kommt. Somit werden aktivierte Neutrophile als CD62L negativ detektiert (Abb. 13). Der zweite Marker ist CD66b, welcher der Zelladhäsion an das Endothel und an andere Granulozyten dient. Diese Oberflächenstruktur induziert die Aktivierung der Granulozyten und wird bei aktivierten Neutrophilen positiv nachgewiesen (Abb. 13) [175]. Die Messung erfolgte am *MACS Quant Analyzer 10*.

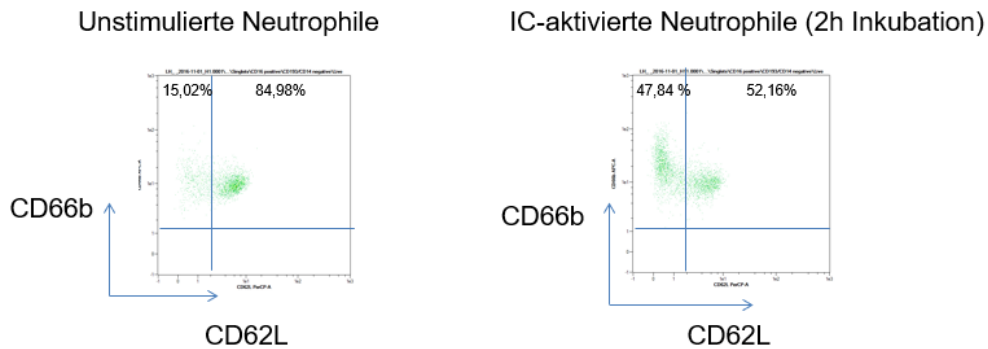


Abbildung 13 Vergleich der CD62L und CD66b Expression bei unstimulierten und IC-stimulierten Neutrophilen (Abb. 14). Für die durchflusszytometrische Analyse neutrophiler Granulozyten wurden Zellen mittels Polymorphprep aus humanem Vollblut isoliert (siehe 3.1.1.). Exemplarisch ist der Unterschied zwischen unstimulierten und IC-aktivierten (nach 2h Inkubation mit IC) Neutrophilen dargestellt. Unstimulierte Neutrophile sind größtenteils (84,98%) positiv für CD66b und CD62L Marker, wohingegen die IC-aktivierten Neutrophile den CD62L abspalten und somit als CD62L negativ und CD66b positiv (47,84%) detektiert werden.

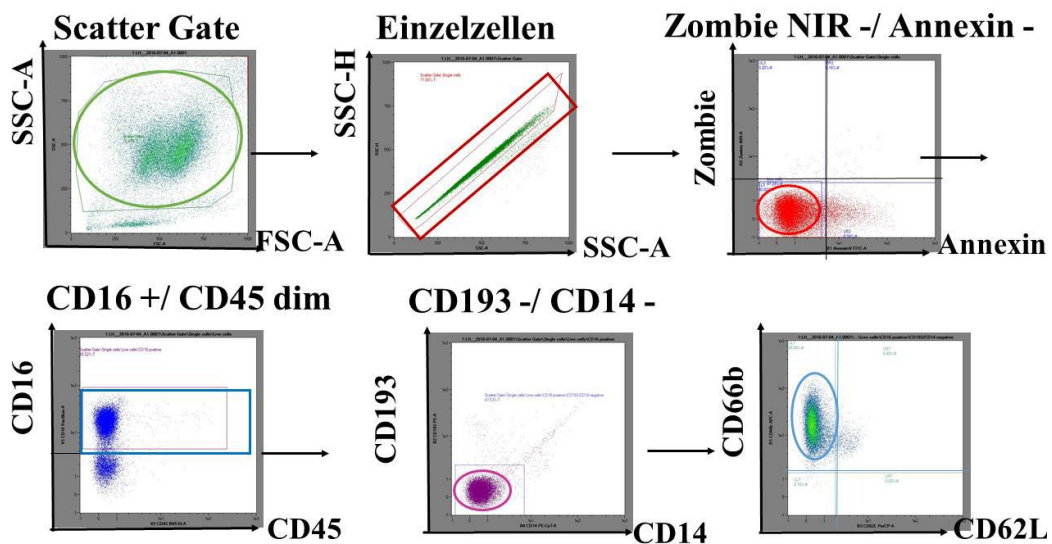


Abbildung 14 Gating-Strategie Strategie zur Quantifizierung aktivierter neutrophiler Granulozyten. Für die durchflusszytometrische Analyse neutrophiler Granulozyten wurden Zellen mittels Polymorphprep aus humanem Vollblut isoliert (siehe 3.1.1.). Dargestellt sind nacheinander die ausgewählten Gates detektierter Granulozyten, auf die sich die relative Menge lebendiger Zellen bezieht. Dafür ist im *Scatter Gate* (grüner Kreis) die Zellpopulation der Granulozyten ausgewählt worden. *Forward Scatter* (FSC) sortiert grob nach großen und kleineren Zellen, wobei das *Side Scatter* (SSC) auf der Granularität der Zellen basiert und diese danach auswählt. Von dieser Zellpopulation bestehend aus größeren, granulozytären Zellen, werden dann durch das nächste *Scatter Gate* nur die einzelnen Zellen (rotes Viereck) ausgewählt. Davon ausgehend sind durch die Zombie NIR- und FITC Annexin Färbung die lebendigen Zellen (roter Kreis) bestimmt worden. Von diesen lebendigen Granulozyten werden nachfolgend CD16 positive und CD45 negative Zellen (blaues Viereck) und anschließend alle CD193 und CD14 (pinker Kreis) negativen Zellen ausgewählt. Hiervon sind die CD66b positiven und CD62L negativen Granulozyten dargestellt, die somit den aktivierten neutrophilen Granulozyten Anteil von der Gesamtzellpopulation (blauer Kreis) präsentiert.

3.5. Chemotaxis

Der Chemotaxis Assay wird mit einer *Boyden Chamber* durchgeführt, die aus zwei Kammerteilen, getrennt durch eine Membran, besteht. Die PMNs migrieren von dem oberen über die Membran in den unteren Teil der Kammer (Abb.15).



Abbildung 15 Aufbau einer 48-Well-Mikro-Chemotaxiskammer AP48 die im Boyden Chamber Versuch verwendet wird. Die Apparatur besteht aus einer unteren Kammer, einem Chemotaxisfilter, einer Silikonmatte und oberen Kammer. Die zwei Kammerteile werden mit Schrauben fixiert.

Für das Chemotaxis Assay müssen die Pufferlösungen steril vorbereitet werden. Sie werden bis zur Benutzung auf Eis aufbewahrt; außer die 15µl 5% Hexabromid, die im 37°C Wärmeschrank gelagert werden, und die 200µl 0,2% Hexabromid, die im 37°C warmen Wasserbad erwärmt werden.

Zuerst wird die Chemotaxiskammer geblockt. Hierfür wird ein verschließbares Gefäß mit feuchten Papiertüchern ausgelegt, welches von nun an als Nasskammer bezeichnet wird. In diese legt man den mit 50µl/well Blockpuffer gefüllten unteren Teil der Boyden Chamber für 1h bei 37°C in den Wärmeschrank. Nach der Wartezeit saugt man mit einer Vakuumpipette die Flüssigkeit aus der Boyden Chamber und stellt diese für weitere 20min in der Nasskammer in den 37°C Wärmeschrank.

Nun kann die Boyden Chamber mit 29,5µl/well IL-8 Stimulus (6nM) (bis auf die Negativkontrollen, diese wells werden mit Zellpuffer belegt) befüllt und danach zusammengebaut werden. Zuerst wird der Chemotaxisfilter mit der glatten Seite nach unten auf den unteren Teil der Boyden Chamber gelegt, darauf kommen die Membran und das Oberteil der Kammer. Als letztes werden die Einzelteile mit

Schrauben fixiert und die Kammer wird in der Nasskammer für 30min bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert.

Währenddessen muss die Zellsuspension (Isolation siehe 3.1.2.) mit 4×10^6 Zellen/ml für 10min bei 37°C ins Wärmebad. Anschließend werden Ca/Mg (26,5% $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung (1,8M) und 20,3% $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ -Lösung (1M) in Plastipur® 1:2000 zur Zellsuspension hinzugegeben. Von dieser Zellsuspension werden nun 60µl/well auf eine transparente *non-binding* 96-well Platte pipettiert und im Verhältnis 1:5 steril 1,2µl/well der Inhibitoren hinzugegeben.

Nach 30min Inkubationszeit wird die Kammer aus dem Wärmeschrank herausgeholt und vorsichtig mit einer Vakuumpipette die Flüssigkeit (falls vorhanden) aus dem oberen Teil der Kammer herausgesaugt ohne Kontakt zum Filter zu haben. In diese wells kann nun 50µl/well der Inhibitor-Zellsuspension hinzugegeben werden (Abb. 16), die in der Nasskammer für 1h bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert wird. Außerdem wird noch der Standard vorbereitet, der aus 10µl 5% Hexabromid und 500µl der Zellsuspension besteht, und auch für 1h bei RT inkubieren muss.

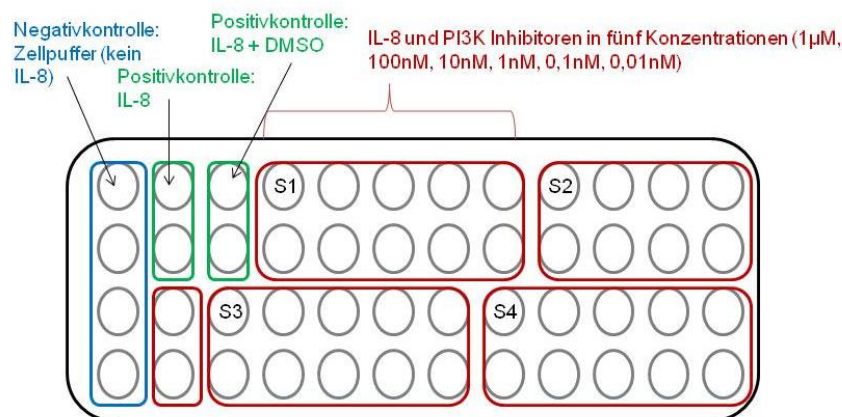


Abbildung 16 Pipettierschema in der 48-well-Chemotaxiskammer. In alle wells des oberen Kammeranteils werden 4×10^6 /ml PMNs hinzugegeben. Die wells der unteren Kammer werden unterschiedlich belegt. Die blau markierten Felder (Negativkontrollen) enthalten kein IL-8 Stimulus, sondern werden stattdessen nur mit Zellpuffer belegt. In allen anderen wells ist IL-8 im unteren Kammerteil vorhanden. Die Positivkontrollen bestehen aus IL-8 alleine oder zusätzlich mit DMSO (grün markierte Felder). In den wells der rot markierten Felder sind in der oberen Kammer die PI3K Inhibitoren in jeweils fünf verschiedenen Konzentrationen in Doppelbestimmung.

Nach abgelaufener Wartezeit werden aus den wells des oberen Kammerteils vorsichtig mit einer Vakuumpipette die Flüssigkeit herausgesaugt ohne Kontakt mit

dem Filter zu haben und mit Vorsicht in ihre Einzelteile zerlegt. Anschließend wird die Kammer für 5min stehen gelassen, damit die eventuell am Filter hängenden Zellen noch Zeit haben herunter migrieren können. Die Kammer wird nun wieder in ihre Einzelteile zerlegt, sodass es zu keiner Zeit zu einer Vermischung der Zellen in der unteren Kammer durch eventuelles Berühren mit der Silikonmatte kommt. Die Zellsuspension aus der Chemotaxiskammer wird auf eine 96-*well non-binding* Platte transferiert und die *wells* anschließend nochmals mit je 25µl 0,2% Hexabromid durchgespült und der Inhalt auch in die entsprechenden *wells* der 96-*well* Platte gegeben. Diese ruht für 15min bei RT zur Lyse der migrierten Zellen.

Währenddessen wird die Standardreihe in einem Doppelansatz von 100µl/*well* des Zellstandards und 5% Hexabromid in zwei *wells* derselben Platte angesetzt. Alle weiteren *wells* werden mit je 50µl Releasepuffer befüllt. Aus den 100µl Zellsuspension werden in jedes weitere *well* je 50µl pipettiert, sodass jeweils 1:1 verdünnt wird. Insgesamt entstehen dabei zwei identische Standardreihen.

Um die Reaktionszeit abschätzen zu können, wird dies mit der einen Standardreihe getestet. Hierfür werden 50µl/*well* Turbo-TMB hinzugefügt und die Zeit bis zum Farbumschlag zu blau gemessen. Dann wird mit 50µl/*well* 1M H₂SO₄ die Reaktion abgestoppt, wobei die Farbe von blau zu gelb umschlägt. Der gleiche Prozess wird mit der ganzen Platte durchgeführt und nach der zuvor bestimmten Zeit mit 1M H₂SO₄ abgestoppt. Nach Abstoppen findet sofort die photometrische Auswertung der Farbintensität bei 450nm im ELISA Reader statt.

Als Positivkontrolle dienen die *wells* mit IL-8 (6nM) stimulierten Zellen. Die Negativkontrollen bestehen aus *wells* mit Zellpuffer und Zellen (ohne IL-8).

3.6. Neutrophiles Spreading

Dem *Spreading* liegt eine Polarisierung der Neutrophilen durch Umbau ihres Zytoskeletts zu Grunde, somit kann man diesen Vorgang mit der xCELLigence Maschine messen. Dieses Gerät arbeitet mit elektrischem Strom, der an die mit

goldbeschichtet 96-*well* E-Platte angelegt wird. Analysiert wird die Impedanz der am *well* Boden angehefteten Neutrophilen, die mit der Zellanzahl korreliert (Abb. 17).

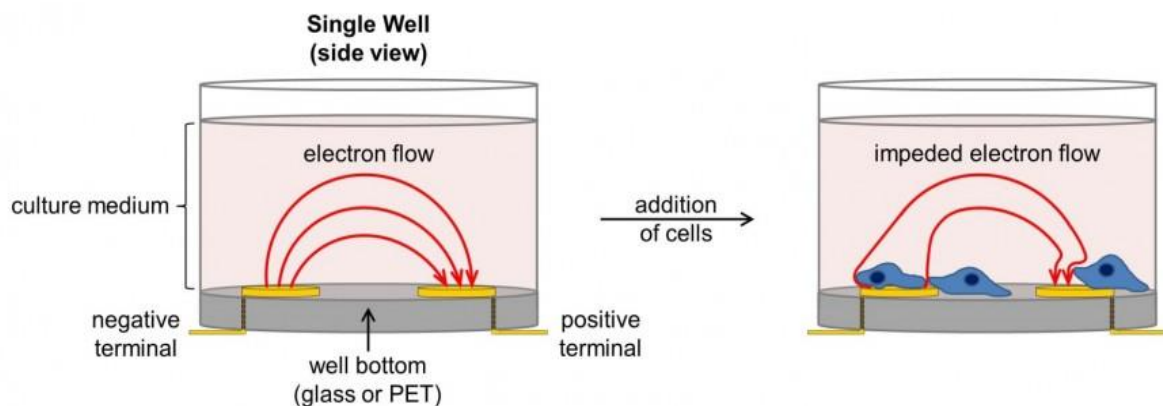


Abbildung 17 Schematische Darstellung des Messvorgangs in der xCELLigence Maschine. Diese arbeitet mit elektrischem Strom, der an den Boden der 96-*well* E-Platte angelegt wird. Der Boden der Platte ist mit stromleitendem Material beschichtet, sodass die Impedanz durch die sich anheftenden PMNs gemessen werden kann. Sie vermindern durch ihre Anheftung den Stromfluss, der somit mit der Zellanzahl korreliert.

Am Versuchsvortag wird die 96-*well* E-Platte mit 0,5µg/50µl/*well* murinem COL7 beschichtet und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die *wells* ohne Antigen werden stattdessen mit 50µl/*well* PBS (ohne Ca/Mg) gefüllt.

Am Versuchstag wird die 96-*well* E-Platte dreimal mit 150µl/*well* Waschpuffer gewaschen und für 2h bei 37°C bei 5% CO₂ getrocknet. Währenddessen wird die Antikörper-Lösung vorbereitet. Diese besteht in einem Verhältnis von 1:25 aus RamCOL7 und Waschpuffer. Davon werden 50µl/*well* auf die getrocknete Platte pipettiert und für eine Stunde bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wird die Platte erneut zweimal mit 150µl/*well* PBS (ohne Ca/Mg) und einmal 150µl/*well* CL-Medium gewaschen. Zur Kalibrierung der xCELLigence Maschine muss die Platte vorher mit 50µl/*well* CL-Medium befüllt werden.

In dieser Zeit wird die Zellsuspension (siehe 3.1.3.) für 10min im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Nach Kalibrierung kann die Platte nun mit 2µl/*well* der Inhibitoren und weiteren 50µl/*well* CL-Medium belegt werden. Direkt vor dem Messprozess werden die 50µl/*well* Zellsuspension (2x10⁶/ml) hinzugefügt. Als Positivkontrolle dienen IC-stimulierte Zellen und die Negativkontrolle besteht aus unstimulierten Zellen, Antigen oder Antikörper und Zellen. Die Messung dauert 2h.

3.7. Nachweis von *Neutrophil extracellular traps* (NETs)

3.7.1. Nachweis der NETs durch SytoxGreen Färbung

NETs werden von neutrophilen Granulozyten freigesetzt und dienen als Abwehrmechanismus bei eingedrungenen Pathogenen aber auch bei inflammatorischen Autoimmunerkrankungen. Die Analyse wurde durchgeführt, um den Einfluss von PI3K Inhibitoren auf die NET Bildung zu untersuchen.

Am Vortag wird eine schwarze *high-binding* 96-well Platte mit 100µg/well HSA Protein (20µg/ml HSA in 50mM Carbonate/Bicarbonatpuffer (pH 9.6)) zur Hälfte befüllt und über Nacht bei 4°C inkubiert [9]. Die andere Hälfte der Platte dient der PMA Stimulation, das als unspezifischer Stimulator der NET Bildung gilt [19].

Am Versuchstag wird die 96-well Platte dreimal mit 200µl/well Waschpuffer gespült und dann mit 200µl/well Blockpuffer (10% biotinfreies BSA in PBS) für 1h auf den Tischschüttler inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen werden 100µl/well anti-HAS IgG (~10µg/ml HSA-IgG), 1:400 in Blockpuffer verdünnt, hinzugefügt und für 1-2h auf dem Schüttler inkubiert. Die Platte wird kurz vor Belegung mit den PMNs und PI3K Inhibitoren zweimal mit je 200µl/well Waschpuffer und einmal mit 200µl/well *RPMI1640 Mod. Medium* gewaschen. Anschließend werden 2µl/well PI3K Inhibitoren bzw. DMSO auf die Platte pipettiert. Hinzu kommen nun 200µl/well PMNs (1×10^6 /ml) (Isolationsprozess siehe 3.1.4.), die zuvor mit 1000:1 SytoxGreen (5µM) versetzt worden sind und 10µl/well verdünntes PMA (20nM) in die nicht mit IC-beschichteten wells. Zuletzt kann die Messung gestartet werden. Hierfür wird die 96-well Platte mit einem Verdunklungsdeckel in den *Tecan infinite M200 Pro reader* gestellt, der für 17h über Nacht die Chemolumineszenz auswertet. Die Auswertung von den PMA stimulierten NETs wird nur für die ersten 4h ausgewertet, weil es darüber hinaus toxisch wirkt [10]. Im Gegensatz dazu werden IC-stimulierte NETs für 7h ausgewertet.

3.7.2. Fluoreszenz-Mikroskopische Darstellung der NETs

Um die ausgebildeten NETs auch mikroskopisch darstellen zu können, wurde eine Färbung mit SytoxGreen durchgeführt. SytoxGreen ist ein grün fluoreszierender

Farbstoff, der intakte Zellmembranen nicht überwinden kann. Er dringt also nur in Zellen ein, deren Zellbarriere gestört ist und bindet an dsDNA [5]. Er dient deshalb als Marker der Apoptose oder wie hier der NET Anfärbung.

Hierfür werden drei 24-*well* Platten mit jeweils 24 Deckplatten benötigt. Am Vortag werden die Deckplatten mit 100µg/ml HSA (20µg/ml HSA in 50mM Carbonate/Bicarbonatpuffer) benetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Platten werden zweimal mit 500µl/*well* Waschpuffer und einmalig mit 500µl/*well* RPMI 1640 Medium Mod. gewaschen, bevor sie mit 500µl/*well* isolierter PMNs (1×10^6 /ml) (siehe 3.1.4.) versetzt werden. In die *wells* hinzupipettiert werden entweder 5µl der PI3K Inhibitoren oder 5µl DMSO. Für die PMA-stimulierten *wells* fügt man zusätzlich 25µl PMA (20nM Endkonzentration) hinzu. Anschließend werden die Platten mit IC-stimulierten *wells* für 7h bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Die PMA-stimulierten *wells* jedoch müssen nach 4h abgestoppt werden. Hierbei wird der Überstand der *wells* langsam abpipettiert und die darinliegenden Deckplatten mit 0,5ml/*well* 4% PFA befeuchtet. Die Reaktion soll bei RT 10min ablaufen. Nun wird der Überstand erneut abpipettiert und die *wells* jeweils mit 0,5ml/*well* RNase-freiem Wasser benetzt und bei 4°C bis zum Färbeprozess gelagert.

Vor der Färbung wird der Überstand (RNase-freies Wasser) verworfen und 300µl/*well* SytoxGreen (100nM) hinzugefügt. Dies wird für 10-15min bei RT im Dunkeln inkubiert, bevor der Überstand wieder entfernt wird und die Deckplatten mit 300µl/*well* Wasser befeuchtet werden. Nun werden je 2-3 Deckplatten auf einen Objektträger geklebt und über Nacht bei RT im Dunkeln zum Erhärten ruhen gelassen.

Die Objektträger können mit einem Fluoreszenzmikroskop am nächsten Tag ausgewertet werden.

3.8. Bead-basiertes Immunoassay zur Analyse der Zytokinausschüttung

Neutrophile Granulozyten schütten bei Aktivierung, z.B. durch IC-Stimulation, diverse Zytokine aus. Um diese näher bestimmen zu können, führt man den Prozess in 3.3. beschrieben bis zum letzten Schritt der Platten Befüllung mit den Zellen und Inhibitoren durch. Nun gibt man 98µl CL-Medium in diejenigen *wells* mit

2µl Inhibitor oder DMSO und 100µl in die übrigen *wells*. Anschließend fügt man 100µl/*well* der Zellsuspension hinzu (Aufreinigung siehe 3.1.1.). Die belegte 96-*well* Platte wird mit einem Deckel verschlossen für 6h bei 37°C in den Wärmeschrank inkubiert.

Nach Inkubation wird die Platte bei 1200rpm und 4°C für 8min zentrifugiert. Anschließend kann man den Überstand der einzelnen *wells* vorsichtig mit einer Multipipette abnehmen und auf zwei neue transparente *non-binding* 96-*well* Platten überführen: 30µl/*well* des Überstands werden auf die erste Platte gegeben, 150µl/*well* auf die zweite. Der Überstand wird mit einer Folie verschlossen bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.8.1. Legendplex custom human 6-panel

Zielzytokine sind bei diesem Versuch humanes IL-1α, humanes IFN-γ, humanes TNF-α, humanes IL-6, humanes IL-17 α und humanes IL-1R α.

Sowohl das Legendplex Kit als auch eine der Überstands-Platte (siehe 3.8.) werden bei RT für circa 15min aufgetaut. Begonnen wird mit dem Ansetzen der Standardreihe in je 0,5ml Mikroreaktionsgefäßen nach Anleitung *des Legendplex Mult-Analyte Flow Kit Custom Human Assay*. Diese dienen später als Vergleichswerte.

Es wird eine 96-*well* V-Boden Platte verwendet, die mit 12,5µl/*well* Assaypuffer belegt wird. In die Standardreihe (Doppelansatz) kommen auch 12,5µl/*well* des angesetzten Standards. Dazu werden 12,5µl/*well* des Zellüberstands aus der aufgetauten Platte auf die V-Boden Platte pipettiert. Am Ende werden noch 12,5µl/*well* *beads* hinzugefügt, die vorher gut gevortex wurden. Die Platte wird nun mit einer Folie und Dunkelhülle verschlossen abzentrifugiert und anschließend für 2h bei RT und 800rpm auf den TischiSchüttler gestellt.

Nach 2h Stunden Inkubationszeit wird die Platte für 5min bei 250xg zentrifugiert und der Überstand durch Abkippen, sodass das Pellet am *well*-Boden haften bleibt, verworfen. Nun werden 200µl/*well* Waschpuffer auf die Platte gegeben, das Pellet bei 800rpm für 1min auf dem Schüttler gelöst und bei 250xg für 5min erneut

zentrifugiert und abgekippt. Darauf kommen 12,5µl/well Antikörperlösung hinzu, die mit Folie und Dunkelhülle verschlossen für 1h auf dem Schüttler inkubieren müssen.

