

**Aus dem Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie
der Universität zu Lübeck**

**Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Enno
Schmidt**

Spleen-Tyrosin-Kinase-(Syk) Inhibition in neutrophilen Granulozyten als neuer Therapieansatz in der Behandlung der Epidermolysis bullosa acquisita

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
– Aus der Sektion Medizin –

Vorgelegt von
Nina Mitschker
aus Delmenhorst

Lübeck 2021

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ralf Ludwig
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jens Meyer
Tag der mündlichen Prüfung: 03.09.2021
Zum Druck genehmigt: 03.09.2021

Promotionskommission der Sektion Medizin

**„Auf dem Feld menschlicher Entdeckungen ist das Auf-
finden des Prinzips das Wesentliche, indem sich daraus
alle weiteren Vervollkommungen nur als natürliche Fort-
bildungen ergeben.“**

Rudolf Virchow (1821-1902)

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AIBD	(engl.) Autoimmune blistering disease
APRIL	(engl.) Acidic Protein Rich in Leucine
BAFF	(engl.) B-cell activating factor of TNF family/BLyS
Bcl-10	(engl.) B-cell leukemia 10 protein
BCR	(engl.) B-cell receptor
BMZ	Basalmembranzone
BP	Bullöses Pemphigoid
BP180	180kDa Bullöses Pemphigoid-Antigen
BP230	230kDa Bullöses Pemphigoid-Antigen
BSA	Bovines Serumalbumin
C57Bl/6J	Mausstamm, schwarzer Phänotyp
C5aR	Komplement-5a-Rezeptor
Ca ²⁺	Kalziumion
CARD9	(engl.) Caspase recruitment domain-containing protein 9
C3	Komplementfaktor 3
CD	(engl.) Cluster of differentiation
CLE	Cutaner Lupus erythematosus
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
COL7	Typ VII Kollagen
CXCR	Chemokinerezeptor (CXC = Gruppe mit bestimmter Cysteinformation)
CXCL	Chemokinligand
DC	Dendritische Zellen
DEJ	Dermo-epidermale Junktionszone
DIF	Direkte Immunfluoreszenz
DNA	(engl.) deoxyribonucleic acid
DPBS	(engl.) Dulbecco's phosphate-buffered saline
Dsc	Desmocollin
Dsg	Desmoglein
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBA	Epidermolysis bullosa acquisita
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

ELISA	(engl.) enzyme-linked immunosorbent assay
engl.	englisch
FCS	(engl.) fetal calf serum
FcγR	Fc (fragment crystallisable) gamma-Rezeptoren
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fMLP	formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
g	Gramm
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunden
H&E	Hämatoxylin und Eosin
HLA	(engl.) human leukocyte antigen
IC	(engl.) Immune complex
ICAM	(engl.) Intercellular Adhesion Molecule
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IF	Immunfluoreszenz
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgG1	Immunglobulin G1
IL	Interleukin
ITAM	(engl.) immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	(engl.) immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
hColVII	humanes Typ VII Kollagen
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
MALT1	(engl.) Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein
mColVII	Murines Kollagen 7
MHC	(engl.) major histocompatibility complex
m	Meter
min	Minute

ml	Milliliter
mRNA	(engl.) messenger ribonucleic acid
n	Nummer an Versuchsdurchführung
NaCl	Natriumchlorid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NC	(engl.) non-collagenous domain
NCT	(engl.) national clinical trial
NET	(engl.) neutrophil extracellular traps
NHS	Normales Humanes Serum
NK	natürliche Killerzellen
NRS	(engl.) normal rabbit serum
PBS	(engl.) phosphate buffered saline
PBST	(engl.) phosphate buffered saline-tween
PLC	Phospholipase C
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
RNA	(engl.) ribonucleic acid
ROS	(engl.) reactive oxygen species
rpm	(engl.) revolutions per minute
Sek.	Sekunde
SH2	(engl.) Src-homology 2
SLP 76	(engl.) SH2 domain containing leukocyte protein
Src	Sarcoma; Name der Tyrosinkinase
Tab.	Tabelle
TCR	(engl.) t-cell receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TLR	(engl.) toll-like receptor
Vav	6. Buchstabe im hebräischen Alphabet
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
°C	Grad Celsius