Im Anschluss werden direkt 12,5µl/well Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) hinzugegeben und die Platte erneut für 30min bei 800rpm mit Folie und Dunkelhülle verschlossen auf dem Schüttler inkubiert. SA-PE bindet mit hoher Affinität an Biotin und wird bei indirekter Immunfluoreszenz als sekundärer Marker verwendet, um die biotinylierten primären Antikörper zu markieren (www.biolegend.com, Zugriff 10.11.2017). Die Zentrifugation und das Abkippen wird, wie im vorherigen Absatz beschrieben, durchgeführt und das Pellet mit 150µl/well Waschpuffer resuspendiert und circa 5-10min auf dem Schüttler inkubiert. Währenddessen kann das FACS Gerät mit *raw beads* äquilibriert und die Einstellungen für die Messung vorgenommen werden. Die Messung der V-Boden Platte erfolgt mit dem *MACS Quant Analyzer 10*.

3.8.2. LEGENDplex™ Human Proinflammatory Chemokine Panel (13-plex)

Die Zielzytokine entsprechen dem Standard LEGENDplex™ Human Proinflammatory Chemokine Panel (13-plex) Kit: IL-8, Eotaxin, RANTES, MIP-1α, MIG, MIP-3α, MIP-1β, I-TAC, IP10, TARC, MCP-1, ENA-78 und GROα.

Die Vorbereitung der Standardreihe ist identisch mit jener aus 3.8.1.. Es wird wieder eine V-Boden 96-well Platte verwendet, welche diesmal jedoch mit 12,5µl/well Assaypuffer, 12,5µl/well Standard bzw. Zellüberstand (siehe 3.8.), 12,5µl/well *beads* (vorher gevortext) und 12,5µl/well Antikörper belegt wird. Diese wird zentrifugiert und für 2h mit Folie und Dunkelhülle verschlossen auf den Tischschüttler bei 800rpm inkubiert. Danach werden 12,5µl/well SA-PE hinzugegeben und erneut für 30min bei 800rpm inkubiert. Anschließend wird die Platte 5min bei 1000g zentrifugiert und der Überstand mit einer Kippbewegung verworfen. Die Pellets werden mit 200µl/well Waschpuffer für 1min auf dem Schüttler gelöst und erneut für 5min bei 1000g zentrifugiert. Der Überstand wird wie zuvor verworfen und die Pellets mit 150µl/well Waschpuffer auf dem Schüttler resuspendiert. Die Messung findet in einem *MACS Quant Analyzer* statt.

4. Ergebnisse

4.1. PI3K β und δ beeinflussen die ROS Freisetzung von IC-aktivierten PMNs

Durchgeführt wurde der ROS-Release Assay, um die Wirkung der PI3K-Inhibitoren auf die ROS Ausschüttung der IC-stimulierten PMNs beobachten zu können. Das Messen der ROS wird als Parameter für die Aktivierung der Neutrophilen herangezogen [34]. Zum besseren Vergleich der Daten wurden diese auf den Wert 100 normalisiert, hierzu diente IC+DMSO als Vergleichsparameter (Abb. 18).

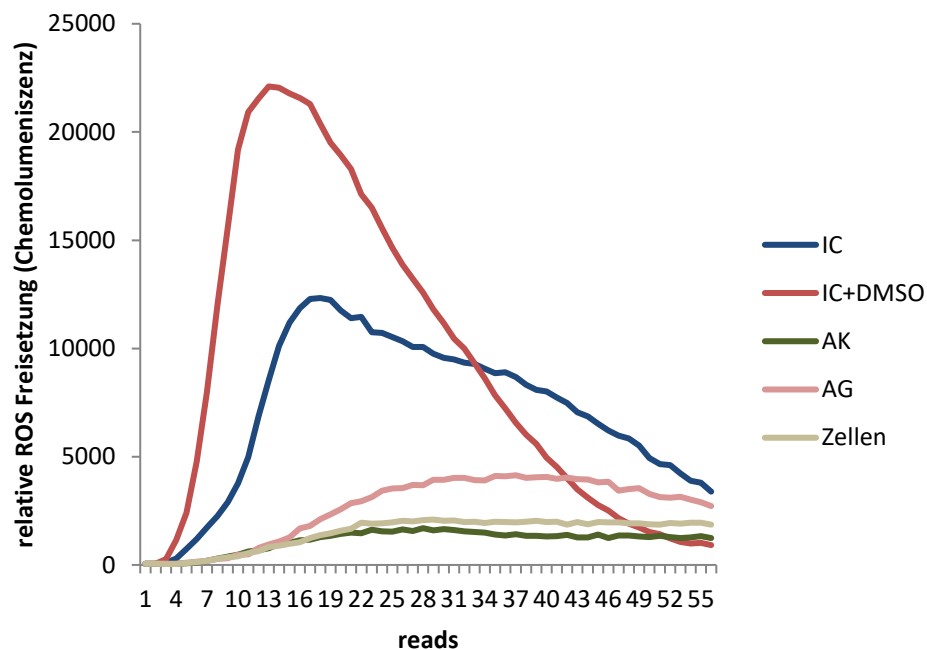


Abbildung 18 Vergleich der ROS Freisetzung nach IC Stimulation und reiner Stimulation mit AK, AG oder nur Zellen nach 2h. Frisch isolierte humane PMNs wurden für 2h mit Immunkomplexen aus hCOL7/anti-hCOL7-IgG1 (IC) oder Kontrollen (entweder nur hCOL7(AG), nur anti-hCOL7-IgG1 (AK) oder ohne Beschichtung (Zellen) inkubiert und die Freisetzung von ROS mittels Chemilumineszenz bestimmt. IC+DMSO wird in der weiteren Auswertung der Daten =100 gesetzt und dient somit der Normalisierung der Daten.

Wie in 3.3. beschrieben, wurden aus humanem Vollblut isolierte PMNs mit hCOL7 Antigen anti-hCOL7 Antikörperkomplexen aktiviert und die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) über 2h analysiert. Zu diesem Prozess wurde einer der acht PI3K-Inhibitoren in jeweils fünf verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt und auf ihren Effekt auf die ROS Freisetzung der PMNs untersucht (Abb. 19).

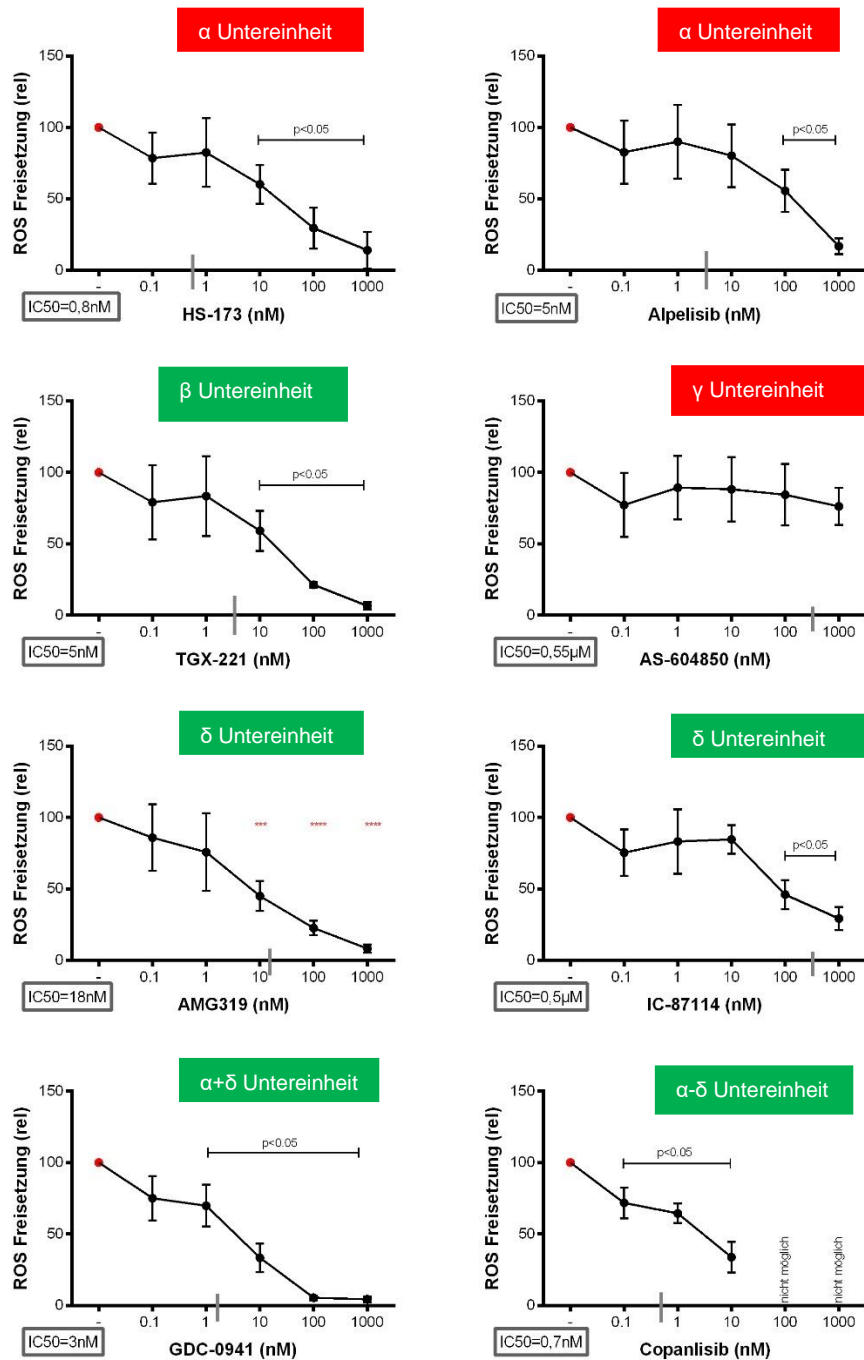


Abbildung 19 Effekt der acht PI3K-Inhibitoren in je fünf verschiedenen Konzentrationen (x-Achse) auf die relative ROS-Freisetzung (y-Achse) der PMNs. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. Frisch isolierte humane PMNs wurden für 2h mit Immunkomplexen aus hCOL7/ anti-hCOL7-IgG1 (IC) inkubiert und die verschiedenen PI3K Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen zugefügt. Die Freisetzung von ROS mittels Chemilumineszenz wurde über 2h gemessen und die Fläche unter der Kurve bestimmt. Die Stimulation mit IC+DMSO wurde zur Normalisierung der Daten auf 100 (dargestellt in roten Punkten; Achsenbeschriftung „-“) gesetzt. Über jedem Diagramm ist die relevante Untereinheit markiert, die durch die jeweilige Substanz am selektivsten inhibiert wird. Grün hinterlegt sind die Untereinheiten, die bei Inhibition durch die Substanz signifikante Effekte bei der ROS-Freisetzung zeigen. Rot hingegen sind die Untereinheiten, die zwar signifikante Ergebnisse erzielten, die jedoch nicht in ihrem IC50 Bereich liegen. n=6, one-way Anova p<0,05

In Abbildung 19 ist zu erkennen, dass die PI3K Isoformen β und δ konzentrationsabhängig die ROS-Freisetzung signifikant verringern. Im Gegensatz dazu zeigt die alleinige Inhibition der α Untereinheit eine signifikante Verminderung der ROS-Freisetzung, die jedoch nicht im Bereich der „mittleren inhibitorischen Konzentration“ (IC₅₀) des Inhibitors liegt. Sowohl bei gleichzeitiger Inhibition der α und δ Untereinheit der PI3K als auch bei vollständiger Inhibierung aller Untereinheiten erhält man signifikante Verminderung der ROS-Freisetzung. Die Hemmung der γ Untereinheit hatte in keiner der untersuchten Konzentrationen einen Effekt auf die ROS-Produktion.

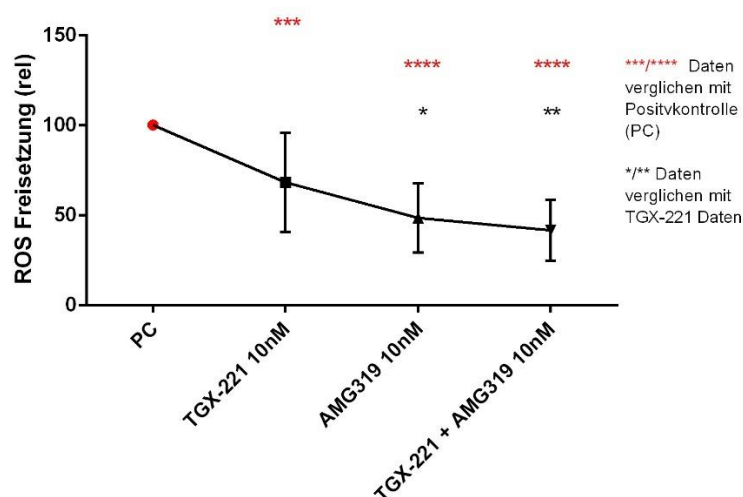


Abbildung 20 TGX-221 und AMG319 zeigen keinen additiven Effekt auf die ROS-Freisetzung. Auf der x-Achse sind die Substanzen und auf der y-Achse die relative ROS-Freisetzung der PMNs aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. Frisch isolierte humane PMNs wurden für 2h mit Immunkomplexen aus hCOL7/ anti-hCOL7-IgG1 (IC) inkubiert und mit TGX-221, AMG319 oder beiden gleichzeitig in 10nM versetzt. Die Freisetzung von ROS mittels Chemilumineszenz wurde über 2h gemessen und die Fläche unter der Kurve bestimmt. Die Stimulation mit IC+DMSO wurde zur Normalisierung der Daten auf 100 gesetzt. Die Positivkontrolle (PC) ist wieder graphisch in roten Punkten dargestellt. n=12, one-way Anova *p<0,03, **p<0,003, ***p<0,0006, ****p<0,0001.

Um zu untersuchen, ob PI3K β und δ einen additiven inhibitorischen Effekt auf die ROS-Freisetzung zeigen, wurden anschließend die Substanzen TGX-221 (PI3K β Inhibitor) und AMG319 (PI3K δ Inhibitor) erneut mit n=12 hinsichtlich ihres Effektes auf die ROS Freisetzung untersucht (Abb. 20). Bei gemeinsamer Inhibierung von PI3K β und PI3K δ jedoch zeigt sich kein signifikanter Effekt in Bezug auf die alleinige Inhibierung von der δ Untereinheit durch AMG319. Signifikante Unterschiede sind

nur zwischen alleiniger Inhibierung von der β Untereinheit (TGX-221) und gemeinsamer β und δ Hemmung zu erkennen.

4.2. Die Hemmung der PI3K zeigt keinen Einfluss auf die Expression von CD62L auf neutrophilen Granulozyten

Damit neutrophile Granulozyten in vivo zum Ort gelangen, an dem sie ihre Funktion ausüben können, müssen sie das vasale System verlassen. Hierfür müssen sie zuerst aktiviert werden, d.h. sie exprimieren den Oberflächenmarker CD66b. Zusätzlich kommt es zu einem CD62L *shedding*. Dieser Marker ist im Normalzustand auf den Neutrophilen exprimiert, muss jedoch zum Verlassen der Blutbahn abgespalten werden, womit sie als CD62L negativ bezeichnet werden [175] (Abb. 21). CD62L wird somit als Marker für die FACS Analyse verwendet und zeigt die aktivierten Neutrophilen an.

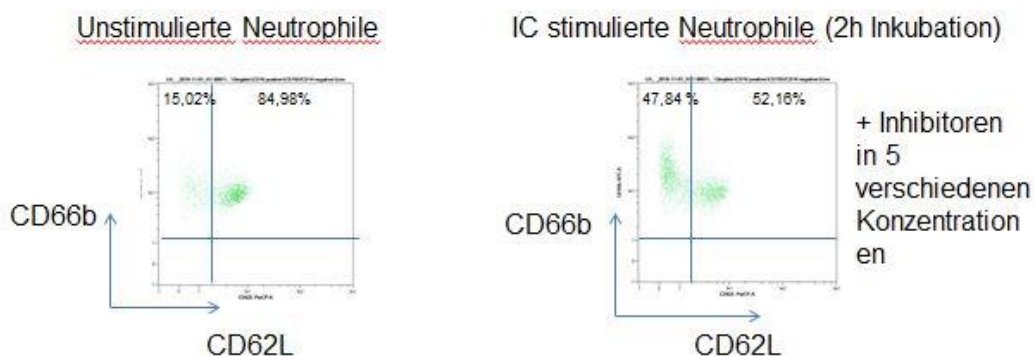


Abbildung 21 FACS Diagramme der CD66b und CD62L Expression auf neutrophilen Granulozyten vor und nach Stimulation mit IC für 2h bei 37°C. Für die durchflusszytometrische Analyse neutrophiler Granulozyten wurden Zellen mittels Polymorphprep aus humanem Vollblut isoliert (siehe 3.1.1.). Es wird deutlich, dass unstimulierte Neutrophile überwiegend (84,98%) sowohl CD62L als auch CD66b positiv sind, wohingegen die Neutrophilen nach IC-Stimulation für 2h zu 47,84% den CD62L Marker abgespalten haben und somit als CD62L negativ/ CD66b positiv detektiert werden.

In vitro wurden die PMNs für 2h bei 37°C mit hCOL7/ anti-hCOL7-IgG1 ICs stimuliert und parallel mit den acht PI3K Inhibitoren in fünf verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurden diese wie in 3.4. beschrieben mit spezifischen Markern gefärbt, die eine Analyse lebendiger aktivierter neutrophiler Granulozyten

ermöglichen. Diese Zellen sind positiv für CD16 und CD66b, aber negativ für CD45, CD14, CD193, Annexin V, Zombie und CD62L.

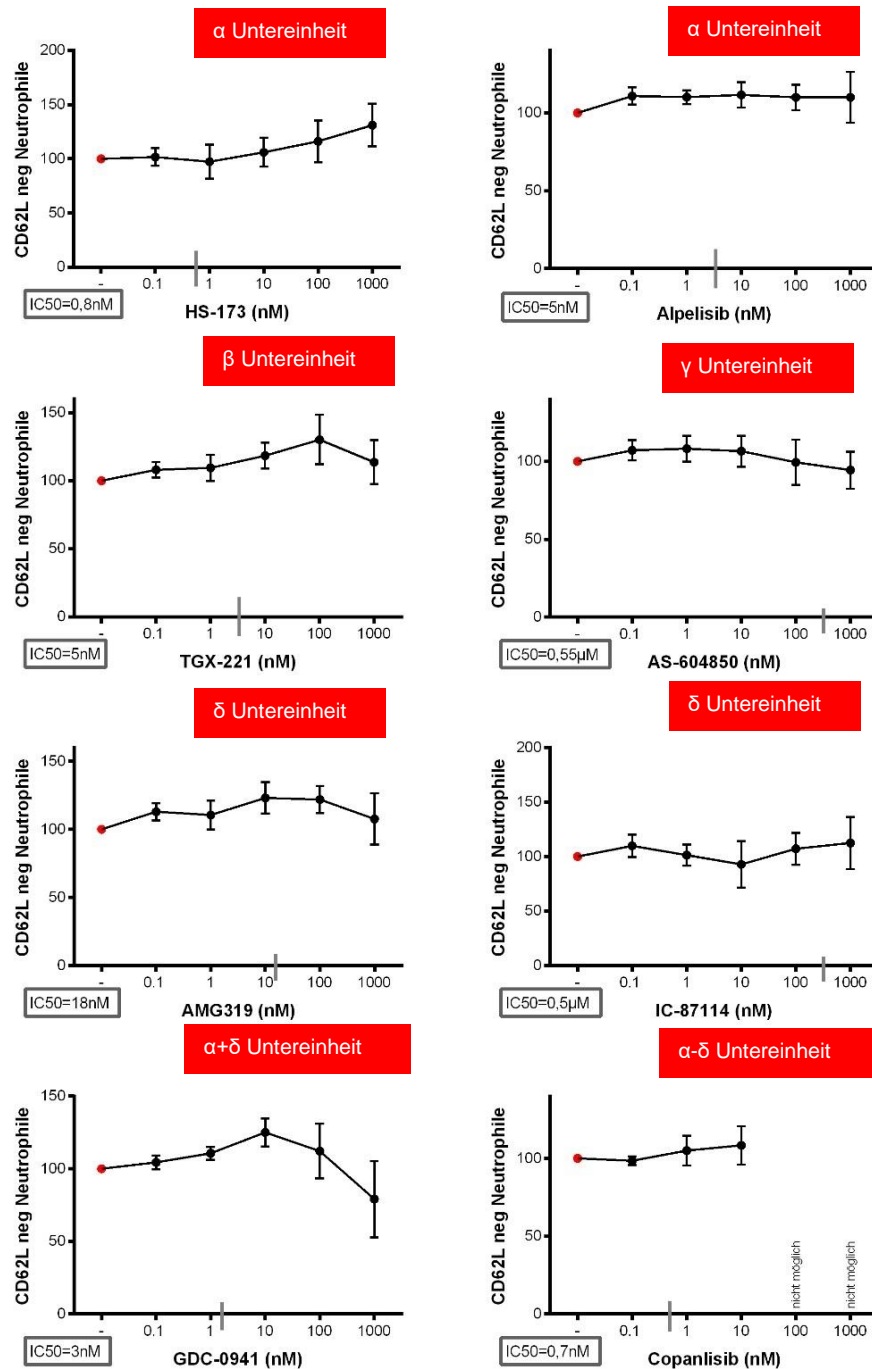


Abbildung 22 Keine Veränderung der CD62L Expression auf Neutrophilen nach 2h Inkubation bei 37°C mit IC und PI3K Inhibitoren in fünf verschiedenen Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. Frisch isolierte humane PMNs wurden für 2h mit Immunkomplexen aus hCOL7/ anti-hCOL7-IgG1 (IC) inkubiert und die verschiedenen PI3K Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen zugefügt. Die Stimulation mit IC+DMSO wurde zur Normalisierung der Daten auf 100 (dargestellt in roten Punkten; Achsenbeschriftung „-“) gesetzt. Mithilfe der spezifischen Färbung durch den CD-Mix und Zombie-MM (siehe 2.1.) wurden die lebenden und aktivierten PMNs, d.h. sie sind negativ für CD45, CD14, CD193, Annexin V/Zombie und positiv für CD16, gezählt. Die FACS Analyse ist für jede Substanz mit isolierten Neutrophilen (2×10^6 Zellen/ml) von sechs verschiedenen Blutspendern durchgeführt worden (n=6). Die Messung fand mit Hilfe von einem *Miltenyi MACSQuant Analyzer* statt. one-way Anova

Die Untersuchung der acht PI3K Inhibitoren auf deren Einfluss auf die CD62L Expression zeigte, dass keine der Substanzen in dem getesteten Zeitraum von 2h die CD62L Expression der Neutrophilen (Abb. 22) beeinflusste. Als Positivkontrolle dienen wieder IC-stimulierte Neutrophile mit DMSO versetzt, welche zum Vergleich auf 100 normalisiert wurden.

4.3. Die PI3K Inhibitoren zeigen keinen toxischen Effekt auf PMNs

Um einen toxischen Effekt der PI3K Inhibitoren ausschließen zu können, wurden diese nach IC-Stimulation in den fünf in den anderen Versuchen verwendeten Konzentrationen mit 2×10^6 /ml PMNs für 2h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Toxizität mittels FITC-Annexin V/ Zombie NIR Färbung mit FACS bestimmt.

Mit dem *MACSQuant Analyzer* sind die PMNs, die negativ markiert für CD14, CD45, CD193 und positiv für CD16, hinsichtlich einer negativen Färbung mit Annexin und Zombie analysiert wurden. Die Untersuchung ergab, dass keine der verwendeten Substanzen in dem getesteten Zeitraum von 2h und bei einer Temperatur von 37°C einen toxischen Effekt auf die PMNs aufwies (Abb. 23).

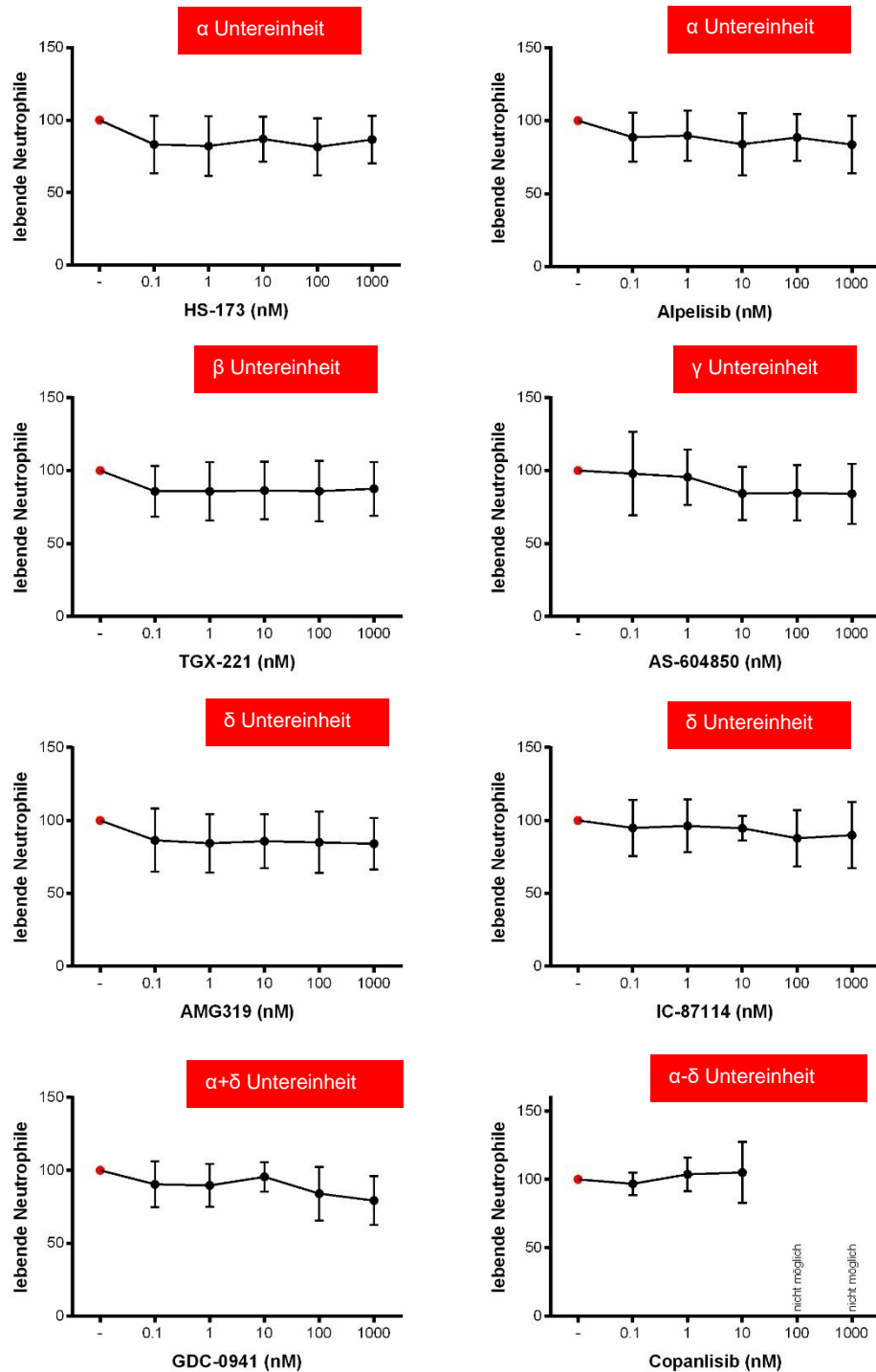


Abbildung 23 Die PI3K Inhibitoren zeigen keinen toxischen Effekt im untersuchten Zeitraum von 2h und 37°C in den verwendeten Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. Frisch isolierte humane PMNs (2×10^6 Zellen/ml) wurden für 2h mit Immunkomplexen aus hCOL7/ anti-hCOL7-IgG1 (IC) inkubiert und die verschiedenen PI3K Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen zugefügt. Die Stimulation mit IC+DMSO wurde zur Normalisierung der Daten auf 100 (dargestellt in roten Punkten; Achsenbeschriftung „-“) gesetzt. Die *Gating* Strategie für die lebenden PMNs bestand aus CD14, CD45 und CD193 negativen aber CD16 positiven Zellen. Die Messung fand mit Hilfe von einem *Miltenyi MACSQuant Analyzer* statt. n=6; one-way Anova

4.4. Die Hemmung der PI3K α , γ oder δ reduziert die IL-8-induzierte Chemotaxis von PMNs

Neutrophile Granulozyten haben die Eigenschaft von Botenstoffen wie z.B. IL-8 angelockt zu werden. Diese Botenstoffe stimulieren die Zellen zur gerichteten Bewegung zwischen Geweben und Überwindung von Membranen (Chemotaxis) [159,197,203].

Mittels des Boyden-Chamber-Assays wurden isolierte PMNs (siehe 3.1.2.) durch IL-8 1h bei 37°C zur Chemotaxis stimuliert und mit jeweils einem der acht PI3K Inhibitoren in fünf verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Die Resultate, dargestellt in Abb. 24, lassen erkennen, dass durch Inhibition der Untereinheiten α , γ oder δ die Chemotaxis von PMNs signifikant vermindert wird. PI3K β jedoch hat nur bei einer Konzentration von 10nM einen signifikanten Effekt auf die Chemotaxis. Dieser ist durch die relativ hohe Konzentration und die abnehmende Selektivität eingeschränkt zu beachten. Der Versuch wurde jeweils sechsmal für jede Substanz in fünf verschiedenen Konzentrationen durchgeführt und mit der Positivkontrolle, bestehend aus isolierten neutrophilen Granulozyten (4×10^6 Zellen/ml) und IL-8, die auf 1 standardisiert wurde, normalisiert. Somit zeigen die Diagramme der Abb. 24 die relative Migration der Neutrophilen an.

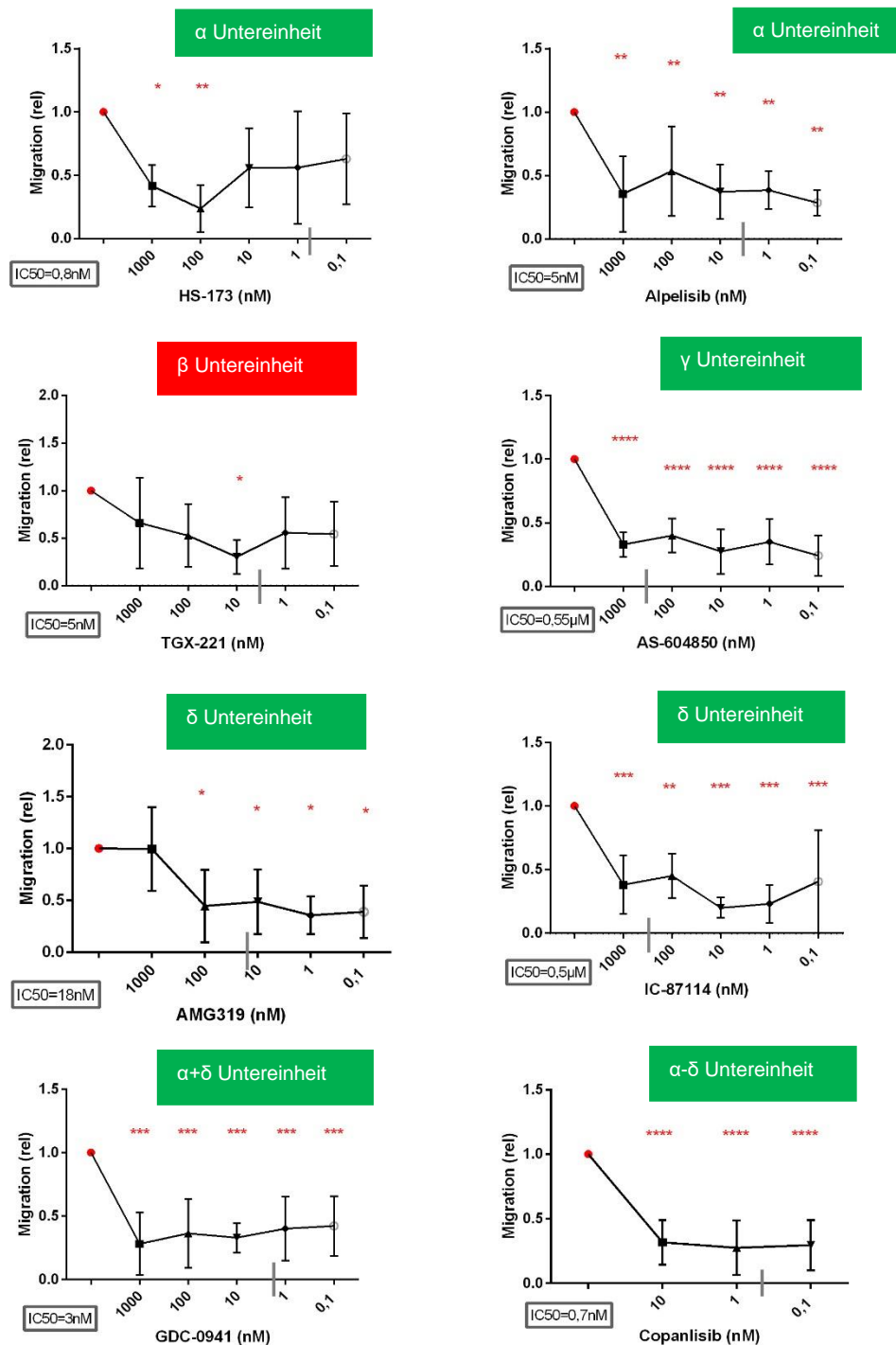


Abbildung 24 Die Chemotaxis der PMNs ist signifikant vermindert nach Inhibition der PI3K α , γ oder δ Isoformen für 1h bei 37°C. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. Frisch isolierte humane PMNs ($4 \times 10^6/ml$) wurden für 1h mit IL-8 inkubiert und die verschiedenen PI3K Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen zugefügt. Die Migration der Neutrophilen wurde anschließend mittels Chemolumineszenz gemessen und die Fläche unter der Kurve bestimmt. Die Stimulation mit IL-8 wurde zur Normalisierung der Daten auf 1 gesetzt, sodass die y-Achse die relative Chemotaxis der PMNs darstellt. Die Hemmung der PI3K β ist in diesem Prozess nicht relevant und erzeugt deshalb, 10nM ausgenommen, keine signifikanten Resultate. n=6, one-way Anova *p<0,02, **p<0,005, ***p<0,0007, ****p<0,0001

4.5. Neutrophiles *Spreading* wird durch die Hemmung der PI3K α , β und δ vermindert

Als neutrophiles *Spreading* wird die Ausbreitung von neutrophilen Granulozyten durch eine Stimulation, z.B. durch Chemokine, bezeichnet. Dieser Prozess geht der Migration voraus und umfasst die Aktivierung der Zellen bis hin zum Endothelrollen und Integrin-vermitteltem *Spreading* [162]. Wie in Abschnitt 3.6. beschrieben, wurde der Widerstand von angehefteten Neutrophilen an einer beschichteten Oberfläche mittels elektrischen Stroms gemessen, die in Korrelation mit den sich bewegenden Zellen steht.

Neutrophile ($2 \times 10^6/\text{ml}$) wurden mit IC aus mCOL7/R α -mCOL7 stimuliert, anschließend mit den zu untersuchenden PI3K Inhibitoren in jeweils fünf Konzentrationen inkubiert und für 2h mit der xCELLigence gemessen. Dieser Vorgang wurde mit isolierten Neutrophilen von drei verschiedenen Blutspendern durchgeführt. Die Unterdrückung des *Spreadings* gelingt bei der höchsten Konzentration ($1 \mu\text{M}$) der PI3K α , β und δ Inhibitoren. Sowohl bei PI3K γ Inhibierung als auch bei total gehemmter PI3K sieht man keine signifikante Minderung des neutrophilen *Spreadings* (Abb. 25).

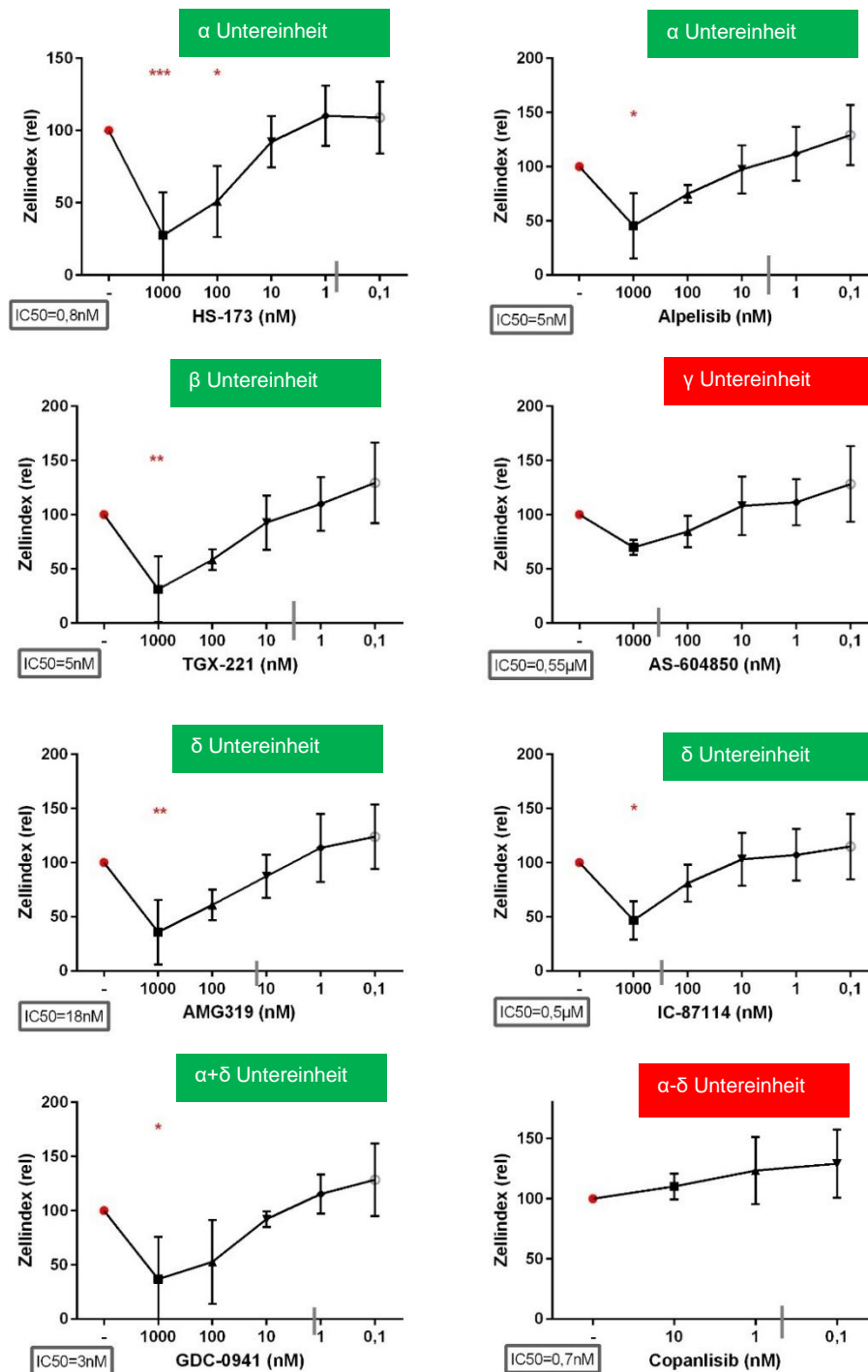


Abbildung 25 Das Spreading der PMNs wird durch die höchste Konzentration der PI3K α , β und δ Inhibitoren vermindert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. Frisch isolierte humane PMNs ($2 \times 10^6/\text{ml}$) wurden mit IC aus mCOL7/R α -mCOL7 stimuliert und die verschiedenen PI3K Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugefügt. Für 2h bei 37°C wurde der Widerstand der sich am *well*-Boden angelagerten PMNs mittels elektrischen Stroms in einer xCELLigence gemessen, der mit den gewanderten PMNs korreliert gemessen und anschließend die Fläche unter der Kurve bestimmt. Die Stimulation mit IC+DMSO wurde zur Normalisierung der Daten auf 100 gesetzt, sodass die y-Achse den relativen Zellindex der PMNs darstellt (n=4); one-way Anova *p<0,02, **p<0,005***p<0,0009

4.6. Die Hemmung der PI3K α und δ moduliert die IC induzierte NET Bildung, während die Inhibierung der PI3K α die PMA induzierte NET Bildung beeinflusst

Neutrophile Granulozyten sind in der Lage, sogenannte NETs zu generieren. Diese "Netze" bestehen aus ihrer eigenen DNA, Chromatin, Histonen und Enzymen wie der Elastase, Cathepsin G und Myeloperoxidase (MPO) [18] und dienen sowohl der Bekämpfung von eindringenden Mikroorganismen als auch der Reaktion bei inflammatorischen Autoimmunerkrankungen [9].

Wie in 3.7. beschrieben, sind PMNs durch entweder IC bestehend aus HSA/anti-HSA oder PMA (20nM) stimuliert und mit SytoxGreen zur Detektion angefärbt worden. Der Prozess wurde für jede Konzentration der acht Substanzen dreimal mit unterschiedlichen Blutspendern wiederholt (n=3). Hierfür wurden jedoch die Substanzen nochmals 1:10 in ihren normalerweise verwendeten Konzentrationen verdünnt, da die NET Bildung durch die hohe DMSO Konzentration gestört wurde. Die verwendeten Konzentrationen waren: 0,01nM, 0,1nM, 1nM, 10nM und 100nM. Abbildung 26 zeigt die Resultate nach 7h IC Stimulation, wobei nach PI3K α Inhibition (Alpelisib) die NET Bildung ansteigt, bei Hemmung der δ Untereinheit (AMG319, IC-87114) jedoch die NET Formation signifikant vermindert ist. Bei kombinierter Inhibierung von PI3K α und δ (GDC-0941) ist auch eine Hemmung der NET Bildung zu erkennen. Alle Effekte sind nur in der jeweiligen höchsten Konzentration (100nM) des Inhibitors zu sehen. Mit Ausnahme von der Inhibition der α Untereinheit durch Alpelisib, die auch in einer 10nM Konzentration signifikante Effekte erzeugt.

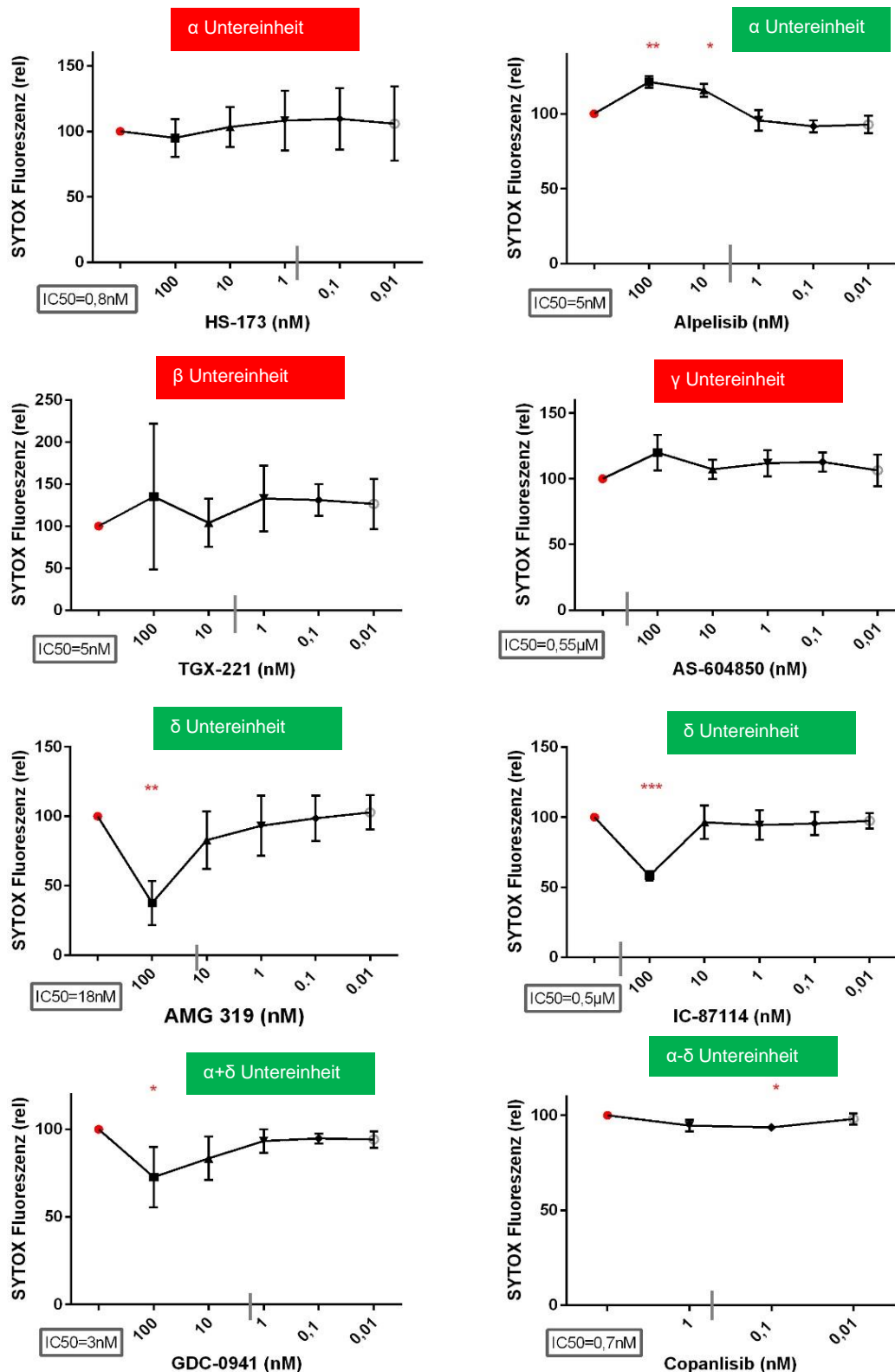


Abbildung 26 Die NET Produktion nach IC-Stimulation der PMNs mit HSA/anti-HSA ICs ist durch Hemmung der PI3Kα und δ in der höchsten verwendeten Konzentration (100nM) reduziert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. Die PMNs wurden in einer Konzentration von $1 \times 10^6/\text{ml}$ mit den PI3K Inhibitoren und SytoxGreen inkubiert und für eine Messzeit von 7h ausgewertet ($n=3$). Anschließend wurde die Fläche unter der Kurve bestimmt und als Positivkontrolle die Neutrophilen stimuliert mit IC+DMSO auf 100 standardisiert, sodass die y-Achse die relative Fluoreszenz wiedergibt. one-way Anova * $p<0,04$, ** $p<0,007$, *** $p<0,0001$

Zur Fluoreszenz-Mikroskopischen Darstellung der NETs nach IC-Stimulation wurde eine Färbung mit SytoxGreen durchgeführt. In Abb. 27 ist exemplarisch die Fluoreszenz-Auswertung für AMG319 im Vergleich zur IC-Stimulation nach 7h dargestellt. Es ist zu erkennen, dass bei höherer Konzentration der PI3K α und δ Inhibitoren (100nM) die NET Bildung stärker gehemmt ist als bei niedrigeren Konzentrationen (10nM). Als Positivkontrolle ist hier die alleinige Stimulation mit IC+DMSO dargestellt.

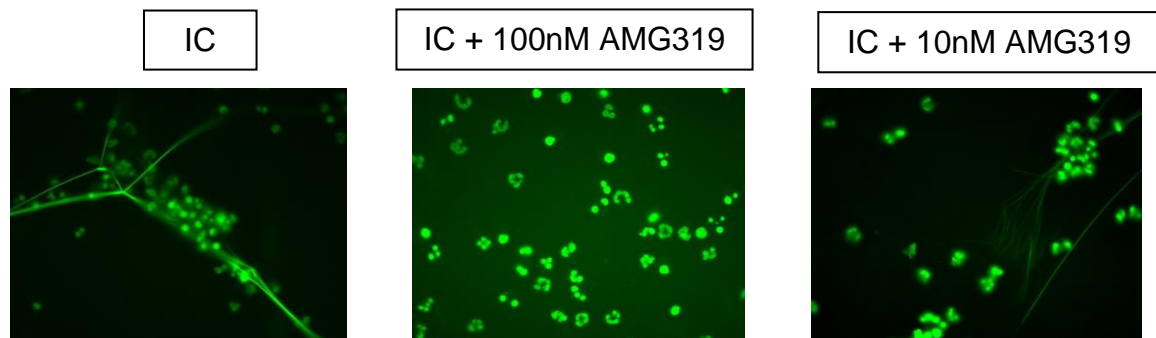


Abbildung 27 Die Fluoreszenz-Mikroskopische Darstellung der Effekte durch AMG319 in zwei verschiedenen Konzentrationen (100nM und 10nM) zeigt, dass die Hemmung der PI3K δ eine signifikante Rolle in der Bildung der NETs spielt. Dargestellt ist die IC induzierte NET Bildung von Neutrophilen mit einer 40x Vergrößerung. Frisch isolierte PMNs ($1 \times 10^6/\text{ml}$) wurden mit IC aus HSA/anti-HSA für 7h inkubiert ($n=3$). Bei Zugabe von der höchsten Konzentration (100nM) ist die NET Bildung nahezu vollständig gehemmt, wobei schon bei geringer Konzentrationsminderung (10nM) die NET Bildung wieder verstärkt auftritt. Zum Vergleich ist die IC Stimulation nach 7h ohne Hinzufügen des PI3K Inhibitors dargestellt und zeigt, dass die NET Bildung der PMNs dort am stärksten ausgeprägt ist.