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	iv
Abbildungsverzeichnis	x
1. Einleitung	1
1.1. Die Haut	1
1.1.1. Aufbau der Haut	2
1.1.2. Verankerungsproteine in der Haut.....	3
1.2. Blasenbildende Autoimmunerkrankungen der Haut	4
1.2.1. Epidermolysis bullosa acquisita (EBA)	8
1.3. Neutrophile Granulozyten.....	11
1.3.1. Funktion.....	11
1.3.2. Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch Fcγ-Rezeptoren	13
1.3.3. Signaltransduktion durch die Spleen-Tyrosin-Kinase in Neutrophilen	15
1.4. Ziel der Dissertation	18
2. Materialien	20
2.1. Verwendete Laborgeräte	20
2.2. Verbrauchsmaterialien	21
2.3. Chemikalien und Farbstoffe.....	24
2.4. Puffer, Lösungen, Medien	25
2.5. Verwendete Pharmaka und Antikörper.....	26
2.6. Angewandte Programme.....	26
3. Methoden	28
3.1. Verwendung von humanem Material.....	28
3.2. Versuchstiere	28
3.3. Gewinnung von humanen polymorphkernigen Zellen	29
3.4. Herstellung der Kryoschnitte	30
3.5. Vorbereiten des Syk-Inhibitors BAY 61-3606	30

3.6.	Bestimmung von freigesetzten Sauerstoffradikalen aus humanen neutrophilen Granulozyten	31
3.7.	CD66b-, CD62L-Detektion.....	32
3.8.	Dermo-epidermale Separation in Kryoschnitten	32
3.9.	Zellviabilitäts- und Toxizitätsüberprüfung an neutrophilen Granulozyten	33
3.10.	Gewinnung der Anti-Maus-Kollagen-VII-Immunglobuline	33
3.11.	Induktion von EBA mit Anti-Maus-Kollagen VII-transferierten IgGs in Mäusen und Inhibierung der Syk-Signalkaskade mit BAY 61-3606	35
3.12.	Induktion von EBA mit Anti-Maus-Kollagen-VII-transferierten IgGs in Mäusen in LysM-Cre und CD2-Cre Syk-knockout-Mäusen.....	37
3.13.	Direkte Immunfluoreszenz.....	38
3.14.	Histologische Anfärbungen.....	38
3.15.	Statistische Auswertung	38
4.	Ergebnisse.....	39
4.1.	ROS-Freisetzung aus immunkomplexstimulierten neutrophilen Granulozyten nach Zugabe des Syk-Inhibitors BAY 61-3606.....	39
4.2.	Einfluss der Syk Inhibition auf die Expression von CD66b und CD62L auf neutrophile Granulozyten	43
4.3.	Aktivität der neutrophilen Granulozyten unter Verwendung von BAY 61-3606 im ex-vivo Model der EBA	45
4.4.	Zytotoxizität von BAY 61-3606 auf neutrophile Granulozyten	47
4.5.	Die orale Applikation von BAY 61-3606 im IgG-transferierten Mausmodell	49
4.6.	Induktion der Anti-Maus-COLVII-Antikörper-transferierten EBA in myeloischen und lymphatischen Zellreihen bei zellspezifischen Syk-knockout-Mäusen	54
5.	Diskussion.....	59
5.1.	Syk-Inhibitoren in Studien.....	59
5.2.	Reduzierte Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies aus PMN durch BAY 61-3606	60
5.3.	Expression von CD66b und CD62L (L-Selektin) bei einer Syk-Inhibierung.....	61

5.4.	Hemmung der Separation an der dermo-epidermalen Junktionszone im ex-vivo Modell der EBA	62
5.5.	Toxizitätsprüfung von BAY 61-3606 auf neutrophile Granulozyten	64
5.6.	Induktion einer EBA in Mäusen durch die Injektion von mCOIVII- Antikörpern aus Kaninchen	64
5.7.	Mikroskopische Unterschiede in der EBA	67
5.8.	Spezifität der Syk-Inhibierung.....	67
5.9.	Zusammenfassung.....	69
6.	Quellenverzeichnis	70
7.	Danksagung.....	79
8.	Lebenslauf	80

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Strukturproteine in der Epidermis und Dermis	4
Abb. 2: Möglicher Therapie- Algorithmus einer EBA	10
Abb. 3: Eliminierungsmöglichkeiten pathogener Keime durch neutrophile Granulozyten.....	12
Abb. 4: Schematische Darstellung der Spleen-Tyrosin-Kinase	16
Abb. 5: Syk-abhängige Signaltransduktion der FcγR in neutrophilen Granulozyten.....	17
Abb. 6: Schematische Darstellung der Fragestellung dieser Dissertation	19
Abb. 7: Darstellung der Versuchsdurchführung des antikörpertransferierten induzierten EBA-Modells in Mäusen	37
Abb. 8: Dosisabhängige Reduktion der ROS-Produktion durch BAY 61-3606 bei Verwendung von IgG1	40
Abb. 9: Exemplarische ROS-Freisetzung aus neutrophilen Granulozyten nach Gabe von BAY 61-3606 bei Verwendung von IgG1	41
Abb. 10: Dosisabhängige Reduktion der ROS-Produktion durch BAY 61-3606 bei Verwendung von IgA1	42
Abb. 11: Exemplarische ROS-Freisetzung aus neutrophilen Granulozyten nach Gabe von BAY 61-3606 bei Verwendung von IgA1	43
Abb. 12: Repräsentative Darstellung der Expression von CD66b und CD62L	44
Abb. 13: Graphisch Darstellung der Expression von CD62L und CD66b	45
Abb. 14: Ex-vivo Modell der EBA in Kryoschnitten	46
Abb. 15: Dermo-epidermale Separation im ex-vivo Modell der EBA bei Zugabe von BAY61-3606.....	47
Abb. 16: Vitalität neutrophiler Granulozyten bei der Behandlung mit BAY61-3606.....	49
Abb. 17: Krankheitsverlauf im IgG-transferierten EBA-Modell unter der Therapie von BAY61-3606.....	50
Abb. 18: Graphische Darstellung der histologischen Entzündungsschwere an Tag 12.....	51
Abb. 19: Phänotypischer und histologischer Vergleich der IgG-transferierten EBA mit und ohne BAY 61-3606.....	53
Abb. 20: Krankheitsschwere von Mäusen im IgG-induzierten EBA-Modell bei einem Syk-Knockout in myeloischen Zellen.....	55
Abb. 21: Darstellung der phänotypischen und der histologischen Unterschiede im Wildtyp sowie nach Ausschalten der Syk-Allele in myeloischen Zellen... ..	56
Abb. 22: Krankheitsschwere von Mäusen im IgG-induzierten EBA-Modell bei einem Syk-Knockout in lymphatischen Zellen.....	57

Abb. 23: Darstellung der phänotypischen und der histologischen Unterschiede im Wildtyp sowie nach Ausschalten der Syk-Allele in lymphatischen Zellen	58
--	----

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Einteilung blasenbildender Autoimmundermatosen und deren dazugehörige Antigene	6
Tab. 2: Immunpathologische und phänotypische Charakteristika blasenbildener Autoimmundermatosen.....	7
Tab. 3: Überblick über die Fcγ-Rezeptoren und deren Expression auf den Zellen	15
Tab. 4: Beispielhafte Beurteilung der von EBA betroffenen Körperoberfläche in Prozent	36

1. Einleitung

Das Immunsystem als des eigenen Menschen Feind? Das zu glauben, war Paul Ehrlich Anfang des 20. Jahrhunderts nicht möglich, als er vom „horror autotoxicus“ sprach und damit zum Ausdruck bringen wollte, dass Autoantikörper im Immunsystem nicht existieren können (1). Die Vorstellung, der Körper könne sich selbst angreifen, wurde lange Zeit negiert. Erst mit dem wissenschaftlichen Fortschritt und den Erkenntnissen über das Immunsystem wurde das Dogma in Frage gestellt. Die klonale Selektionstheorie von Macfarlane Burnet vor etwa 60 Jahren gab in dem Verständnis von Immunologie und Autoimmunerkrankungen eine neue Richtung vor. Der Theorie nach werden selbstreaktive antikörperproduzierende Zellen in der Entwicklungsphase vom Immunsystem eliminiert, sodass normalerweise keine autoreaktiven Klone entstehen können (2).

Mittlerweile weiß man, dass der Verlust der Selbsttoleranz und selbstreaktive Lymphozyten das körpereigene Gewebe zerstören können. Aktuell zählt man etwa 100 Erkrankungen zu den Autoimmunerkrankungen, deren kumulative Prävalenz liegt bei 4,5 % (3), Tendenz steigend (4). Doch auch wenn das Verständnis der immunologischen Prozesse immer weiter anwächst, ist die Morbidität und Mortalität der Betroffenen weiterhin hoch.