Zusätzlich wurde auch die NET Bildung nach Stimulation mit PMA untersucht, die jedoch nach 4h Inkubation ausgewertet wurde, da PMA nach 4h toxische Effekte aufweist [182]. Hier zeigt nur ein PI3K α Inhibitor (HS-173) einen signifikanten steigernden Effekt auf die NET Formation der PMNs (Abb. 28). Alle anderen Substanzen hatten keinen signifikanten Einfluss auf die NET Bildung der PMA stimulierten PMNs.

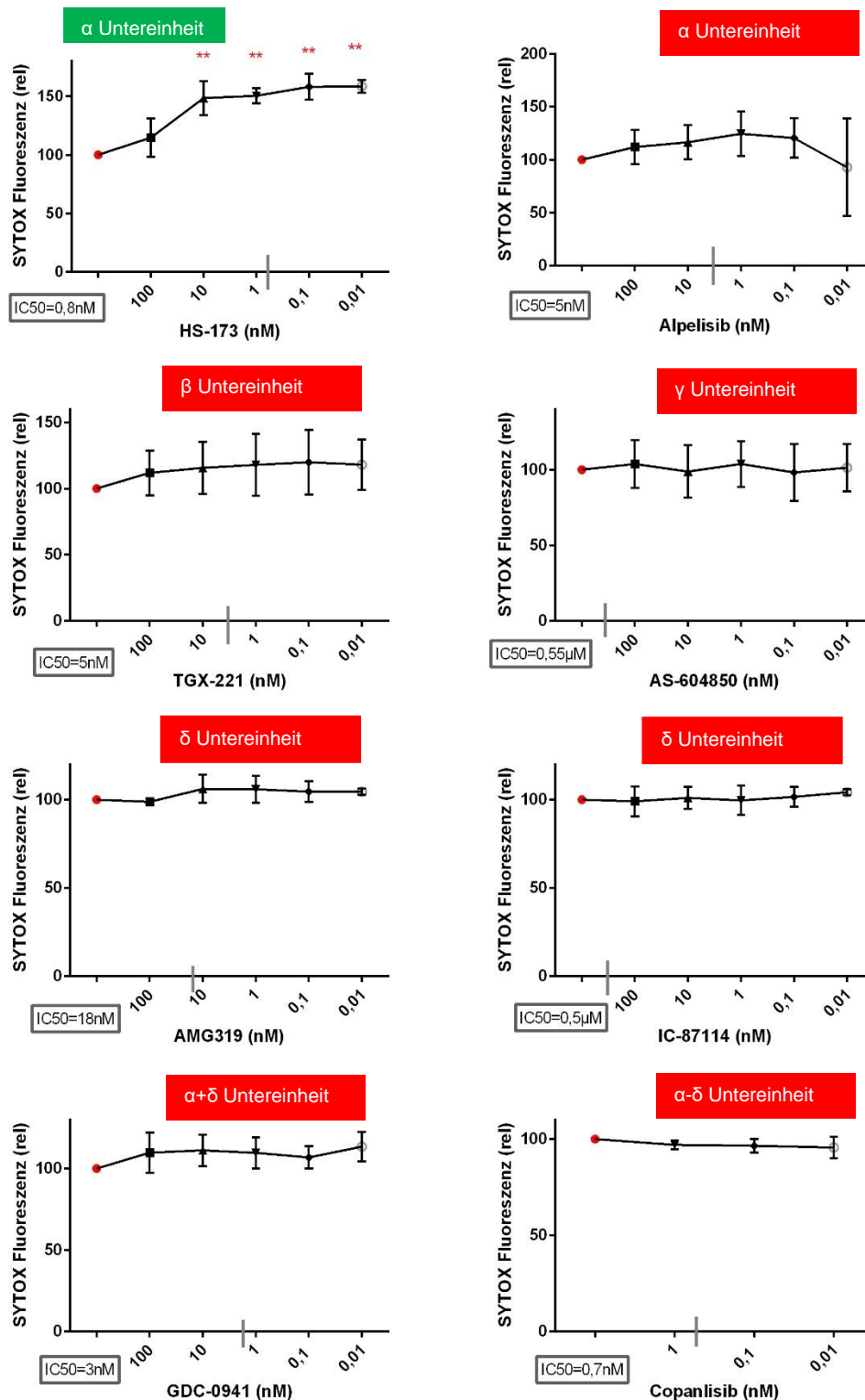


Abbildung 28 PMA induzierte NETs zeigen nur durch Hemmung der α Untereinheit (HS-173) einen signifikanten Anstieg der NET Produktion. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. Die PMNs wurden in einer Konzentration von $1 \times 10^6/\text{ml}$ mit den PI3K Inhibitoren, PMA (20nM) und SytoxGreen (5μM) inkubiert und für 4h in einem *Tecan Reader* gemessen (n=3). one-way Anova **p<0,003

Auch hier wurde wieder zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung eine Färbung mit SytoxGreen (5µM) durchgeführt (Abb. 29). Als Positivkontrolle dient hier die 4h PMA-Stimulation, um den Vergleich zu der Verstärkung der NET Bildung durch den PI3Kα zu ermöglichen.

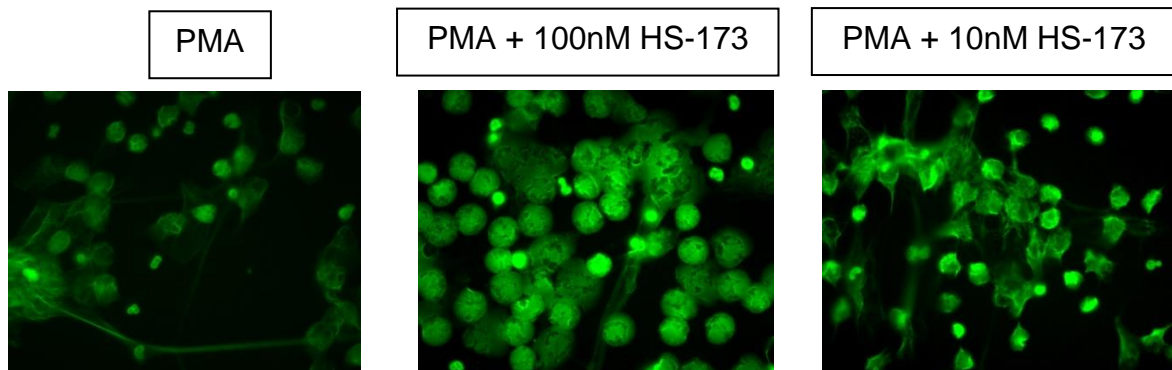


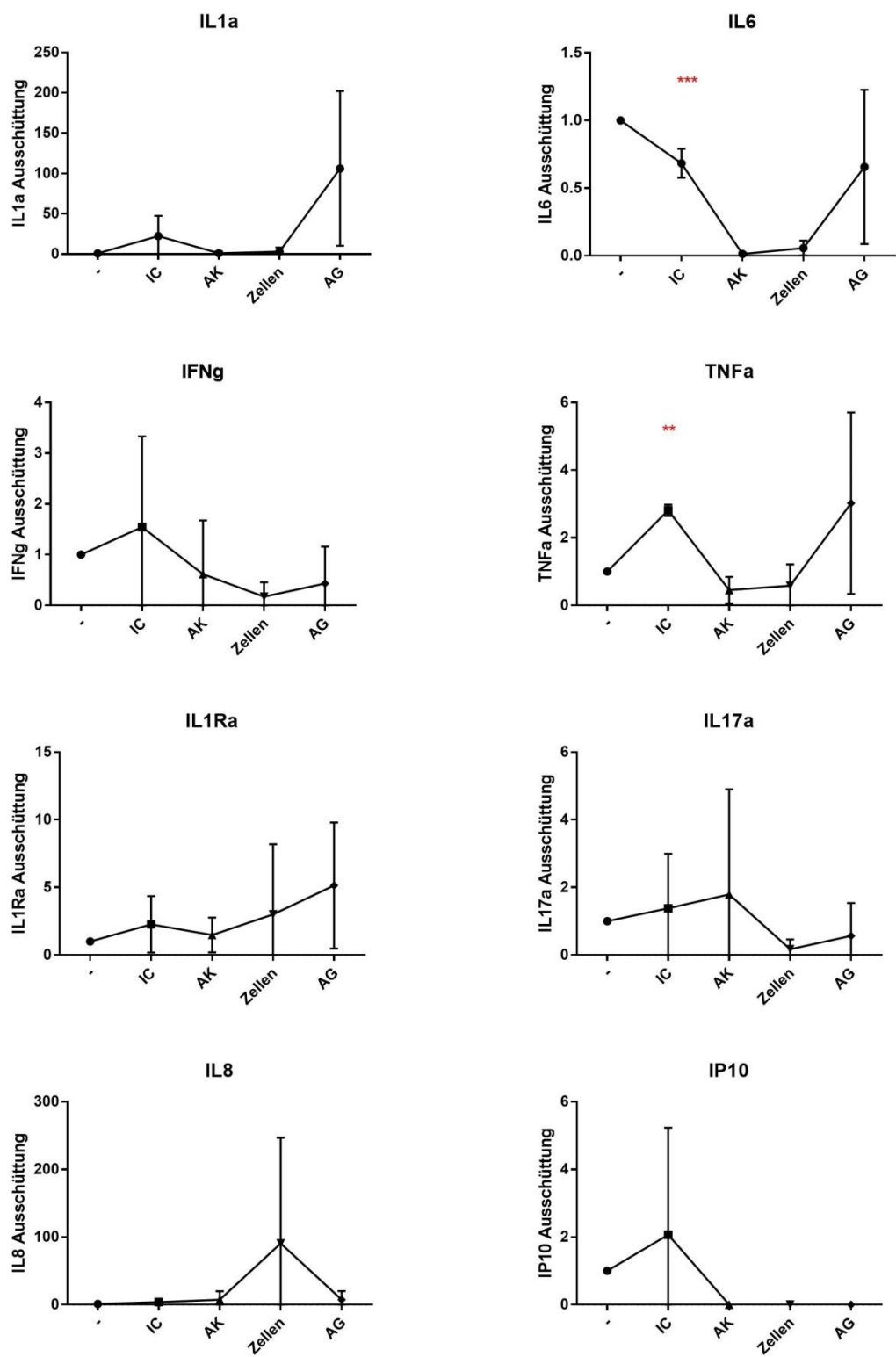
Abbildung 29 Der PI3Kα Inhibitor (HS-173) zeigt stimulierende Effekte auf die NET Bildung der PMA stimulierten PMNs nach 4h Stimulation. Dargestellt ist die PMA induzierte NET Bildung von Neutrophilen mit einer 40x Vergrößerung. Frisch isolierte PMNs ($1 \times 10^6/\text{ml}$) wurden mit 20nM PMA für 4h inkubiert. Bei der höchsten Konzentration (100nM) von HS-173 ist die stärkste NETosis beobachtet worden. Es wurden $1 \times 10^6/\text{ml}$ PMNs mit 20nM PMA und den PI3K Inhibitoren für 4 inkubiert (n=3). Die anderen Untereinheiten der PI3K zeigten keinen signifikanten Effekt auf die NET Bildung der PMA stimulierten PMNs.

4.7. Copanlisib, TGX-221 und GDC-0941 modulieren die Zytokinausschüttung der PMNs

Durch die Aktivierung humaner neutrophiler Granulozyten werden unter anderem proinflammatorische Moleküle wie IL-8, fMLP, C5a und LTB₄ ausgeschüttet, die wiederum zu einer Anlockung (Chemotaxis) der Neutrophilen, Austritt aus der Blutbahn (Migration) und ROS Produktion führen [26,65,72,148,149]. Außerdem ist seit längerem bekannt, dass PI3 Kinasen, vor allem PI3Kβ, in Tumorzellen überexprimiert sind, sodass seit neustem mit PI3K Inhibitoren in der Tumorthherapie gearbeitet wird [140,191]. Auf dieser Grundlage wurde die Untersuchung der Zytokinausschüttung von IC-stimulierten Neutrophilen näher untersucht.

Zuerst wurde die Zytokinausschüttung der PMNs nach IC-Stimulation im Vergleich zu unstimulierten Zellen, Zellen mit Antikörper und Zellen mit Antigen inkubiert untersucht. Es ist insgesamt die Ausschüttung von 19 verschiedener Zytokine durch Neutrophile getestet worden, wobei lediglich die Freisetzung von IL-6 und TNF-α

eine signifikante Differenz zwischen IC-Stimulation und unstimulierten PMNs zeigte (Abb. 30).



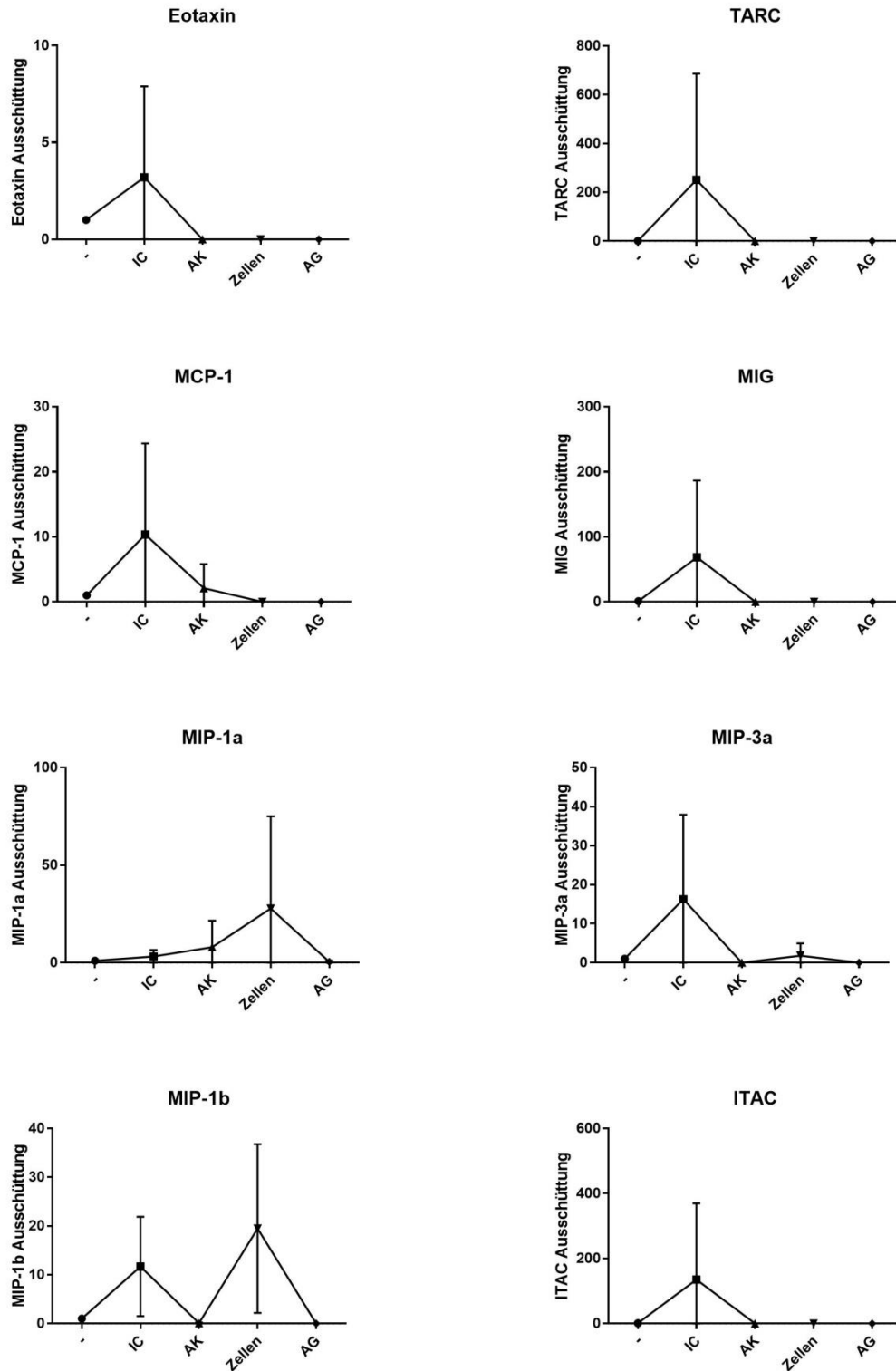


Abbildung 30 Die Ausschüttung von IL-6 und TNF α wird durch 6-stündige IC-Stimulation der PMNs signifikant verändert. Dargestellt sind die Einzelwerte, Mittelwert und Standardabweichung. Als Vergleichsparameter dienen hier die unstimulierten PMNs ($2 \times 10^6/\text{ml}$), welche auf der y-Achse als „-“ beschriftet sind ($n=3$). unpaired t-test ** $p < 0,004$, *** $p < 0,0008$

Somit wurde die Auswirkung der PI3K Inhibitoren auf die Ausschüttung der IC-stimulierten PMNs von IL-6 und TNF- α weiter untersucht. Hierfür wurde ein spezifischer *human 6-Panel* der Firma Biolegend verwendet (siehe 3.8.). Sowohl der PI3K β Inhibitor TGX-221 und der δ -Inhibitor GDC-0941 als auch der Pan-PI3K-Inhibitor Copanlisib verursachten signifikante Effekte (Abb. 31+32). Die Hemmung der genannten PI3K Untereinheiten resultierten alle in einer verstärkten Freisetzung von IL-6, jedoch führte die totale PI3K Inhibition durch Copanlisib zu einer verminderten TNF- α Konzentration im Gegensatz zu TGX-221, das die TNF- α Konzentration erhöhte.

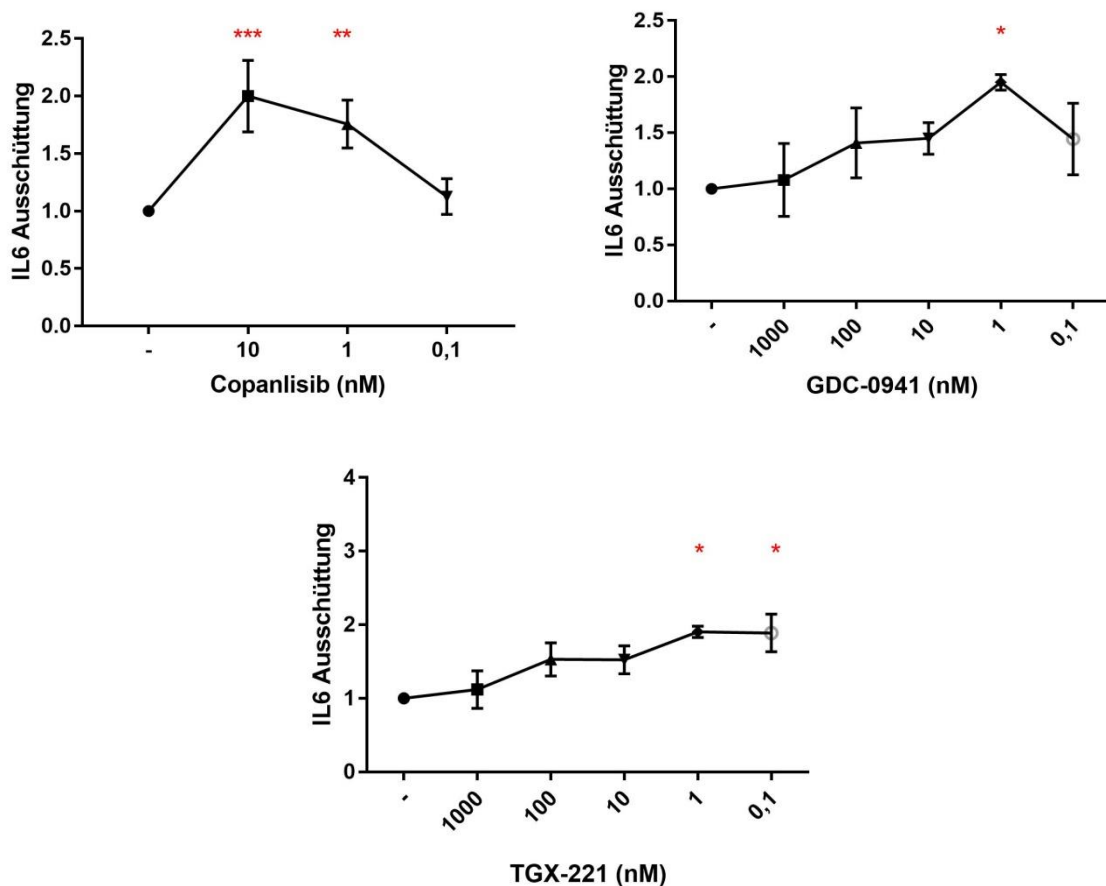


Abbildung 31 Der Pan-Inhibitor Copanlisib, PI3K β Hemmer TGX-221 und GDC-0941 (PI3K δ Inhibitor) erhöhen signifikant die IL-6 Freisetzung nach IC-Stimulation der PMNs. Dargestellt sind die Einzelwerte, Mittelwert und Standardabweichung. Hierfür wurden 2×10^6 /ml isolierte PMNs mit PI3K Inhibitoren 6h mit IC stimuliert und anschließend der Überstand mit den freigesetzten Zytokinen ausgewertet (n=2 bzw. n=3). Die Daten wurden normalisiert, wobei als standardisierter Wert die für 6h IC-Stimulierten+DMSO Neutrophilen gelten. *p<0,03, **p<0,003, ***p<0,0009

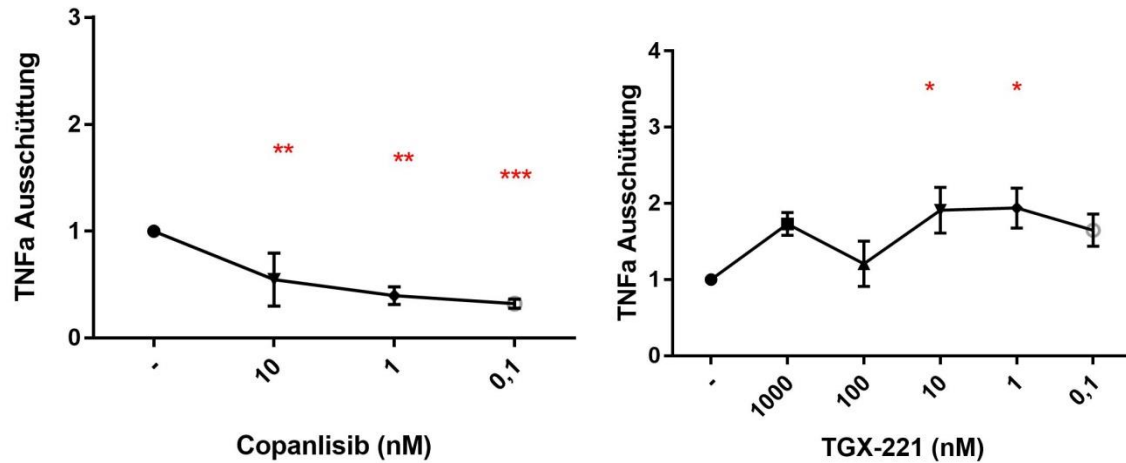


Abbildung 32 Die TNF α Ausschüttung aus IC-stimulierten PMNs wird durch den Pan-Inhibitor Copanlisib vermindert. TGX-221 (PI3K β) jedoch erhöht die TNF α Freisetzung bei der Anwendung von 10nM und 1nM. Dargestellt sind die Einzelwerte, Mittelwert und Standardabweichung. Hierfür wurden wie für die IL-6 Detektion 2×10^6 /ml isolierte PMNs mit PI3K Inhibitoren 6h mit IC stimuliert und anschließend der Überstand mit den freigesetzten Zytokinen mithilfe eines Kits der Firma Biolegend ausgewertet (n=2 bzw. n=3). *p<0,03, **p<0,003, ***p<0,0007

5. Diskussion

EBA ist eine blasenbildende Autoimmunerkrankung, die mit subepidermalen Läsionen einhergeht. Charakteristisch für die Entstehung des inflammatorischen Typs der EBA ist die Bildung von Autoantikörpern gegen COL7 [196]. COL7 ist ein wichtiger Bestandteil der DEJ und trägt zur Stabilität und Integrität der Haut bei.

Diese Arbeit dient, aufbauend auf der Untersuchung der Wirkung und des Zusammenspiels der vier PI3K Isoformen, der weiteren Erforschung der EBA Pathogenese zum deren erweiterten Verständnis. Aufgrund der mangelnden spezifischen therapeutischen Möglichkeiten nicht nur von EBA sondern auch von anderen IC-abhängigen bullösen Autoimmunerkrankungen wurde in dieser Arbeit nach neuen Ansätzen gesucht.

Name	IC50 α	IC50 β	IC50 γ	IC50 δ	Other targets
HS-173	0.8 nM	-	-	-	-
Alpelisib	5.0 nM	-	-	-	-
TGX-221	5.0 μ M	5.0 nM	>10 μ M	0.1 μ M	
AS-604850	4.5 μ M	>20 μ M	0.55 μM	>20 μ M	-
AMG319	33 μ M	2.7 μ M	850 nM	18 nM	-
IC-87114	-	75 μ M	29 μ M	0.5 μM	-
GDC-0941	3.0 nM	33 nM	75 nM	3.0 nM	-
Copanlisib	0.5 nM	3.7 nM	6.4 nM	0.7 nM	-

Tabelle 5 Aufgelistet sind die acht untersuchten PI3K Inhibitoren mit ihrer jeweiligen Affinität zu den verschiedenen PI3K Untereinheiten. Blau hervorgehoben ist die Untereinheit, zu welcher die größte Affinität bei kleinster Konzentration besteht.

5.1. PI3K in neutrophilen Granulozyten

Die Forschung der letzten Jahrzehnte hat mehrere potentielle Zielmoleküle, die sich für die Therapie der EBA eignen könnten, aufgedeckt [71,77,88,96,132,152,153]. Aufbauend auf der Erkenntnis, dass neutrophile Granulozyten eine wichtige Rolle in der Entzündungsreaktion und somit der Blasenbildung bei EBA spielen [34,171], wurde der intrazelluläre Signalweg der aktivierten Neutrophilen in Rahmen dieser Arbeit näher untersucht. Bisher ist die zeitliche und räumliche Funktion der einzelnen PI3K Isoformen noch ungeklärt. Bekannt ist, dass die Effekte vom Stimulus abhängen, mit dem die neutrophilen Granulozyten aktiviert werden, sodass hier hauptsächlich die systematische Untersuchung der Effekte nach Stimulation der PMNs mit IC erforscht wurde.

Obwohl Neutrophile alle vier Unterformen besitzen, sind bisher vor allem zu PI3K β und γ Forschungsergebnisse erzielt worden. PI3K γ spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation von entzündlichen Reaktionen und kardiovaskulärer Homöostase. Durch ihre Aktivierung werde proinflammatorische Moleküle wie IL-8, fMLP, C5a und LTB₄ ausgeschüttet, die wiederum zu einer Anlockung (Chemotaxis) der Neutrophilen, Austritt aus der Blutbahn (Migration) und ROS Produktion führen [26,65,72,148,149]. Außerdem ist seit längerem bekannt, dass PI3 Kinasen, vor allem PI3K β , in Tumorzellen überexprimiert sind, sodass seit neustem mit PI3K Inhibitoren in der Tumorthherapie gearbeitet wird [140,191].

Die Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffmetabolite erfordert hauptsächlich die NADPH Oxidase, die in Neutrophilen Granulozyten vorhanden ist. Zur Aktivierung der Neutrophilen dienen nicht nur das Erkennen von Pathogenen, sondern auch das Binden von Antigenen mittels des Fc-Rezeptors [197]. Die Bedeutung der NADPH Oxidase in der Pathogenese der EBA wurde sowohl in Mäuse ohne funktionstüchtige NADPH Oxidase gezeigt, die nach Antikörpertransfer gegen Kollagen VII keine Blasen bildeten, als auch durch medikamentöse Hemmung der NADPH Oxidase [34]. Die stärkste ROS Minderung wurde durch die kombinierte Hemmung mit PI3K β und δ hervorgerufen [101]. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Daten dieser Arbeit, die signifikante ROS Minderung nach selektiver Hemmung der PI3K β (TGX-221) und PI3K δ (AMG319, IC-87114) als auch nach Hemmung der PI3K $\alpha+\delta$ (GDC-0941) und einen Pan-Inhibitor (Copanlisib) erzeugte.

In dieser Arbeit wurde auch die Migration der Neutrophilen und ihre Vorstufe das *Spreading* näher untersucht und konnte die Beeinflussung der IL-8 stimulierten Neutrophilen Migration durch die PI3K belegt werden. IL-8 ist bewiesenermaßen ein starkes Chemotaxin [89] und aktiviert über den IL-8 Rezeptor alle Untereinheiten der PI3K [178,181]. Die Positivkontrollen ohne die PI3K Inhibitoren erzielten, wie erwartet, die meisten migrierten neutrophilen Granulozyten. IL-8 löst eine Signalkaskade durch Binden an die G-Protein-gekoppelte CXC-Rezeptoren aus [5]. Die IL-8 stimulierte Migration wird durch Inhibition aller PI3K Untereinheiten sowohl einzeln als auch in Kombination gehemmt. Am stärksten ist der Effekt durch alleinige Hemmung der PI3K γ und die kombinierte Unterdrückung aller Untereinheiten durch den Pan-Inhibitor Copanlisib, wohingegen die selektive Hemmung der β Isoform keine signifikanten Effekte hervorbringt.

Diese Ergebnisse stimmen mit frühere Forschungen, die zeigten, dass PI3K γ und δ eine signifikante Rolle in der mit Chemokinen (CXC, TNF- α) induzierten Neutrophilen Migration spielen. Dabei ist die PI3K γ der Neutrophilen und nicht die des Endothels für das Endothelrollen und die Migration verantwortlich. Außerdem ist ein zeitabhängiger Unterschied zu erkennen: Die PI3K γ bestimmt die sofortige Migration, wohingegen die PI3K δ für das verzögerte Migrieren der Neutrophilen wichtig ist. [110]

Ein anderer Versuchsaufbau aus 2015 von Martin et al. untersuchte die Beeinflussung der PI3K auf die Migration der Neutrophilen stimuliert durch CXCL8 oder GM-CSF in einem dreidimensionalen Aufbau [120]. Der gradientielle Versuchsaufbau mit CXCL8 verursachte eine chemotaktische Migration, der nicht-gradientielle Aufbau bewirkt nur chemokinetische Migration. Wohingegen die Stimulation mit GM-CSF nur eine chemokinetische Migration auslöste. Es resultierte darin, dass sowohl die chemotaktische als auch die chemokinetisch stimulierte Migration signifikant durch einen Pan-Inhibitor und die PI3K δ unterdrückt werden konnte. PI3K γ hemmte nur die chemokinetische Migration signifikant, wohingegen die PI3K α nur die chemotaktische Migration beeinflusste. Eine Kombination von PI3K α + δ Inhibition zeigte eine verstärkte Unterdrückung der Migration und lässt darauf schließen, dass beide Kinasen auf unterschiedlichen Wegen wirken. PI3K β wurde nicht näher untersucht, da in den verwendeten Neutrophilen diese selten exprimiert wurde. [120]

Die Intaktheit des Zellverbands und somit entscheidender Faktor für den Zellaustritt in das entzündete Gewebe wird durch die PI3K α reguliert. Die TNF- α induzierte inflammatorische Gefäßpermeabilität wird durch die Hemmung der PI3K α am stärksten beeinflusst [26]. Dies ist hiermit zu erklären, dass die PI3K α für die Phosphorylierung der vaskulär-endothelialen Cadherine zuständig ist, die für die Stärkung des Zellzusammenhalts verantwortlich sind.

Das *Spreading* ist kann als eine Vorstufe der Migration gesehen werden. Es kommt zu einer Zellpolarisierung, die auf Integrin-vermittelter Adhäsion basiert und zu einer Ausbildung von Aktinfilament-haltigen Zellausläufern führt [162]. Es konnte bereits belegt werden, dass die PI3K ein wichtiger Faktor in der Neutrophilen Aktivierungskaskade, die zur Migration führt, darstellt: Sowohl IL-8 als auch C5a triggert durch Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren das Enzym Ras, welches wiederum den MAPK Signalweg stimuliert. Vorher bekannt war, dass eine vollständige Inhibition der PI3K den MAPK Signalweg hemmt. Somit sollte näher untersucht werden, an welchem Punkt diese Hemmung des MAPK Signalweg stattfindet. Hierfür wurde die Wirkung der PI3K auf das Ras Enzym getestet, wobei es in einer Unabhängigkeit resultierte, bzw., die PI3K auch *downstream* des Ras innerhalb des Signalwegs liegen kann. [94] Entscheidend jedoch ist, dass PIP₃, das von der PI3K hergestellt wird, ist verantwortlich für die Ausbildung der Zellpolarität, die entscheidend für die Bewegung der Zelle ist [107,137] und somit das *Spreading* beeinflusst.

Durch Hemmung der α -, β - und δ - Untereinheiten der PI3K, kommt es zu einer verminderten Bildung des PIP₃. PI3K γ jedoch scheint keinen Einfluss auf die Ausbildung der Zellpolarität zu haben. Dies steht im Kontrast zu Ergebnissen anderer Arbeiten, die behaupten, dass die PI3K γ chemotaktisch unabhängig über die Polarisierung und Integrinadhäsion die Neutrophilen Migration (*Spreading*) beeinflusst [51]. Dieser Unterschied könnte an dem Versuchsaufbau liegen, da jener Versuchsaufbau die chemokinetische *Spreading* mittels fMLP darstellt und nicht wie in dieser Arbeit das *Spreading* durch anlegen von Strom simuliert wird. Sowohl PI3K β als auch PI3K δ tragen zum *Spreading* der Neutrophilen bei und vor allem die β Untereinheit ist signifikant nach der Aktivierung der Neutrophilen durch IC [101]. Kulkarni et al. zeigte, dass die Hemmung der PI3K γ und δ weniger Effekt hat als die selektive Hemmung der PI3K β [101].

Eine weitere Fähigkeit der Neutrophilen ist die NETosis. NETs wurden 1996 zuerst als alternativer Zelltod zu Apoptose und Nekrose beschrieben [182]. Sie werden durch aktivierte PMNs abgegeben und dienen nicht nur der Bekämpfung von bakteriellen, viralen oder fungalen Pathogenen [18,21,184], sondern werden auch in bei inflammatorischen Reaktionen auf Autoimmunkrankheiten wie RA, SLE und Vaskulitis [13,106,144] eingesetzt. Durch Zusammenlagerung der einzelnen Bestandteile können diese bis zu einer Größe von 50nm anwachsen und dadurch eine physikalische sowie antibakterielle Barriere gegen die Pathogene bilden [1,18,21,184].

Bisher sind drei Modelle der NETosis bekannt [45]. (a) Die besterforschtete ist die Suizidale NETosis mit einer Dauer von 2-4h. Sie resultiert in Chromatindekondensation und Membranruption, wofür die NADPH notwendig ist und somit ist dieser Prozess ROS abhängig.[108,136] (b) Bei der vitalen NETosis setzen die PMNs NETs bestehend aus nukleärer DNA innerhalb von 5-60min frei, ohne einen Verlust von Nukleushülle oder Plasmamembran. Dieser Vorgang ist ROS und Raf/MERK/ERK unabhängig, weil während dieses Prozesses die nukleäre DNA durch drei morphologische Veränderungen der Neutrophilen ausgestoßen wird: (I) Kernhüllen-Wachstum und Vesikelfreisetzung (II) Nukleäre Dekondensation und (III) Kernhüllenruption [17,47,143]. Die beschriebenen Veränderungen werden durch TLR und C3-Rezeptoren stimuliert [25,36,202]. Zusätzlich sind Interaktionen beschrieben worden, die direkt verschiedene Kinasen aktivieren (ERK, PI3K und SRC Kinasen) [28]. (c) Der letzte Typ, die vitale NETosis, ist wiederum ROS abhängig mit Freisetzung von mitochondrialer DNA und wird nach GM-CSF oder LPS Stimuli innerhalb 15min aktiviert [205].

Jedoch wird zurzeit kontrovers diskutiert, ob die ROS Produktion und NET Bildung mit dem Krankheitsausmaß zusammenhängt. In einigen Arbeiten wurde gezeigt, dass die Blockade der NADPH Oxidase zu einem verminderten Krankheitsverlauf [112] führt, andere wiederum zu einem schwereren Verlauf [27]. Unumstritten ist aber die Notwendigkeit der ROS Produktion sowohl für die PMA als auch die IC-stimulierte NET Bildung der PMNs [9,56,93,141]. Außerdem ist bekannt, dass nicht nur die NADPH Oxidase notwendig für die NET Produktion ist, sondern auch die Gluthationylierung von Aktin und Tubulin zu der Balance beitragen [180]. Die NET Bildung stimuliert durch andere Faktoren wie z.B. IL-8, TNF- α [63,86], können auch

ROS-unabhängig sein [141,204], was die Bedeutung des Umgebungsmilieus in den Fokus der Forschung rückt. Neuste Ergebnisse belegen, dass durch Ansäuerung des Umgebungsmilieus die ROS Produktion gemindert wird und somit auch die NET Bildung verzögert bzw. ausbleibt [10]. Ein saures Milieu liegt auch im Gewebe bei inflammatorischen Prozessen vor und ist somit auch relevant für die Forschung der Autoimmunkrankheiten.

Die Hemmung der PI3K δ Untereinheit resultierte in einer Verminderung der NET Bildung von IC-stimulierten PMNs. Diese Funktion setzte sich auch bei kombinierter Inhibition von PI3K $\alpha+\delta$ durch GDC-0941 bzw. PI3K $\alpha-\delta$ (Copanlisib) fort. Andere Untereinheiten zeigten keine signifikanten Effekte. Die erhöhte NET Freisetzung durch alleinige Inhibition der α Untereinheit sowohl bei IC- als auch PMA-stimulierten PMNs lässt zweifeln, ob die beiden verwendeten Substanzen HS-173 und Alpelisib bei einer Zeitspanne von 4h bzw. 7h toxisch auf die Zellen wirken. Da die Toxizität der verwendeten Substanzen nur für einen Zeitraum von 2h durch eine FACS Analyse untersucht wurden (siehe 4.3.), ist dies bis jetzt nicht auszuschließen.

5.2. PI3K in weiteren Zielzellen

Nicht nur in Neutrophilen ist die PI3K zu finden, auch in Muskelzellen und Adipozyten wird der PI3K Signalweg durch Anstieg der Blutglucose stimuliert und führt zu einer vermehrten Aufnahme von Glucose in Zellen. Auch die Leber- und Pankreaszellen werden angeregt vermehrt Glucose umzubauen bzw. Insulin auszuschütten, womit die Homöostase der Blutglucose gewährleistet ist. In Tumorzellen jedoch wird durch Insulinanstieg der PI3K Signalweg stimuliert, was wiederum zu einem Tumorwachstum führt [73]. Dieses Phänomen stellt einen weiteren Überlegungsansatz dar, um einen spezifischen Inhibitor der PI3K der Tumorzellen zu finden.

In Mikroglia ist die PI3K δ notwendig für die TNF- α Ausschüttung bei Mangel von Glucose und führt somit zu einer Ischämie in diesem unterversorgten Gebiet. Durch Inhibition der PI3K δ kann der zerebrale Schaden vermindert werden [113].

Des Weiteren kann der PI3K/mTOR Signalweg durch TLR der Bakterienmembran aktiviert werden. Dies hat jedoch einen dämpfenden Effekt auf die Entzündungsreaktion. Durch eine anhaltende Therapie muriner und humaner myeloischen Zellen mit PI3K Inhibitoren wurde die Produktion von inflammatorischen Zytokinen angeregt, Il-10 Produktion vermindert und die T-Zell Aktivierung erhöht [192]. Dieser proinflammatorische Effekt des PI3K/mTOR Wegs könnte in der Tumorthherapie von Vorteil sein, da in vielen soliden Tumoren ein proinflammatorisches Milieu mit Tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs) herrscht. Die TAMs besitzen überwiegend die PI3K γ [85]. Eine hohe Expression von PI3K γ in den TAMs entspricht einer verminderten Lebenserwartung der Patienten, sodass die Therapie mit PI3K Inhibitoren dort anzuwenden wäre.

Auch in B-Zellen ist die PI3K ein wichtiger Bestandteil. Innerhalb des B-Zelle-Rezeptors befindet sich die Tyrosinkinase BTK und ein Dimer aus PI3K α und δ , die nur im Zusammenspiel die maximale Signalstärke und somit die maximale Ca²⁺-Mobilisierung, Erk-Phosphorylierung, etc. hervorrufen. Das bedeutet, dass die Inhibierung nur eines Bestandteils dieses Apparates zu einer verminderten Aktivität der B-Zelle führt [15,38]. Ein ähnliches Phänomen liegt bei den T-Zell-Rezeptoren vor, die sich aus einer PI3K δ und einer TEC oder ITK Kinase zusammensetzen [128,176], jedoch ist noch nicht geklärt, ob die Aktivierung der PI3K δ notwendig ist für die Funktion der TEC/ ITK Kinase oder vice versa.

Der PI3K Signalweg spielt außerdem eine Rolle bei der weiteren Differenzierung der B- und T-Zellen [55]. Die Beeinträchtigung der T-Zelldifferenzierung zu CD4+ [139], CD8+ [119] oder T_{regs} [2] wurde am Beispiel der Hemmung der δ Untereinheit belegt.

5.3. Beteiligung der PI3K bei der Pathogenese anderer Erkrankungen

Es sind sowohl aktivierende als auch inaktivierende Mutation des PI3K Gens bekannt. Aktivierende Mutationen (PIK3CA, AKT1 *and* mTOR) wurden bei Tumorerkrankungen [24,155] und auch bei primären Immunerkrankungen (z.B. PASLI) [68] gefunden. Mutationen im PIK3CA Gen sind bei circa 30% der Brust-, Colon-, Endometrium und Prostatatumoren zu finden [207].

Eine verminderte PI3K Aktivität hingegen (Mutation im PTEN Gen) [131] ist vor allem bei Entwicklungsstörungen wie dem SHORT Syndrom anzutreffen [6,75].

Auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer und Morbus Parkinson spielt der PI3K/AKT Signalweg in neutrophilen Granulozyten eine entscheidende Rolle für die Neuronenschädigung. Die Signalkaskade wird unter anderem durch Insulin und *Insulin like Growth Factor 1* (IGF 1) Produktion aktiviert und führt physiologisch zu einer Neuroprotektion. Ein Ungleichgewicht des PI3K/AKT Signalwegs jedoch führt zu Neuronenschäden [121,200].

5.4. Testung und klinische Phase der PI3K Inhibitoren

Idelalisib (PI3K δ) wurde als erster PI3K Inhibitor von der *Food and Drug Administration* (FDA) 2014 zur Therapie von B-Zell Lymphomen zugelassen [201]. Die Wirkung von Idelalisib in den Patienten war anders erwartet, da Idelalisib die mutierten B-Zellen aus ihren Nischen in die Peripherie herauslockt und vorerst eine Lymphozytose auslöst, anstatt wie die PI3K α Inhibitoren direkt apoptotisch auf die Tumorzellen zu wirken. In Kombination mit dem CD20-Antikörper Rituximab werden die B-Zellen erkannt und in den Zelltod getrieben [54]. Da diese Therapie zu einigen schweren Infektionen und Leberenzym erhöhungen führte, wird diese nur noch in schweren Krankheitsfällen angewendet [7].

In der Brustkrebstherapie werden zurzeit PI3K Inhibitoren als Therapeutika in Kombination mit Hormonrezeptorinhibitoren (Tamoxifen etc.) eingesetzt, da diese die Resistenzmechanismen der Tumorzellen vermindern [32,131]. Beispielsweise wird der PI3K α Inhibitor Alpelisib in Kombination mit Fulvestrant bei ER positiven Brustkrebspatienten eingesetzt und zeigt gute Resultate in der Phase I Testung [142].

Ein Phase IIa und mehrere Phase III Studien werden mit dem Pan-Inhibitor Copanlisib bei Non-Hodgkin Lymphom (NHL) and chronischer lymphatische Leukämie (CLL) [48] durchgeführt. Zusätzlich wurde noch auf die erfolgversprechendste Anwendung von Copanlisib getestet. Dies resultierte darin, dass die i.v. Applikation Medikaments bei Mäusen besser wirkte, indem man es ihnen intermittierend (dreimal/Woche) anstatt täglich verabreichte [111].

Eine neue Strategie stellt der Transport durch Nanopartikel dar, die mit dem Medikament beladen sind und tumorspezifische Rezeptoren aufsuchen, sodass das Wirtsgewebe weniger geschädigt wird [129].

5.5. Beeinflussung der Zytokinexpression

Es ist bekannt, dass einige Zytokine wie IL-1, IL-6 und *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) zur Blasenbildung bei EBA beitragen [153,154,195], sodass zuerst der Effekt der IC-Stimulation der PMNs auf deren Zytokinausschüttung untersucht wurde. Nur bei der Freisetzung von IL-6 und TNF- α zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den stimulierten und unstimulierten PMNs (Abb. 31). Außerdem wurde bei einigen durch alleinige Stimulation durch das Antigen hCOL7 eine erhöhte Freisetzung des jeweiligen Zytokins bemerkt. Dies könnte auf eine mögliche direkte Bindung von COL7 an aktivierende Rezeptoren in Neutrophilen hinweisen.

Aufgrund dessen wurde der Effekt der PI3K Inhibitoren auf die IL-6 und TNF- α Produktion der PMNs näher untersucht. Die IL-6 Ausschüttung ist signifikant durch die Hemmung der PI3K β , $\alpha+\delta$ und $\alpha-\delta$ erhöht worden (Abb. 32). Im Gegensatz dazu bewirkte die alleinige Inhibition der PI3K β einen Anstieg von TNF- α , die Inhibierung aller Subklassen ($\alpha-\delta$) jedoch eine Reduktion (Abb. 33).

Die Serumkonzentration von IL-6 ist nachweislich in EBA Patienten erhöht [161]. In experimentellen IL-6 knock-out Mäusen, jedoch treten schwerere Phänotypen der EBA verglichen mit den Kontrollen auf. Auch die Applikation von rekombinantem IL-6 führte zu einer dosisabhängigen Reduktion der experimentellen EBA, sodass man sagen kann, dass IL-6 als antiinflammatorisches Zytokin in experimentellen EBA Mäusen fungiert [154] und könnte somit protektiv bei der EBA Therapie wirken. Dagegen wirkt IL-6 in anderen entzündlichen Autoimmunerkrankungen proinflammatorisch in der Pathogenese wie der RA [74] und Psoriasis [61]. Tocilizumab z.B. ist ein Antikörper gegen den IL-6-Rezeptor und wird schon zur Therapie bei RA [135].

Diese Maßnahmen sollten aber mit Vorsicht angewendet werden, da IL-6, wie erwähnt, auch antiinflammatorische Funktionen [60,81,145,199] in IC-abhängiger

Gewebezerstörung besitzt und durch Hemmung der IL-6 Produktion es eventuell Krankheitsverlauf fördernd bei EBA und anderen bullösen Autoimmunerkrankungen (z.B. BP) wirkt [115].

Zu den Schlüsselfunktionen des Zytokins TNF- α zählen neben der Induktion der Tumornekrose auch die Regulation von Entzündungsreaktionen [70]. Es ist normalerweise bei Entzündungen und Infektionen im Serum erhöht und die Konzentration korreliert mit der Krankheitsstärke [104,190]. Außerdem ist belegt worden, dass die Blockade von TNF- α die Inflammation bei Autoimmunkrankheiten wie RA, Psoriasis Arthritis und Morbus Crohn eine gute Therapiemöglichkeit darstellt [3,11,130,179]. Im Hinblick auf dermatologische Erkrankungen ist TNF- α in chronischen Wunden aufgetreten [39], konnte aber auch in erhöhter Konzentration in der Haut von Mäusen mit experimenteller EBA und humanen EBA Patienten nachgewiesen werden [70].

TNF- α spielt auch eine Rolle bei der Chemotaxis von Neutrophilen. Es trägt sowohl als Chemokin zur Anlockung der Neutrophilen als auch zur vermehrten Expression von Integrinen bei, die notwendig für das Endothelrollen und anschließende Austreten aus der Blutbahn sind [52,173]. Daneben wird TNF- α durch aktivierte Neutrophile vermehrt ausgeschüttet und wirkt agonistisch und antagonistisch auf IL-6 [138].

Da der Anstieg der TNF- α Expression in der Haut oder im Serum bei bullösen Autoimmunerkrankungen schon bewiesen wurde [59], sind in ein paar Fällen bei Blockade von TNF- α Remissionen von Pemphigoid [82,90] bzw. Pemphigus Erkrankungen [12,80,146] beschrieben worden. Zusätzlich führte die Hemmung von TNF- α in anti-mCOL7C IgG-geimpften Mäusen zu einem milderem Krankheitsverlauf der EBA aber auch zu einer Verbesserung der Symptome bei schon ausgebrochener Krankheit [70]. Spezifisch die PI3K δ wird durch TNF- α verstärkt [194].

Die Beeinflussung anderer proinflammatorische Zytokinausschüttung durch Hemmung des PI3K/AKT-Signalwegs ist bei T-Zellen bekannt [33]. Durch die Unterdrückung überwiegend von PI3K δ durch den Inhibitor ZSTK474 sind die proinflammatorischen Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IFN- γ , and TNF- α signifikant vermindert

worden. Ob dieser Verminderung der Zytokinfreisetzung auch auf andere Zellen übertragbar ist, bleibt bisher unerforscht.

5.6. Limitationen der Versuchsreihe

Eine Limitation der Versuchsreihe stellt die Probandenauswahl dar, da diese vor Blutentnahme nur anamnestisch auf Erkrankungen kontrolliert wurden, die die Zellzusammensetzung, Zellfunktion, etc. verändern.

Auch ist die Gruppengröße bei den verschiedenen Versuchen unterschiedliche. Bei der Legendplex Zytokinexpression variiert die N-Zahl zwischen den getesteten PI3K Inhibitoren.

Wie bereits erwähnt, wurde die Toxizität der verwendeten Substanzen nur innerhalb eines Zeitraums von 2h durch eine FACS Analyse untersucht wurden (siehe 4.3.), daher ist bis jetzt die langfristige Toxizität nicht auszuschließen.

Die untersuchten Inhibitoren selbst haben eine Spezifität für PI3K Untereinheiten, jedoch haben nicht alle eine Affinität nur zu einer spezifischen Untereinheit, sodass man eventuell die Wirkungen noch tiefer untersuchen sollte. Zusätzlich ist nicht bei allen Auswertungen auf den IC50 Bereich der untersuchten Substanzen geachtet worden, sodass einige Ergebnisse die Wirkung außerhalb der IC50 inkludieren.

In dieser Untersuchung wurden nur *in vitro* Versuche durchgeführt, sodass eine *in vivo* Validierung im Anschluss folgen sollte. Hier liegt das Problem bei der unterschiedlichen Bedeutung der PI3K Untereinheiten zwischen Maus und Mensch [95].

5.7. Ausblick

Die Entschlüsselung der Signalwege kann Beitrag leisten zum Verständnis der Pathogenese inflammatorischer Autoimmunkrankheiten, wie EBA aber auch anderen neutrophilen-abhängiger Erkrankungen. Es könnten sich spezifischere und somit nebenwirkungsärmere Therapiemöglichkeiten eröffnen. Vorerst müssen die

PI3K Inhibitoren eine Validierung im Tiermodell der EBA durchlaufen, welche zurzeit durchgeführt wird. Im Anschluss ist eine Untersuchung der Expression in Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und der Haut der Patienten notwendig.

Am vielversprechendsten sind die Pan-Inhibitoren, da sie das breiteste therapeutische Feld abdecken. Zugleich haben sie jedoch den Nachteil, dass auch die Nebenwirkungen im Gegensatz zu den spezifischeren Inhibitoren größer sind. Da wahrscheinlich eine sehr hohe Dosis angestrebt werden muss, um die Tumorzellen eindämmen zu können, werden die physiologischen Stoffwechselwege, wie die PI3K in den Leberzellen, auch beeinträchtigt werden und zu Hyperglykämien führen [183]. Bei Therapie mit spezifischeren PI3K Inhibitoren hingegen wurden Resistenzmechanismen der Tumorzellen durch Mutationswechsel beobachtet, sodass die Therapie bisher unzureichend wirksam war [160].

6. Zusammenfassung

Dysregulierte neutrophile Granulozyten sind oft begleitend in entzündlichen Prozessen bei Autoimmunkrankheiten wie EBA vorhanden. Vorangehende Untersuchungen haben gezeigt, dass die PI3K ein Schlüsselmolekül in der Signalkaskade der Neutrophilen ist. Zurzeit sind vier Isoformen der PI3K bekannt, die α -, β -, γ - und δ -Isoformen, die sich jeweils in ihrer Funktion und Gewebeexpression unterscheiden. Ziel der Arbeit war es, die Rolle dieser PI3K Untereinheiten in den verschiedenen Wirkmechanismen der Neutrophilen zu untersuchen. Um den Einfluss der unterschiedlichen Aktivität der einzelnen Isoformen auf die entsprechenden Eigenschaften der PMNs und ihre Signalwege zu untersuchen, wurden acht verschiedene PI3K Inhibitoren in jeweils fünf unterschiedlichen Konzentrationen untersucht, die in ihrer Affinität zu den PI3K Isoformen variieren. Folgende Effekte der Inhibitoren auf die Aktivierung von PMs wurden analysiert: (i) die Ausschüttung von proteolytischen und zytotoxischen Molekülen wie reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und (ii) proinflammatorischen Zytokinen, (iii) die Produktion von NETs, (iv) die Aktivierung durch Protease-induziertes Spalten (Shedding) von CD62L, (v) die Anheftung und Ausbreitung an vorbeschichteten Oberflächen (Spreading), (vi) die Chemotaxis nach IL-8 Stimulierung und (vii) die möglichen toxischen Effekte der PI3K Inhibitoren. Die Ergebnisse legen nahe, dass die PI3K Isoformen für unterschiedliche Zellfunktionen neutrophiler Granulozyten verantwortlich sind und dabei als spezifisches Netzwerk über nachgeschaltete Signalwege zur Koordination der unterschiedlichen Eigenschaften PMNs beitragen. Die Untersuchung der Ausschüttung der ROS zeigte, dass die PI3K Isoformen β und δ konzentrationsabhängig die ROS-Freisetzung von Immunkomplex (IC)-aktivierten PMNs signifikant verringern. Einige der getesteten Substanzen beeinflussten die Freisetzung von Zytokinen, vor allem von IL-6 und TNF- α . Hier wurde durch die Inhibition der PI3K β und δ eine signifikant vermehrte Konzentration von IL-6 im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen. Im Gegensatz zur verminderten Freisetzung von TNF- α nach totaler Inhibierung der PI3 Kinase wird sie nach der alleinigen Hemmung der PI3K β -Untereinheit verstärkt ausgeschüttet. Die Produktion der NETs nach siebenstündiger IC-Stimulation der PMNs war nach Inhibierung der α Untereinheit vermehrt, bei Hemmung der PI3K δ jedoch vermindert. Nach vierstündiger PMA-Stimulation von PMNs und Hemmung

der PI3K α zeigte sich ein steigernder Effekt auf deren NET Formation. Des Weiteren beeinflusste die Hemmung der PI3K α , γ und δ Untereinheiten das neutrophile Spreading. Dieses Ausbreiten der PMNs auf Oberflächen geht der Chemotaxis voraus, weshalb die Untersuchung der IL-8-induzierten Chemotaxis der PMNs ebenfalls ein prominentes Ergebnis zeigte. Nach Inhibierung der PI3K α , γ und δ verringerte sich signifikant die neutrophile Chemotaxis, während eine Hemmung der β -Untereinheit keinen signifikanten Effekt hervorbrachte. Die getesteten Substanzen zeigten in den verwendeten Konzentrationen keinen signifikanten Effekt auf das Überleben oder die zelluläre Aktivierung der PMNs. Auf Grundlage dieser Ergebnisse könnten weitere Untersuchungen, möglicherweise in vivo im Mausmodell der EBA, zur Entschlüsselung der Signalwege in neutrophilen Granulozyten durchgeführt und schließlich neue therapeutische Ansätze für die Behandlung inflammatorischer Autoimmunerkrankungen wie EBA erarbeitet werden.

7. Literaturverzeichnis

- [1] D.S. Abi Abdallah, C. Lin, C.J. Ball, M.R. King, G.E. Duhamel, E.Y. Denkers, *Toxoplasma gondii* Triggers Release of Human and Mouse Neutrophil Extracellular Traps, *Infect. Immun.* 80 (2012) 768–777.
- [2] K. Ali, D.R. Soond, R. Piñeiro, T. Hagemann, W. Pearce, E.L. Lim, H. Bouabe, C.L. Scudamore, T. Hancox, H. Maecker, L. Friedman, M. Turner, K. Okkenhaug, B. Vanhaesebroeck, Inactivation of PI(3)K p110 δ breaks regulatory T-cell-mediated immune tolerance to cancer, *Nature*. 510 (2014) 407–411.
- [3] A. Armuzzi, P. Lionetti, C. Blandizzi, R. Caporali, S. Chimenti, L. Cimino, P. Gionchetti, G. Girolimoni, G. Lapadula, A. Marchesoni, A. Marcellusi, F.S. Mennini, C. Salvarani, R. Cimaz, Anti-TNF Agents as Therapeutic Choice in Immune-Mediated Inflammatory Diseases: Focus on Adalimumab, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 27 (2014) 11–32.
- [4] J.M. Backer, The intricate regulation and complex functions of the Class III phosphoinositide 3-kinase Vps34, *Biochem. J.* 473 (2016) 2251–2271.
- [5] M. Baggiolini, I. Clark-Lewis, Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine, *FEBS Lett.* 307 (1992) 97–101.
- [6] C. Bárcena, V. Quesada, A. De Sandre-Giovannoli, D.A. Puente, J. Fernández-Toral, S. Sigaudy, A. Baban, N. Lévy, G. Velasco, C. López-Otín, Exome sequencing identifies a novel mutation in PIK3R1 as the cause of SHORT syndrome, *BMC Med. Genet.* 15 (2014).
- [7] P.M. Barr, G.B. Saylors, S.E. Spurgeon, B.D. Cheson, D.R. Greenwald, S.M. O'Brien, A.K.D. Liem, R.E. McIntyre, A. Joshi, E. Abella-Dominicis, M.J. Hawkins, A. Reddy, J. Di Paolo, H. Lee, J. He, J. Hu, L.K. Dreiling, J.W. Friedberg, Phase 2 study of idelalisib and entospletinib: pneumonitis limits combination therapy in relapsed refractory CLL and NHL, *Blood*. 127 (2016) 2411–2415.
- [8] S. Bastuji-Garin, P. Joly, P. Lemordant, A. Sparsa, C. Bedane, E. Delaporte, J.-C. Roujeau, P. Bernard, J.-C. Guillaume, S. Ingen-Housz-Oro, H. Maillard, C. Pauwels, C. Picard-Dahan, Y. Dutronc, M.-A. Richard, on behalf of the French Study Group for Bullous Diseases, Risk Factors for Bullous

- Pemphigoid in the Elderly: A Prospective Case–Control Study, *J. Invest. Dermatol.* 131 (2011) 637–643.
- [9] M. Behnen, C. Leschczyk, S. Möller, T. Batel, M. Klinger, W. Solbach, T. Laskay, Immobilized Immune Complexes Induce Neutrophil Extracellular Trap Release by Human Neutrophil Granulocytes via FcγRIIIB and Mac-1, *J. Immunol.* 193 (2014) 1954–1965.
 - [10] M. Behnen, S. Möller, A. Brozek, M. Klinger, T. Laskay, Extracellular Acidification Inhibits the ROS-Dependent Formation of Neutrophil Extracellular Traps, *Front. Immunol.* 8 (2017).
 - [11] S. Ben-Horin, U. Kopylov, Y. Chowers, Optimizing anti-TNF treatments in inflammatory bowel disease, *Autoimmun. Rev.* 13 (2014) 24–30.
 - [12] B. Berookhim, H.D. Fischer, J.M. Weinberg, Treatment of recalcitrant pemphigus vulgaris with the tumor necrosis factor alpha antagonist etanercept, *Cutis.* 74 (2004) 245–247.
 - [13] J.-M. Berthelot, B. Le Goff, A. Neel, Y. Maugars, M. Hamidou, NETosis: At the crossroads of rheumatoid arthritis, lupus, and vasculitis, *Joint Bone Spine.* 84 (2017) 255–262.
 - [14] K. Bieber, S. Sun, N. Ishii, M. Kasperkiewicz, E. Schmidt, M. Hirose, J. Westermann, X. Yu, D. Zillikens, R.J. Ludwig, Animal models for autoimmune bullous dermatoses: Animal models for autoimmune skin blistering diseases, *Exp. Dermatol.* 19 (2010) 2–11.
 - [15] K. Bojarczuk, B.K. Sasi, S. Gobessi, I. Innocenti, G. Pozzato, L. Laurenti, D.G. Efremov, BCR signaling inhibitors differ in their ability to overcome Mcl-1-mediated resistance of CLL B cells to ABT-199, *Blood.* 127 (2016) 3192–3201.
 - [16] K.B. Boyle, D. Gyori, A. Sindrilaru, K. Scharffetter-Kochanek, P.R. Taylor, A. Mocsai, L.R. Stephens, P.T. Hawkins, Class IA Phosphoinositide 3-Kinase and Regulate Neutrophil Oxidase Activation in Response to *Aspergillus fumigatus* Hyphae, *J. Immunol.* 186 (2011) 2978–2989.
 - [17] K. Branitzki-Heinemann, H. Möllerherm, L. Völlger, D.M. Husein, N. de Buhr, S. Blodkamp, F. Reuner, G. Brogden, H.Y. Naim, M. von Köckritz-Blickwede, Formation of Neutrophil Extracellular Traps under Low Oxygen Level, *Front. Immunol.* 7 (2016).

- [18] V. Brinkmann, Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria, *Science*. 303 (2004) 1532–1535.
- [19] V. Brinkmann, C. Goosmann, L.I. Kühn, A. Zychlinsky, Automatic quantification of in vitro NET formation, *Front. Immunol.* 3 (2013).
- [20] L.A. Brunsting, H.O. Perry, Benign pemphigoid; a report of seven cases with chronic, scarring, herpetiform plaques about the head and neck, *AMA Arch. Dermatol.* 75 (1957) 489–501.
- [21] J.T. Buchanan, A.J. Simpson, R.K. Aziz, G.Y. Liu, S.A. Kristian, M. Kotb, J. Feramisco, V. Nizet, DNase Expression Allows the Pathogen Group A Streptococcus to Escape Killing in Neutrophil Extracellular Traps, *Curr. Biol.* 16 (2006) 396–400.
- [22] J.J.A. Buijsrogge, G.F.H. Diercks, H.H. Pas, M.F. Jonkman, The many faces of epidermolysis bullosa acquisita after serration pattern analysis by direct immunofluorescence microscopy: Serration pattern analysis of EBA, *Br. J. Dermatol.* 165 (2011) 92–98.
- [23] W. Burgdorf, O. Braun-Falco, eds., *Braun-Falco's dermatology*, 3. ed, Springer, Heidelberg, 2009.
- [24] J.E. Burke, O. Perisic, G.R. Masson, O. Vadas, R.L. Williams, Oncogenic mutations mimic and enhance dynamic events in the natural activation of phosphoinositide 3-kinase p110 α (PIK3CA), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 15259–15264.
- [25] A.S. Byrd, X.M. O'Brien, C.M. Johnson, L.M. Lavigne, J.S. Reichner, An Extracellular Matrix-Based Mechanism of Rapid Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to *Candida albicans*, *J. Immunol.* 190 (2013) 4136–4148.
- [26] R.J. Cain, B. Vanhaesebroeck, A.J. Ridley, Different PI 3-kinase inhibitors have distinct effects on endothelial permeability and leukocyte transmigration, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44 (2012) 1929–1936.
- [27] A.M. Campbell, M. Kashgarian, M.J. Shlomchik, NADPH Oxidase Inhibits the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus, *Sci. Transl. Med.* 4 (2012) 157ra141-157ra141.
- [28] A. Carestia, T. Kaufman, L. Rivadeneyra, V.I. Landoni, R.G. Pozner, S. Negrotto, L.P. D'Atri, R.M. Gómez, M. Schattner, Mediators and molecular

- pathways involved in the regulation of neutrophil extracellular trap formation mediated by activated platelets, *J. Leukoc. Biol.* 99 (2016) 153–162.
- [29] E. Castellano, C. Sheridan, M.Z. Thin, E. Nye, B. Spencer-Dene, M.E. Diefenbacher, C. Moore, M.S. Kumar, M.M. Murillo, E. Grönroos, F. Lassailly, G. Stamp, J. Downward, Requirement for interaction of PI3-kinase p110 α with RAS in lung tumor maintenance, *Cancer Cell.* 24 (2013) 617–630.
- [30] L.S. Chan, A.R. Ahmed, G.J. Anhalt, W. Bernauer, K.D. Cooper, M.J. Elder, J.-D. Fine, C.S. Foster, R. Ghohestani, T. Hashimoto, T. Hoang-Xuan, G. Kirtschig, N.J. Korman, S. Lightman, F. Lozada-Nur, M.P. Marinkovich, B.J. Mondino, C. Prost-Squarcioni, R.S. Rogers, J.F. Setterfield, D.P. West, F. Wojnarowska, D.T. Woodley, K.B. Yancey, D. Zillikens, J.J. Zone, The first international consensus on mucous membrane pemphigoid: definition, diagnostic criteria, pathogenic factors, medical treatment, and prognostic indicators, *Arch. Dermatol.* 138 (2002) 370–379.
- [31] S.-N. Chee, D.F. Murrell, The Use of Intravenous Immunoglobulin in Autoimmune Bullous Diseases, *Dermatol. Clin.* 29 (2011) 565–570.
- [32] I.-C. Chen, L.-P. Hsiao, I.-W. Huang, H.-C. Yu, L.-C. Yeh, C.-H. Lin, T. Wei-Wu Chen, A.-L. Cheng, Y.-S. Lu, Phosphatidylinositol-3 Kinase Inhibitors, Buparlisib and Alpelisib, Sensitize Estrogen Receptor-positive Breast Cancer Cells to Tamoxifen, *Sci. Rep.* 7 (2017).
- [33] X. Chen, Y. Guo, R. Han, H. Liu, Y. Ding, Y. Shi, D. Kong, X. Ma, Class I PI3K inhibitor ZSTK474 attenuates experimental autoimmune neuritis by decreasing the frequency of Th1/Th17 cells and reducing the production of proinflammatory cytokines, *Cell. Immunol.* (2018).
- [34] Chiriac MT, Roesler J, Sindrilaru A et al., NADPH oxidase is required for neutrophil-dependent autoantibody-induced tissue damage MT Chiriac, J Roesler, A Sindrilaru, K Scharffetter-Kochanek, D Zillikens, C Sitaru. *J Pathol* 2007; 212:56–65, *J. Pathol.* 212 (2007) i–i.
- [35] A.M. Christiano, D.S. Greenspan, S. Lee, J. Uitto, Cloning of human type VII collagen. Complete primary sequence of the alpha 1(VII) chain and identification of intragenic polymorphisms, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 20256–20262.
- [36] S.R. Clark, A.C. Ma, S.A. Tavener, B. McDonald, Z. Goodarzi, M.M. Kelly, K.D. Patel, S. Chakrabarti, E. McAvoy, G.D. Sinclair, E.M. Keys, E. Allen-

- Vercoe, R. DeVinney, C.J. Doig, F.H.Y. Green, P. Kubes, Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood, *Nat. Med.* 13 (2007) 463–469.
- [37] M. Collin, M. Ehlers, The carbohydrate switch between pathogenic and immunosuppressive antigen-specific antibodies, *Exp. Dermatol.* 22 (2013) 511–514.
- [38] M. Compagno, Q. Wang, C. Pighi, T.-C. Cheong, F.-L. Meng, T. Poggio, L.-S. Yeap, E. Karaca, R.B. Blasco, F. Langellotto, C. Ambrogio, C. Voena, A. Wiestner, S.N. Kasar, J.R. Brown, J. Sun, C.J. Wu, M. Gostissa, F.W. Alt, R. Chiarle, Phosphatidylinositol 3-kinase δ blockade increases genomic instability in B cells, *Nature*. 542 (2017) 489–493.
- [39] A.J. Cowin, N. Hatzirodos, J. Rigden, R. Fitridge, D.A. Belford, Etanercept decreases tumor necrosis factor- α activity in chronic wound fluid, *Wound Repair Regen.* 14 (2006) 421–426.
- [40] T. Crabbe, M.J. Welham, S.G. Ward, The PI3K inhibitor arsenal: choose your weapon!, *Trends Biochem. Sci.* 32 (2007) 450–456.
- [41] K. Csorba, M.T. Chiriac, F. Florea, M.G. Ghinia, E. Licarete, A. Rados, A. Sas, V. Vuta, C. Sitaru, Blister-inducing antibodies target multiple epitopes on collagen VII in mice, *J. Cell. Mol. Med.* 18 (2014) 1727–1739.
- [42] M.G. Dahl, Epidermolysis bullosa acquisita--a sign of cicatricial pemphigoid?, *Br. J. Dermatol.* 101 (1979) 475–484.
- [43] B.S. Daniel, D.F. Murrell, P. Joly, Rituximab and its Use in Autoimmune Bullous Disorders, *Dermatol. Clin.* 29 (2011) 571–575.
- [44] L. D'Auria, M. Pietravalle, P. Cordiali-Fei, F. Ameglio, Increased tryptase and myeloperoxidase levels in blister fluids of patients with bullous pemphigoid: correlations with cytokines, adhesion molecules and anti-basement membrane zone antibodies, *Exp. Dermatol.* 9 (2000) 131–137.
- [45] V. Delgado-Rizo, M.A. Martínez-Guzmán, L. Iñiguez-Gutierrez, A. García-Orozco, A. Alvarado-Navarro, M. Fafutis-Morris, Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview, *Front. Immunol.* 8 (2017).
- [46] L.A. Diaz, H. Ratrie, W.S. Saunders, S. Futamura, H.L. Squiquera, G.J. Anhalt, G.J. Giudice, Isolation of a human epidermal cDNA corresponding to the 180-kD autoantigen recognized by bullous pemphigoid and herpes

- gestationis sera. Immunolocalization of this protein to the hemidesmosome., J. Clin. Invest. 86 (1990) 1088–1094.
- [47] D.N. Douda, M.A. Khan, H. Grasemann, N. Palaniyar, SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx, Proc. Natl. Acad. Sci. 112 (2015) 2817–2822.
 - [48] M. Dreyling, A. Santoro, L. Mollica, S. Leppä, G.A. Follows, G. Lenz, W.S. Kim, A. Nagler, P. Panayiotidis, J. Demeter, M. Özcan, M. Kosinova, K. Bouabdallah, F. Morschhauser, D.A. Stevens, D. Trevarthen, M. Giurescu, L. Cupit, L. Liu, K. Köchert, H. Seidel, C. Peña, S. Yin, F. Hiemeyer, J. Garcia-Vargas, B.H. Childs, P.L. Zinzani, Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibition by Copanlisib in Relapsed or Refractory Indolent Lymphoma, J. Clin. Oncol. 35 (2017) 3898–3905.
 - [49] L. Engineer, E.C. Dow, I.M. Braverman, A.R. Ahmed, Epidermolysis bullosa acquisita and multiple myeloma, J. Am. Acad. Dermatol. 47 (2002) 943–946.
 - [50] C. Esche, C. Stellato, L.A. Beck, Chemokines: Key Players in Innate and Adaptive Immunity, J. Invest. Dermatol. 125 (2005) 615–628.
 - [51] G.J. Ferguson, L. Milne, S. Kulkarni, T. Sasaki, S. Walker, S. Andrews, T. Crabbe, P. Finan, G. Jones, S. Jackson, M. Camps, C. Rommel, M. Wymann, E. Hirsch, P. Hawkins, L. Stephens, PI(3)K has an important context-dependent role in neutrophil chemokinesis, Nat. Cell Biol. 9 (2007) 86–91.
 - [52] M. Finsterbusch, M.-B. Voisin, M. Beyrau, T.J. Williams, S. Nourshargh, Neutrophils recruited by chemoattractants in vivo induce microvascular plasma protein leakage through secretion of TNF, J. Exp. Med. 211 (2014) 1307–1314.
 - [53] R. Fritsch, I. de Krijger, K. Fritsch, R. George, B. Reason, M.S. Kumar, M. Diefenbacher, G. Stamp, J. Downward, RAS and RHO families of GTPases directly regulate distinct phosphoinositide 3-kinase isoforms, Cell. 153 (2013) 1050–1063.
 - [54] D.A. Fruman, L.C. Cantley, Idelalisib — A PI3K δ Inhibitor for B-Cell Cancers, N. Engl. J. Med. 370 (2014) 1061–1062.
 - [55] D.A. Fruman, H. Chiu, B.D. Hopkins, S. Bagrodia, L.C. Cantley, R.T. Abraham, The PI3K Pathway in Human Disease, Cell. 170 (2017) 605–635.

- [56] T.A. Fuchs, U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann, A. Zychlinsky, Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps, *J. Cell Biol.* 176 (2007) 231–241.
- [57] W.R. Gammon, R.A. Briggaman, C.E. Wheeler, Epidermolysis bullosa acquisita presenting as an inflammatory bullous disease, *J. Am. Acad. Dermatol.* 7 (1982) 382–387.
- [58] W.R. Gammon, R.A. Briggaman, D.T. Woodley, P.W. Heald, C.E. Wheeler, Epidermolysis bullosa acquisita--a pemphigoid-like disease, *J. Am. Acad. Dermatol.* 11 (1984) 820–832.
- [59] S.A. Grando, B.T. Glukhenky, G.N. Drannik, E.V. Epshtein, A.P. Kostromin, T.A. Korostash, Mediators of inflammation in blister fluids from patients with pemphigus vulgaris and bullous pemphigoid, *Arch. Dermatol.* 125 (1989) 925–930.
- [60] S. Grivennikov, E. Karin, J. Terzic, D. Mucida, G.-Y. Yu, S. Vallabhapurapu, J. Scheller, S. Rose-John, H. Cheroutre, L. Eckmann, M. Karin, IL-6 and Stat3 Are Required for Survival of Intestinal Epithelial Cells and Development of Colitis-Associated Cancer, *Cancer Cell.* 15 (2009) 103–113.
- [61] R.M. Grossman, J. Krueger, D. Yourish, A. Granelli-Piperno, D.P. Murphy, L.T. May, T.S. Kupper, P.B. Sehgal, A.B. Gottlieb, Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86 (1989) 6367–6371.
- [62] H. Guo, P. German, S. Bai, S. Barnes, W. Guo, X. Qi, H. Lou, J. Liang, E. Jonasch, G.B. Mills, Z. Ding, The PI3K/AKT Pathway and Renal Cell Carcinoma, *J. Genet. Genomics.* 42 (2015) 343–353.
- [63] A.K. Gupta, P. Hasler, W. Holzgreve, S. Gebhardt, S. Hahn, Induction of Neutrophil Extracellular DNA Lattices by Placental Microparticles and IL-8 and Their Presence in Preeclampsia, *Hum. Immunol.* 66 (2005) 1146–1154.
- [64] C.M. Hammers, K. Bieber, K. Kalies, D. Banczyk, C.T. Ellebrecht, S.M. Ibrahim, D. Zillikens, R.J. Ludwig, J. Westermann, Complement-Fixing Anti-Type VII Collagen Antibodies Are Induced in Th1-Polarized Lymph Nodes of Epidermolysis Bullosa Acquisita-Susceptible Mice, *J. Immunol.* 187 (2011) 5043–5050.
- [65] P.T. Hawkins, L.R. Stephens, PI3Kgamma Is a Key Regulator of Inflammatory Responses and Cardiovascular Homeostasis, *Science.* 318 (2007) 64–66.

- [66] P.T. Hawkins, L.R. Stephens, Emerging evidence of signalling roles for PI(3,4)P₂ in Class I and II PI3K-regulated pathways, *Biochem. Soc. Trans.* 44 (2016) 307–314.
- [67] L. Hellberg, U.K.S.R.L. Samavedam, K. Holdorf, M. Hänsel, A. Recke, T. Beckmann, K. Steinhorst, W.-H. Boehncke, T. Kirchner, N. Möckel, W. Solbach, D. Zillikens, E. Schmidt, R.J. Ludwig, T. Laskay, Methylprednisolone Blocks Autoantibody-Induced Tissue Damage in Experimental Models of Bullous Pemphigoid and Epidermolysis Bullosa Acquisita through Inhibition of Neutrophil Activation, *J. Invest. Dermatol.* 133 (2013) 2390–2399.
- [68] L. Heurtier, H. Lamrini, L. Chentout, M.-C. Deau, A. Bouafia, J. Rosain, J.-M. Plaza, M. Parisot, B. Dumont, D. Turpin, E. Merlin, D. Moshous, N. Aladjidi, B. Neven, C. Picard, M. Cavazzana, A. Fischer, A. Durandy, J.-L. Stephan, S. Kracker, Mutations in the adaptor-binding domain and associated linker region of p110 δ cause Activated PI3K- δ Syndrome 1 (APDS1), *Haematologica*. 102 (2017) e278–e281.
- [69] Hirose M, Götz J, Recke A, Zillikens D, Ludwig RJ, The Allosteric CXCR1/2 Inhibitor DF2156A Improves Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita, *J. Genet. Syndr. Gene Ther.* s3 (2013).
- [70] M. Hirose, A. Kasprick, Reduced Skin Blistering in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita After Anti-TNF Treatment, *Mol. Med.* 22 (2016) 1.
- [71] M. Hirose, B. Tiburzy, N. Ishii, E. Pipi, S. Wende, E. Rentz, F. Nimmerjahn, D. Zillikens, R.A. Manz, R.J. Ludwig, M. Kasperkiewicz, Effects of Intravenous Immunoglobulins on Mice with Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita, *J. Invest. Dermatol.* 135 (2015) 768–775.
- [72] E. Hirsch, V.L. Katanaev, C. Garlanda, O. Azzolino, L. Pirola, L. Silengo, S. Sozzani, A. Mantovani, F. Altruda, M.P. Wymann, Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation, *Science*. 287 (2000) 1049–1053.
- [73] B.D. Hopkins, M.D. Goncalves, L.C. Cantley, Obesity and Cancer Mechanisms: Cancer Metabolism, *J. Clin. Oncol.* 34 (2016) 4277–4283.
- [74] F.A. Houssiau, J.-P. Devogelaer, J.V. Damme, C.N.D. Deuchaisnes, J.V. Snick, Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid

- arthritis and other inflammatory arthritides, *Arthritis Rheum.* 31 (1988) 784–788.
- [75] I. Huang-Doran, P. Tomlinson, F. Payne, A. Gast, A. Sleight, W. Bottomley, J. Harris, A. Daly, N. Rocha, S. Rudge, J. Clark, A. Kwok, S. Romeo, E. McCann, B. Müksch, M. Dattani, S. Zucchini, M. Wakelam, L.C. Foukas, D.B. Savage, R. Murphy, S. O’Rahilly, I. Barroso, R.K. Semple, Insulin resistance uncoupled from dyslipidemia due to C-terminal PIK3R1 mutations, *JCI Insight.* 1 (2016) e88766.
 - [76] F. Hübner, A. Recke, D. Zillikens, R. Linder, E. Schmidt, Prevalence and Age Distribution of Pemphigus and Pemphigoid Diseases in Germany, *J. Invest. Dermatol.* 136 (2016) 2495–2498.
 - [77] H. Iwata, E. Pipi, N. Möckel, P. Sondermann, A. Vorobyev, N. van Beek, D. Zillikens, R.J. Ludwig, Recombinant Soluble CD32 Suppresses Disease Progression in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita, *J. Invest. Dermatol.* 135 (2015) 916–919.
 - [78] H. Iwata, A. Vorobyev, H. Koga, A. Recke, D. Zillikens, C. Prost-Squarcioni, N. Ishii, T. Hashimoto, R.J. Ludwig, Meta-analysis of the clinical and immunopathological characteristics and treatment outcomes in epidermolysis bullosa acquisita patients, *Orphanet J. Rare Dis.* 13 (2018).
 - [79] H. Izumi, H. Hosokawa, [Molecular heterogeneity of the bullous pemphigoid antigen as detected by immunoblotting], *Nihon Hifuka Gakkai Zasshi Jpn. J. Dermatol.* 99 (1989) 871–875.
 - [80] A. Jacobi, G. Schuler, M. Hertl, Rapid control of therapy-refractory pemphigus vulgaris by treatment with the tumour necrosis factor-alpha inhibitor infliximab, *Br. J. Dermatol.* 153 (2005) 448–449.
 - [81] J.-O. Jin, X. Han, Q. Yu, Interleukin-6 induces the generation of IL-10-producing Tr1 cells and suppresses autoimmune tissue inflammation, *J. Autoimmun.* 40 (2013) 28–44.
 - [82] H. John, A. Whallett, M. Quinlan, Successful biologic treatment of ocular mucous membrane pemphigoid with anti-TNF- α , *Eye.* 21 (2007) 1434–1435.
 - [83] P. Joly, S. Baricault, A. Sparsa, P. Bernard, C. Bédane, S. Duvert-Lehembre, P. Courville, P. Bravard, B. Rémond, V. Doffoel-Hantz, J. Bénichou, Incidence and Mortality of Bullous Pemphigoid in France, *J. Invest. Dermatol.* 132 (2012) 1998–2004.

- [84] P. Joly, F. Ruto, E. Thomine, A. Delpech, X. Balguerie, F. Tron, P. Lauret, Brunsting-Perry cicatricial bullous pemphigoid: a clinical variant of localized acquired epidermolysis bullosa?, *J. Am. Acad. Dermatol.* 28 (1993) 89–92.
- [85] M.M. Kaneda, K.S. Messer, N. Ralainirina, H. Li, C.J. Leem, S. Gorjestani, G. Woo, A.V. Nguyen, C.C. Figueiredo, P. Foubert, M.C. Schmid, M. Pink, D.G. Winkler, M. Rausch, V.J. Palombella, J. Kutok, K. McGovern, K.A. Frazer, X. Wu, M. Karin, R. Sasik, E.E.W. Cohen, J.A. Varner, PI3Ky is a molecular switch that controls immune suppression, *Nature.* 539 (2016) 437–442.
- [86] M.J. Kaplan, M. Radic, Neutrophil Extracellular Traps: Double-Edged Swords of Innate Immunity, *J. Immunol.* 189 (2012) 2689–2695.
- [87] M. Kasperkiewicz, R. Muller, R. Manz, M. Magens, C.M. Hammers, C. Somlai, J. Westermann, E. Schmidt, D. Zillikens, R.J. Ludwig, A. Orosz, Heat-shock protein 90 inhibition in autoimmunity to type VII collagen: evidence that nonmalignant plasma cells are not therapeutic targets, *Blood.* 117 (2011) 6135–6142.
- [88] M. Kasperkiewicz, C.D. Sadik, K. Bieber, S.M. Ibrahim, R.A. Manz, E. Schmidt, D. Zillikens, R.J. Ludwig, Epidermolysis Bullosa Acquisita: From Pathophysiology to Novel Therapeutic Options, *J. Invest. Dermatol.* 136 (2016) 24–33.
- [89] S. Kawa, S. Kimura, S. Hakomori, Y. Igarashi, Inhibition of chemotactic motility and trans-endothelial migration of human neutrophils by sphingosine 1-phosphate, *FEBS Lett.* 420 (1997) 196–200.
- [90] J.S. Kennedy, R.L. Devillez, J.S. Henning, Recalcitrant cicatricial pemphigoid treated with the anti-TNF-alpha agent etanercept, *J. Drugs Dermatol. JDD.* 9 (2010) 68–70.
- [91] R. Kershenovich, E. Hodak, D. Mimouni, Diagnosis and classification of pemphigus and bullous pemphigoid, *Autoimmun. Rev.* 13 (2014) 477–481.
- [92] S. Kim, J. Kim, Y. Kim, Epidermolysis Bullosa Acquisita: A Retrospective Clinical Analysis of 30 Cases, *Acta Derm. Venereol.* 91 (2011) 307–312.
- [93] T. Kirchner, S. Möller, M. Klinger, W. Solbach, T. Laskay, M. Behnen, The Impact of Various Reactive Oxygen Species on the Formation of Neutrophil Extracellular Traps, *Mediators Inflamm.* 2012 (2012) 1–10.

- [94] C. Knall, S. Young, J.A. Nick, A.M. Buhl, G.S. Worthen, G.L. Johnson, Interleukin-8 regulation of the Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase pathway in human neutrophils, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 2832–2838.
- [95] H. Koga, A. Kasprick, R. López, M. Aulí, M. Pont, N. Godessart, D. Zillikens, K. Bieber, R.J. Ludwig, C. Balagué, Therapeutic Effect of a Novel Phosphatidylinositol-3-Kinase δ Inhibitor in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita, *Front. Immunol.* 9 (2018).
- [96] H. Koga, A. Recke, G. Vidarsson, H.H. Pas, M.F. Jonkman, T. Hashimoto, A. Kasprick, S. Ghorbanalipoor, H. Tenor, D. Zillikens, R.J. Ludwig, PDE4 Inhibition as Potential Treatment of Epidermolysis Bullosa Acquisita, *J. Invest. Dermatol.* 136 (2016) 2211–2220.
- [97] Z. Kopecki, R.M. Arkell, X.L. Strudwick, M. Hirose, R.J. Ludwig, J.S. Kern, L. Bruckner-Tuderman, D. Zillikens, D.F. Murrell, A.J. Cowin, Overexpression of the *Flii* gene increases dermal-epidermal blistering in an autoimmune ColVII mouse model of epidermolysis bullosa acquisita, *J. Pathol.* 225 (2011) 401–413.
- [98] Z. Kopecki, N. Ruzehaji, C. Turner, H. Iwata, R.J. Ludwig, D. Zillikens, D.F. Murrell, A.J. Cowin, Topically Applied Flightless I Neutralizing Antibodies Improve Healing of Blistered Skin in a Murine Model of Epidermolysis Bullosa Acquisita, *J. Invest. Dermatol.* 133 (2013) 1008–1016.
- [99] Z. Kopecki, G.N. Yang, R.M. Arkell, J.E. Jackson, E. Melville, H. Iwata, R.J. Ludwig, D. Zillikens, D.F. Murrell, A.J. Cowin, Flightless I over-expression impairs skin barrier development, function and recovery following skin blistering: *Flii* regulation of skin barrier function, *J. Pathol.* 232 (2014) 541–552.
- [100] K. Kridin, R.J. Ludwig, The Growing Incidence of Bullous Pemphigoid: Overview and Potential Explanations, *Front. Med.* 5 (2018).
- [101] S. Kulkarni, C. Sitaru, Z. Jakus, K.E. Anderson, G. Damoulakis, K. Davidson, M. Hirose, J. Juss, D. Oxley, T.A.M. Chessa, F. Ramadani, H. Guillou, A. Segonds-Pichon, A. Fritsch, G.E. Jarvis, K. Okkenhaug, R. Ludwig, D. Zillikens, A. Mocsa, B. Vanhaesebroeck, L.R. Stephens, P.T. Hawkins, PI3K Plays a Critical Role in Neutrophil Activation by Immune Complexes, *Sci. Signal.* 4 (2011) ra23–ra23.

- [102] T.T. Kuo, K. Baker, M. Yoshida, S.-W. Qiao, V.G. Aveson, W.I. Lencer, R.S. Blumberg, Neonatal Fc Receptor: From Immunity to Therapeutics, *J. Clin. Immunol.* 30 (2010) 777–789.
- [103] G. Kurzhals, W. Stolz, M. Meurer, J. Kunze, O. Braun-Falco, T. Krieg, Acquired epidermolysis bullosa with the clinical feature of Brunsting-Perry cicatricial bullous pemphigoid, *Arch. Dermatol.* 127 (1991) 391–395.
- [104] D. Kwiatkowski, A.V. Hill, I. Sambou, P. Twumasi, J. Castracane, K.R. Manogue, A. Cerami, D.R. Brewster, B.M. Greenwood, TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria, *Lancet Lond. Engl.* 336 (1990) 1201–1204.
- [105] M.S. Lawrence, P. Stojanov, C.H. Mermel, J.T. Robinson, L.A. Garraway, T.R. Golub, M. Meyerson, S.B. Gabriel, E.S. Lander, G. Getz, Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types, *Nature.* 505 (2014) 495–501.
- [106] K.H. Lee, A. Kronbichler, D.D.-Y. Park, Y. Park, H. Moon, H. Kim, J.H. Choi, Y. Choi, S. Shim, I.S. Lyu, B.H. Yun, Y. Han, D. Lee, S.Y. Lee, B.H. Yoo, K.H. Lee, T.L. Kim, H. Kim, J.S. Shim, W. Nam, H. So, S. Choi, S. Lee, J.I. Shin, Neutrophil extracellular traps (NETs) in autoimmune diseases: A comprehensive review, *Autoimmun. Rev.* 16 (2017) 1160–1173.
- [107] D.M. Lehmann, A.M.P.B. Seneviratne, A.V. Smrcka, Small Molecule Disruption of G Protein Subunit Signaling Inhibits Neutrophil Chemotaxis and Inflammation, *Mol. Pharmacol.* 73 (2007) 410–418.
- [108] H.D. Lewis, J. Liddle, J.E. Coote, S.J. Atkinson, M.D. Barker, B.D. Bax, K.L. Bicker, R.P. Bingham, M. Campbell, Y.H. Chen, C. Chung, P.D. Craggs, R.P. Davis, D. Eberhard, G. Joberty, K.E. Lind, K. Locke, C. Maller, K. Martinod, C. Patten, O. Polyakova, C.E. Rise, M. Rüdiger, R.J. Sheppard, D.J. Slade, P. Thomas, J. Thorpe, G. Yao, G. Drewes, D.D. Wagner, P.R. Thompson, R.K. Prinjha, D.M. Wilson, Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation, *Nat. Chem. Biol.* 11 (2015) 189–191.
- [109] N. Li, Complete FcRn dependence for intravenous Ig therapy in autoimmune skin blistering diseases, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 3440–3450.
- [110] L. Liu, K.D. Puri, J.M. Penninger, P. Kubes, Leukocyte PI3K and PI3K have temporally distinct roles for leukocyte recruitment in vivo, *Blood.* 110 (2007) 1191–1198.

- [111] N. Liu, B.R. Rowley, C.O. Bull, C. Schneider, A. Haegebarth, C.A. Schatz, P.R. Fracasso, D.P. Wilkie, M. Hentemann, S.M. Wilhelm, W.J. Scott, D. Mumberg, K. Ziegelbauer, BAY 80-6946 Is a Highly Selective Intravenous PI3K Inhibitor with Potent p110 α and p110 δ Activities in Tumor Cell Lines and Xenograft Models, *Mol. Cancer Ther.* 12 (2013) 2319–2330.
- [112] C. Lood, L.P. Blanco, M.M. Purmalek, C. Carmona-Rivera, S.S. De Ravin, C.K. Smith, H.L. Malech, J.A. Ledbetter, K.B. Elkon, M.J. Kaplan, Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease, *Nat. Med.* 22 (2016) 146–153.
- [113] P.C. Low, S. Manzanero, N. Mohannak, V.K. Narayana, T.H. Nguyen, D. Kvaskoff, F.H. Brennan, M.J. Ruitenberg, M. Gelderblom, T. Magnus, H.A. Kim, B.R.S. Broughton, C.G. Sobey, B. Vanhaesebroeck, J.L. Stow, T.V. Arumugam, F.A. Meunier, PI3K δ inhibition reduces TNF secretion and neuroinflammation in a mouse cerebral stroke model, *Nat. Commun.* 5 (2014).
- [114] R. Ludwig, Immune mechanism–targeted treatment of experimental epidermolysis bullosa acquisita, *Expert Rev. Clin. Immunol.* 11 (2015) 1365–1378.
- [115] R.J. Ludwig, Clinical Presentation, Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment of Epidermolysis Bullosa Acquisita, *ISRN Dermatol.* 2013 (2013) 1–25.
- [116] R.J. Ludwig, Signalling and targeted therapy of inflammatory cells in epidermolysis bullosa acquisita, *Exp. Dermatol.* 26 (2017) 1179–1186.
- [117] R.J. Ludwig, K. Vanhoorelbeke, F. Leyboldt, Z. Kaya, K. Bieber, S.M. McLachlan, L. Komorowski, J. Luo, O. Cabral-Marques, C.M. Hammers, J.M. Lindstrom, P. Lamprecht, A. Fischer, G. Riemekasten, C. Tersteeg, P. Sondermann, B. Rapoport, K.-P. Wandering, C. Probst, A. El Beidaq, E. Schmidt, A. Verkman, R.A. Manz, F. Nimmerjahn, Mechanisms of Autoantibody-Induced Pathology, *Front. Immunol.* 8 (2017).
- [118] R. Lüllmann-Rauch, E. Asan, Taschenbuch Histologie, 5., vollständig überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 2015.
- [119] A.N. Macintyre, D. Finlay, G. Preston, L.V. Sinclair, C.M. Waugh, P. Tamas, C. Feijoo, K. Okkenhaug, D.A. Cantrell, Protein Kinase B Controls Transcriptional Programs that Direct Cytotoxic T Cell Fate but Is Dispensable for T Cell Metabolism, *Immunity.* 34 (2011) 224–236.

- [120] K.J.S. Martin, M.J. Muessel, C.E. Pullar, G.B. Willars, A.J. Wardlaw, The Role of Phosphoinositide 3-Kinases in Neutrophil Migration in 3D Collagen Gels, *PLOS ONE*. 10 (2015) e0116250.
- [121] S. Matsuda, Y. Nakagawa, A. Tsuji, Y. Kitagishi, A. Nakanishi, T. Murai, Implications of PI3K/AKT/PTEN Signaling on Superoxide Dismutases Expression and in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease, *Diseases*. 6 (2018) 28.
- [122] E. Maverakis, I. Bustos, F. Patel, R. Wilken, F. Patel, H. Sultani, C. Duong, J. Zone, S. Raychaudhuri, Pathophysiology of Autoimmune Bullous Diseases: Nature Versus Nurture, *Indian J. Dermatol.* 0 (2015) 0.
- [123] J.M. Meijer, I. Atefi, G.F.H. Diercks, A. Vorobyev, J. Zuiderveen, H.J. Meijer, H.H. Pas, D. Zillikens, E. Schmidt, M.F. Jonkman, Serration pattern analysis for differentiating epidermolysis bullosa acquisita from other pemphigoid diseases, *J. Am. Acad. Dermatol.* 78 (2018) 754-759.e6.
- [124] D. Meyersburg, E. Schmidt, M. Kasperkiewicz, D. Zillikens, Immunoadsorption in Dermatology: Immunoadsorption in Dermatology, *Ther. Apher. Dial.* 16 (2012) 311–320.
- [125] S. Mihai, M.T. Chiriac, J.E. Herrero-González, M. Goodall, R. Jefferis, C.O.S. Savage, D. Zillikens, C. Sitaru, IgG4 autoantibodies induce dermal–epidermal separation, *J. Cell. Mol. Med.* 11 (2007) 1117–1128.
- [126] S. Mihai, M.T. Chiriac, K. Takahashi, J.M. Thurman, V.M. Holers, D. Zillikens, M. Botto, C. Sitaru, The alternative pathway of complement activation is critical for blister induction in experimental epidermolysis bullosa acquisita, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 178 (2007) 6514–6521.
- [127] S. Mihai, C. Sitaru, Immunopathology and molecular diagnosis of autoimmune bullous diseases, *J. Cell. Mol. Med.* 11 (2007) 462–481.
- [128] A.T. Miller, H.M. Wilcox, Z. Lai, L.J. Berg, Signaling through Itk Promotes T Helper 2 Differentiation via Negative Regulation of T-bet, *Immunity*. 21 (2004) 67–80.
- [129] A. Mizrachi, Y. Shamay, J. Shah, S. Brook, J. Soong, V.K. Rajasekhar, J.L. Humm, J.H. Healey, S.N. Powell, J. Baselga, D.A. Heller, A. Haimovitz-Friedman, M. Scaltriti, Tumour-specific PI3K inhibition via nanoparticle-targeted delivery in head and neck squamous cell carcinoma, *Nat. Commun.* 8 (2017) 14292.

- [130] C. Monaco, J. Nanchahal, P. Taylor, M. Feldmann, Anti-TNF therapy: past, present and future, *Int. Immunol.* 27 (2015) 55–62.
- [131] W.R. Montor, A.R.O.S.E. Salas, F.H.M. de Melo, Receptor tyrosine kinases and downstream pathways as druggable targets for cancer treatment: the current arsenal of inhibitors, *Mol. Cancer.* 17 (2018).
- [132] S. Müller, M. Behnen, K. Bieber, S. Möller, L. Hellberg, M. Witte, M. Hänsel, D. Zillikens, W. Solbach, T. Laskay, R.J. Ludwig, Dimethylfumarate Impairs Neutrophil Functions, *J. Invest. Dermatol.* 136 (2016) 117–126.
- [133] M.M. Murillo, S. Zelenay, E. Nye, E. Castellano, F. Lassailly, G. Stamp, J. Downward, RAS interaction with PI3K p110 α is required for tumor-induced angiogenesis, *J. Clin. Invest.* 124 (2014) 3601–3611.
- [134] D. Murrell, *Blistering Diseases Clinical Features, Pathogenesis, Treatment*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2015.
- [135] Y. Nakashima, M. Kondo, H. Miyahara, Y. Iwamoto, Drug delivery options to increase patient adherence and satisfaction in the management of rheumatoid arthritis – focus on subcutaneous tocilizumab, *Drug Des. Devel. Ther.* (2014) 913.
- [136] I. Neeli, S.N. Khan, M. Radic, Histone Deimination As a Response to Inflammatory Stimuli in Neutrophils, *J. Immunol.* 180 (2008) 1895–1902.
- [137] E.R. Neptune, H.R. Bourne, Receptors induce chemotaxis by releasing the betagamma subunit of Gi, not by activating Gq or Gs, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 14489–14494.
- [138] R. Neta, T.J. Sayers, J.J. Oppenheim, Relationship of TNF to interleukins, *Immunol. Ser.* 56 (1992) 499–566.
- [139] K. Okkenhaug, D.T. Patton, A. Bilancio, F. Garcon, W.C. Rowan, B. Vanhaesebroeck, The p110 Isoform of Phosphoinositide 3-Kinase Controls Clonal Expansion and Differentiation of Th Cells, *J. Immunol.* 177 (2006) 5122–5128.
- [140] J. Pang, Y.-W. Yang, Y. Huang, J. Yang, H. Zhang, R. Chen, L. Dong, Y. Huang, D. Wang, J. Liu, B. Li, P110 β Inhibition Reduces Histone H3K4 Di-Methylation in Prostate Cancer: Pi3K Modulates Histone Methylation, *The Prostate.* 77 (2017) 299–308.
- [141] H. Parker, C.C. Winterbourn, Reactive oxidants and myeloperoxidase and their involvement in neutrophil extracellular traps, *Front. Immunol.* 3 (2013).

- [142] E.A. Perez, Treatment strategies for advanced hormone receptor-positive and human epidermal growth factor 2-negative breast cancer: the role of treatment order, *Drug Resist. Updat.* 24 (2016) 13–22.
- [143] F.H. Pilsczek, D. Salina, K.K.H. Poon, C. Fahey, B.G. Yipp, C.D. Sibley, S.M. Robbins, F.H.Y. Green, M.G. Surette, M. Sugai, M.G. Bowden, M. Hussain, K. Zhang, P. Kubes, A Novel Mechanism of Rapid Nuclear Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to *Staphylococcus aureus*, *J. Immunol.* 185 (2010) 7413–7425.
- [144] B. Pinegin, N. Vorobjeva, V. Pinegin, Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity, *Autoimmun. Rev.* 14 (2015) 633–640.
- [145] M.C. Poffenberger, N. Straka, N. El Warry, D. Fang, I. Shanina, M.S. Horwitz, Lack of IL-6 during Coxsackievirus Infection Heightens the Early Immune Response Resulting in Increased Severity of Chronic Autoimmune Myocarditis, *PLoS ONE.* 4 (2009) e6207.
- [146] V. Prajapati, P.R. Mydlarski, Advances in pemphigus therapy, *Skin Ther. Lett.* 13 (2008) 4–7.
- [147] W. Prüßmann, J. Prüßmann, H. Koga, A. Recke, H. Iwata, D. Juhl, S. Görg, R. Henschler, T. Hashimoto, E. Schmidt, D. Zillikens, S. Ibrahim, R. Ludwig, Prevalence of pemphigus and pemphigoid autoantibodies in the general population, *Orphanet J. Rare Dis.* 10 (2015) 63.
- [148] K.D. Puri, Mechanisms and implications of phosphoinositide 3-kinase in promoting neutrophil trafficking into inflamed tissue, *Blood.* 103 (2004) 3448–3456.
- [149] K.D. Puri, The role of endothelial PI3K activity in neutrophil trafficking, *Blood.* 106 (2005) 150–157.
- [150] A. Recke, C. Sitaru, G. Vidarsson, M. Evensen, M.T. Chiriac, R.J. Ludwig, D. Zillikens, Pathogenicity of IgG subclass autoantibodies to type VII collagen: Induction of dermal–epidermal separation, *J. Autoimmun.* 34 (2010) 435–444.
- [151] H. Sadeghi, Y. Gupta, S. Möller, U.K. Samavedam, M. Behnen, A. Kasprick, K. Bieber, S. Müller, K. Kalies, A. de Castro Marques, A. Recke, E. Schmidt, D. Zillikens, T. Laskay, J. Mariani, S.M. Ibrahim, R.J. Ludwig, The retinoid-related orphan receptor alpha is essential for the end-stage effector phase of

- experimental epidermolysis bullosa acquisita: ROR α in EBA, *J. Pathol.* 237 (2015) 111–122.
- [152] H. Sadeghi, A. Lockmann, A.-C. Hund, U.K.S.R.L. Samavedam, E. Pippi, K. Vafia, E. Hauenschild, K. Kalies, H.H. Pas, M.F. Jonkman, H. Iwata, A. Recke, M.P. Schön, D. Zillikens, E. Schmidt, R.J. Ludwig, Caspase-1–Independent IL-1 Release Mediates Blister Formation in Autoantibody-Induced Tissue Injury through Modulation of Endothelial Adhesion Molecules, *J. Immunol.* 194 (2015) 3656–3663.
- [153] U.K.S.R.L. Samavedam, H. Iwata, S. Muller, F.S. Schulze, A. Recke, E. Schmidt, D. Zillikens, R.J. Ludwig, GM-CSF Modulates Autoantibody Production and Skin Blistering in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita, *J. Immunol.* 192 (2014) 559–571.
- [154] U.K.S.R.L. Samavedam, K. Kalies, J. Scheller, H. Sadeghi, Y. Gupta, M.F. Jonkman, E. Schmidt, J. Westermann, D. Zillikens, S. Rose-John, R.J. Ludwig, Recombinant IL-6 treatment protects mice from organ specific autoimmune disease by IL-6 classical signalling-dependent IL-1 α induction, *J. Autoimmun.* 40 (2013) 74–85.
- [155] Y. Samuels, Z. Wang, A. Bardelli, N. Silliman, J. Ptak, S. Szabo, H. Yan, A. Gazdar, S.M. Powell, G.J. Riggins, J.K.V. Willson, S. Markowitz, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, V.E. Velculescu, High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers, *Science.* 304 (2004) 554.
- [156] E. Schmidt, S. Benoit, E.-B. Bröcker, D. Zillikens, M. Goebeler, Successful Adjuvant Treatment of Recalcitrant Epidermolysis Bullosa Acquisita With Anti-CD20 Antibody Rituximab, *Arch. Dermatol.* 142 (2006).
- [157] E. Schmidt, E.-B. Bröcker, M. Goebeler, Rituximab in Treatment-Resistant Autoimmune Blistering Skin Disorders, *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 34 (2008) 56–64.
- [158] E. Schmidt, D. Zillikens, The diagnosis and treatment of autoimmune blistering skin diseases, *Dtsch. Arzteblatt Int.* 108 (2011) 399–405, I–III.
- [159] K. Schroder, P.J. Hertzog, T. Ravasi, D.A. Hume, Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions, *J. Leukoc. Biol.* 75 (2004) 163–189.
- [160] S. Schwartz, J. Wongvipat, C.B. Trigwell, U. Hancox, B.S. Carver, V. Rodrik-Outmezguine, M. Will, P. Yellen, E. de Stanchina, J. Baselga, H.I. Scher, S.T. Barry, C.L. Sawyers, S. Chandarlapaty, N. Rosen, Feedback Suppression of

- PI3K α Signaling in PTEN-Mutated Tumors Is Relieved by Selective Inhibition of PI3K β , *Cancer Cell*. 27 (2015) 109–122.
- [161] D.F. Sebaratnam, J.W. Frew, F. Davatchi, D.F. Murrell, Quality-of-Life Measurement in Blistering Diseases, *Dermatol. Clin.* 30 (2012) 301–307.
- [162] K. Sengupta, H. Aranda-Espinoza, L. Smith, P. Janmey, D. Hammer, Spreading of Neutrophils: From Activation to Migration, *Biophys. J.* 91 (2006) 4638–4648.
- [163] A. Sesarman, S. Mihai, M.T. Chiriac, F. Olaru, A.G. Sitaru, J.M. Thurman, D. Zillikens, C. Sitaru, Binding of avian IgY to type VII collagen does not activate complement and leucocytes and fails to induce subepidermal blistering in mice: Binding of avian IgY to type VII collagen, *Br. J. Dermatol.* 158 (2008) 463–471.
- [164] A. Sesarman, A.G. Sitaru, F. Olaru, D. Zillikens, C. Sitaru, Neonatal Fc receptor deficiency protects from tissue injury in experimental epidermolysis bullosa acquisita, *J. Mol. Med.* 86 (2008) 951–959.
- [165] I. Shimanovich, S. Mihai, G.J. Oostingh, T.T. Ilenchuk, E.-B. Bröcker, G. Opdenakker, D. Zillikens, C. Sitaru, Granulocyte-derived elastase and gelatinase B are required for dermal–epidermal separation induced by autoantibodies from patients with epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid, *J. Pathol.* 204 (2004) 519–527.
- [166] R. Shimizu-Hirota, W. Xiong, B.T. Baxter, S.L. Kunkel, I. Maillard, X.-W. Chen, F. Sabeh, R. Liu, X.-Y. Li, S.J. Weiss, MT1-MMP regulates the PI3K {middle dot}Mi-2/NuRD-dependent control of macrophage immune function, *Genes Dev.* 26 (2012) 395–413.
- [167] W. Siegenthaler, B. Amann-Vesti, eds., *Klinische Pathophysiologie: 239 Tabellen*, 9., völlig neu bearb. Aufl, Thieme, Stuttgart, 2006.
- [168] A.G. Sitaru, A. Sesarman, S. Mihai, M.T. Chiriac, D. Zillikens, P. Hultman, W. Solbach, C. Sitaru, T Cells Are Required for the Production of Blister-Inducing Autoantibodies in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita, *J. Immunol.* 184 (2010) 1596–1603.
- [169] C. Sitaru, M.T. Chiriac, S. Mihai, J. Büning, A. Gebert, A. Ishiko, D. Zillikens, Induction of complement-fixing autoantibodies against type VII collagen results in subepidermal blistering in mice, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 177 (2006) 3461–3468.

- [170] C. Sitaru, M. Goebeler, D. Zillikens, [Bullous autoimmune dermatoses (I): Pathogenesis and diagnosis], *J. Dtsch. Dermatol. Ges. J. Ger. Soc. Dermatol. JDDG*. 2 (2004) 123–128; quiz 139–140.
- [171] C. Sitaru, A. Kromminga, T. Hashimoto, E.B. Bröcker, D. Zillikens, Autoantibodies to Type VII Collagen Mediate Fc γ -Dependent Neutrophil Activation and Induce Dermal-Epidermal Separation in Cryosections of Human Skin, *Am. J. Pathol.* 161 (2002) 301–311.
- [172] C. Sitaru, S. Mihai, C. Otto, M.T. Chiriac, I. Hausser, B. Dotterweich, H. Saito, C. Rose, A. Ishiko, D. Zillikens, Induction of dermal-epidermal separation in mice by passive transfer of antibodies specific to type VII collagen, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 870–878.
- [173] S.J. Smart, T.B. Casale, TNF- α -induced transendothelial neutrophil migration is IL-8 dependent, *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 266 (1994) L238–L245.
- [174] D.F. Smith, T.L. Deem, A.C. Bruce, J. Reutershan, D. Wu, K. Ley, Leukocyte phosphoinositide-3 kinase γ is required for chemokine-induced, sustained adhesion under flow in vivo, *J. Leukoc. Biol.* 80 (2006) 1491–1499.
- [175] J.E. Smolen, T.K. Petersen, C. Koch, S.J. O’Keefe, W.A. Hanlon, S. Seo, D. Pearson, M.C. Fossett, S.I. Simon, L-Selectin Signaling of Neutrophil Adhesion and Degranulation Involves p38 Mitogen-activated Protein Kinase, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 15876–15884.
- [176] D.R. Soond, E.C.M. Slack, O.A. Garden, D.T. Patton, K. Okkenhaug, Does the PI3K pathway promote or antagonize regulatory T cell development and function?, *Front. Immunol.* 3 (2012).
- [177] J.R. Stanley, P. Hawley-Nelson, S.H. Yuspa, E.M. Shevach, S.I. Katz, Characterization of bullous pemphigoid antigen: a unique basement membrane protein of stratified squamous epithelia, *Cell*. 24 (1981) 897–903.
- [178] L. Stephens, A. Smrcka, F.T. Cooke, T.R. Jackson, P.C. Sternweis, P.T. Hawkins, A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein $\beta\gamma$ subunits, *Cell*. 77 (1994) 83–93.
- [179] R.W. Stidham, T.C.H. Lee, P.D.R. Higgins, A.R. Deshpande, D.A. Sussman, A.G. Singal, B.J. Elmunzer, S.D. Saini, S. Vijan, A.K. Waljee, Systematic review with network meta-analysis: the efficacy of anti-TNF agents for the

- treatment of Crohn's disease, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 39 (2014) 1349–1362.
- [180] D. Stojkov, P. Amini, K. Oberson, C. Sokollik, A. Duppenhaler, H.-U. Simon, S. Yousefi, ROS and glutathionylation balance cytoskeletal dynamics in neutrophil extracellular trap formation, *J. Cell Biol.* 216 (2017) 4073–4090.
- [181] B. Stoyanov, S. Volinia, T. Hanck, I. Rubio, M. Loubtchenkov, D. Malek, S. Stoyanova, B. Vanhaesebroeck, R. Dhand, B. Nürnberg, Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase, *Science*. 269 (1995) 690–693.
- [182] H. Takei, A. Araki, H. Watanabe, A. Ichinose, F. Sendo, Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis, *J. Leukoc. Biol.* 59 (1996) 229–240.
- [183] C.M. Taniguchi, T. Kondo, M. Sajan, J. Luo, R. Bronson, T. Asano, R. Farese, L.C. Cantley, C.R. Kahn, Divergent regulation of hepatic glucose and lipid metabolism by phosphoinositide 3-kinase via Akt and PKC α/ζ , *Cell Metab.* 3 (2006) 343–353.
- [184] C.F. Urban, U. Reichard, V. Brinkmann, A. Zychlinsky, Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms, *Cell. Microbiol.* 8 (2006) 668–676.
- [185] S.Z. Usmani, G. Chiosis, HSP90 Inhibitors as Therapy for Multiple Myeloma, *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* 11 (2011) S77–S81.
- [186] D. Villone, A. Fritsch, M. Koch, L. Bruckner-Tuderman, U. Hansen, P. Bruckner, Supramolecular Interactions in the Dermo-epidermal Junction Zone: ANCHORING FIBRIL-COLLAGEN VII TIGHTLY BINDS TO BANDED COLLAGEN FIBRILS, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 24506–24513.
- [187] R.M. Vodegel, M.C.J.M. de Jong, H.H. Pas, M.F. Jonkman, IgA-mediated epidermolysis bullosa acquisita: Two cases and review of the literature, *J. Am. Acad. Dermatol.* 47 (2002) 919–925.
- [188] R.M. Vodegel, M. f. Jonkman, H.H. Pas, M.C.J.M. De Jong, U-serrated immunodeposition pattern differentiates type VII collagen targeting bullous diseases from other subepidermal bullous autoimmune diseases, *Br. J. Dermatol.* 151 (2004) 112–118.

- [189] A. Vorobyev, R.J. Ludwig, E. Schmidt, Clinical features and diagnosis of epidermolysis bullosa acquisita, *Expert Rev. Clin. Immunol.* 13 (2017) 157–169.
- [190] A. Waage, A. Halstensen, T. Espevik, Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease, *Lancet Lond. Engl.* 1 (1987) 355–357.
- [191] J. Wang, J. Wen, R. Yi, F. Liu, J. Zhou, G. Liu, Q. Li, Z. Yang, X. Su, High selectivity of PI3K β inhibitors in SETD2-mutated renal clear cell carcinoma, *J. BUON Off. J. Balk. Union Oncol.* 20 (2015) 1267–1275.
- [192] T. Weichhart, M. Hengstschläger, M. Linke, Regulation of innate immune cell function by mTOR, *Nat. Rev. Immunol.* 15 (2015) 599–614.
- [193] U. Welsch, T. Deller, W. Kummer, *Lehrbuch Histologie*, 4. Auflage, Elsevier, Urban & Fischer, München, 2014.
- [194] M.A. Whitehead, M. Bombardieri, C. Pitzalis, B. Vanhaesebroeck, Isoform-selective induction of human p110 δ PI3K expression by TNF α : identification of a new and inducible *PIK3CD* promoter, *Biochem. J.* 443 (2012) 857–867.
- [195] M. Witte, H. Koga, T. Hashimoto, R.J. Ludwig, K. Bieber, Discovering potential drug-targets for personalized treatment of autoimmune disorders - what we learn from epidermolysis bullosa acquisita, *Expert Opin. Ther. Targets.* 20 (2016) 985–998.
- [196] D.T. Woodley, R.E. Burgeson, G. Lunstrum, L. Bruckner-Tuderman, M.J. Reese, R.A. Briggaman, Epidermolysis bullosa acquisita antigen is the globular carboxyl terminus of type VII procollagen., *J. Clin. Invest.* 81 (1988) 683–687.
- [197] H.L. Wright, R.J. Moots, R.C. Bucknall, S.W. Edwards, Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases, *Rheumatology.* 49 (2010) 1618–1631.
- [198] Y. Xie, C. Li, Y. Huang, Z. Jia, J. Cao, A novel multikinase inhibitor R8 exhibits potent inhibition on cancer cells through both apoptosis and autophagic cell death, *Oncotarget.* (2017).
- [199] Z. Xing, J. Gauldie, G. Cox, H. Baumann, M. Jordana, X.F. Lei, M.K. Achong, IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses., *J. Clin. Invest.* 101 (1998) 311–320.

- [200] L. Yang, H. Wang, L. Liu, A. Xie, The Role of Insulin/IGF-1/PI3K/Akt/GSK3 β Signaling in Parkinson's Disease Dementia, *Front. Neurosci.* 12 (2018).
- [201] Q. Yang, P. Modi, T. Newcomb, C. Quéva, V. Gandhi, Idelalisib: First-in-Class PI3K Delta Inhibitor for the Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia, Small Lymphocytic Leukemia, and Follicular Lymphoma, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 21 (2015) 1537–1542.
- [202] B.G. Yipp, B. Petri, D. Salina, C.N. Jenne, B.N.V. Scott, L.D. Zbytnuik, K. Pittman, M. Asaduzzaman, K. Wu, H.C. Meijndert, S.E. Malawista, A. de Boisleury Chevance, K. Zhang, J. Conly, P. Kubes, Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo, *Nat. Med.* 18 (2012) 1386–1393.
- [203] K.L. Yong, Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) increases neutrophil migration across vascular endothelium independent of an effect on adhesion: comparison with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), *Br. J. Haematol.* 94 (1996) 40–47.
- [204] C.C. Yost, M.J. Cody, E.S. Harris, N.L. Thornton, A.M. McInturff, M.L. Martinez, N.B. Chandler, C.K. Rodesch, K.H. Albertine, C.A. Petti, A.S. Weyrich, G.A. Zimmerman, Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates, *Blood.* 113 (2009) 6419–6427.
- [205] S. Yousefi, C. Mihalache, E. Kozlowski, I. Schmid, H.U. Simon, Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps, *Cell Death Differ.* 16 (2009) 1438–1444.
- [206] G. Zambruno, V. Manca, J. Kanitakis, E. Cozzani, J.F. Nicolas, A. Giannetti, Linear IgA bullous dermatosis with autoantibodies to a 290 kd antigen of anchoring fibrils, *J. Am. Acad. Dermatol.* 31 (1994) 884–888.
- [207] L. Zhao, P.K. Vogt, Class I PI3K in oncogenic cellular transformation, *Oncogene.* 27 (2008) 5486–5496.
- [208] D. Zillikens, G.J. Giudice, BP180/type XVII collagen: its role in acquired and inherited disorders of the dermal-epidermal junction, *Arch. Dermatol. Res.* 291 (1999) 187–194.

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bieber, Katja, Shijie Sun, Norito Ishii, et al. 2010 Animal Models for Autoimmune Bullous Dermatoses: Animal Models for Autoimmune Skin Blistering Diseases. *Experimental Dermatology* 19(1): 2–11.

Abbildung 3: Witte, Mareike, Hiroshi Koga, Takashi Hashimoto, Ralf J. Ludwig, and Katja Bieber 2016 Discovering Potential Drug-Targets for Personalized Treatment of Autoimmune Disorders - What We Learn from Epidermolysis Bullosa Acquisita. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 20(8): 985–998.

Abbildung 5: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2013.00040/full>

Abbildung 15: Bachelorarbeit „Analyse Neutrophilen-modulierender Effekte mariner, natürlich vorkommender Substanzen aus dem Roten Meer“ von Luise Hartmann (2016)

Abbildung 18: aceabio.com/products/rtca-dp

8. Danksagung

Zunächst möchte ich Prof. Ralf Ludwig für die Überlassung des Themas und die herausragende Betreuung danken. Vielen Dank für den fachlichen Input in zahlreichen Lab Meetings und das stets offene Ohr bei Fragen.

Bei Dr. Katja Bieber bedanke ich mich für die wunderbare Unterstützung, geduldige Erklärungen und Präsenz bei Fragen. Vielen Dank!

Ich möchte mich herzlich bei allen Mitgliedern des LIEDs für die freundliche Atmosphäre im Labor Haus 10 und die Hilfsbereitschaft bedanken. Hier möchte ich Claudia und Astrid besonders hervorheben, die mir stets bei allen Fragen zur Seite standen und ohne die ich bei so mancher Suchaktion verzweifelt wäre. Auch möchte ich mich bei Prof. Xinhua Yu und seinem Team für die fachliche Betreuung während meiner Zeit im Forschungszentrum Borstel bedanken. Mein Dank gilt auch Prof. Laskay und seinem Team für die schnelle Einarbeitung in ihrem Labor und die Unterstützung während der Versuchsdurchführung. Ich danke dem Graduiertenkolleg 1727 „Modulation von Autoimmunität“ (GRK1727) für die Förderung durch ein Stipendium. Dies ermöglichte es mir, das Medizinstudium für die Dauer der Forschungsarbeit ruhen zu lassen und mich vollkommen auf die wissenschaftliche Arbeit zu konzentrieren. Außerdem gab es mir die Chance, meine Ergebnisse zu präsentieren, und eine Plattform, mich intensiv mit individuellen Forschern und Forscherinnen auszutauschen und anregende Diskussionen zu führen.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei den vielen Probanden bedanken, die sich freundlicherweise bereit erklärten meine Arbeit mit einer Blutprobe zu unterstützen.

Last but not least bedanke ich mich für die großartige Unterstützung meiner Freunde, vor allem meiner zwei Mitbewohnerinnen Marie und Elena, und meiner Familie für ihre andauernde Geduld und Unterstützung bei so manchen Schreibblockaden. Nicht zu vergessen sind Kerstin und Clara, mit ihnen vergingen die Inkubationszeiten im Labor sehr viel schneller.

9. Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe, dass ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe und dass ich Stellen der Arbeit, die anderen Werken im Wortlaut und Sinn nach entnommen wurden, unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht habe.

Lübeck, 27.10.2018

Hannah Zillikens

10. Lebenslauf

Name Hannah Zillikens
geb. am 20.05.1994 in Würzburg
Staatsangeh. deutsch
E-Mail hannah.zillikens@student.uni-luebeck.de



Ausbildung

2000-2004	Eichendorff Grundschule, Veitshöchheim (Würzburg)
2004-2010	Johanneum zu Lübeck (Klasse 5-10)
2010-2011	Cushing Academy, Ashburnham, Massachusetts, USA (Klasse 11, Junior Year)
2011-2013	Johanneum zu Lübeck, Hochschulreife
2013-2014	Semmelweis Universität, Budapest (1. und 2. Semester Humanmedizin)
2014-2016	Otto-von-Guericke Universität, Magdeburg (3.-5. Semester Humanmedizin)
März 2016	4-wöchige Famulatur in der Dermatologie, Universität zu Lübeck
April 2016-dato	Universität zu Lübeck (ab 6. Semester Humanmedizin)
August 2016	4-wöchige Famulatur bei einem Hausarzt in Köln
September 2016	3-wöchige Famulatur in der Anästhesie, Klinik Leverkusen
Oktober 2016-	
März 2017	Doktorarbeit im Institut für Experimentelle Dermatologie (LIED), Universität zu Lübeck, Titel des Projekts: <i>'The influence of different PI3K subunits on neutrophil activation in experimental epidermolysis bullosa acquisita'</i> , Stipendiatin der Deutschen Forschungsgemeinschaft des GRKs 1727 <i>Modulation of Autoimmunity</i>
August 2017	je 2-wöchige Famulatur in der Dermatologie und Orthopädie, University of Iowa, Iowa City, Iowa, USA
März-Juli 2018	Erasmussemester im Rahmen des Erasmus+ Programms inklusive Stipendiums, Universität Florenz, Italien

August 2018

2-wöchige Famulatur in der Plastischen Chirurgie, Universität
zu Lübeck

Lübeck, 27.10.2018

Hannah Zillikens