In der folgenden Arbeit stand die organspezifische Autoimmunerkrankung Epidermolysis bullosa acquisita im Fokus, eine blasenbildende Hauterkrankung, die einen Prototyp einer organspezifischen Autoimmunerkrankung darstellt. Es wurde versucht, anhand des Verständnisses der Pathophysiologie einen Therapieansatz zu finden, der zukünftig die Betroffenen zwar nicht heilen, jedoch ihnen durch Symptomlinderung helfen kann.

1.1. Die Haut

Die Haut als größtes Organ des Menschen (1,5–2 m², 3,5–10 kg) hat verschiedene lebenswichtige Funktionen. Zum einen stellt sie eine mechanische Schutzfunktion und Barriere gegen Austrocknung und gegen pathogene Keime dar. Ist diese Funktion eingeschränkt, sind Infektionen die Folge, die letal sein können. Zum anderen ist sie als Sinnesorgan unentbehrlich. Durch ihre Temperaturrezeptoren schützt sie vor Verbrennungen, durch ihre Nozizeptoren stellt sie einen Schutz vor chemischen und physikalischen Einflüssen dar. Zusätzlich hat die Haut eine zentrale Bedeutung

in der Vitamin-D-Produktion und dient mit ihrer großen Austauschfläche nicht nur als Temperaturregulator, sondern auch als Stoffaustauschfläche (5). Von Hauterkrankungen betroffene Patienten sind jedoch noch einem weiteren Leidensdruck ausgesetzt, denn eine nicht intakte Haut wird oft als Zeichen von Ungepflegtheit interpretiert und von der Gesellschaft stigmatisiert. Dadurch wird die Lebensqualität neben den physischen auch durch die psychischen Belastungen stark eingeschränkt.

1.1.1. Aufbau der Haut

Die Haut besteht aus drei Schichten: Epidermis, Dermis und Subkutis, die durch Verankerungsproteine aneinandergelassen werden. In der Epidermis gibt es neben den Keratinozyten, die mit 90% den größten Zellanteil darstellen, Melanozyten, Langerhans-Zellen, Merkel-Zellen und Lymphozyten. Histologisch ist sie ein mehrschichtiges verhornendes Plattenepithel, welches sich wiederum in weitere Schichten unterteilen lässt: Die oberste Schicht wird Stratum corneum genannt. Es folgen das Stratum granulosum, das Stratum spinosum und das Stratum basale. An den Hand- und Fußsohlen gibt es zusätzlich das Stratum lucidum. Die Dermis wird in das Stratum papillare und das tiefer gelegene Stratum reticulare eingeteilt. Die vorherrschenden Zellen sind Fibroblasten bzw. Fibrozyten, die für die Produktion der Fasern und der amorphen Substanz zuständig sind. Neben diesen Zellen gibt es zahlreiche Histozyten, Mastzellen, Lymphozyten, Langerhans-Zellen und wenige Melanozyten. Die Fasern, eingebettet in die dermale Matrix, können in elastische und Kollagenfasern unterteilt werden, wobei Typ-1-Kollagen die häufigste Faser ist. Die Versorgung von Dermis und Epidermis wird über zwei Gefäßplexus in der Dermis, einen tiefen dermalen Plexus und einen oberflächlichen subpapillären Plexus, ermöglicht. Die Subkutis enthält das Fettgewebe sowie die epifaszial laufenden größeren Gefäße und Nerven. Zusätzlich finden sich hier die für das Vibrationsempfinden notwendigen Vater-Pacini-Tastkörperchen.

Zu den Hautanhangsgebilden, d.h. Strukturen, die sich aus Zellen der Epidermis bilden, zählen Haare und Nägel, Talgdrüsen sowie apokrine und ekkrine Drüsen. Die apokrinen Drüsen sind Bestandteil der Haarfollikel und sezernieren ein fettiges Sekret, welches durch bakterielle Zersetzung zur Geruchsbildung führt. Ekkrine Drüsen produzieren eine wässrige Salzlösung – den geruchlosen Schweiß – und kommen im Gegensatz zu den apokrinen Drüsen, die v.a. im Anogenitalbereich und

der Axilla vorkommen, am gesamten Integument vor. Ebenfalls am gesamten Integument vorkommend sind Talgdrüsen, die an den Haarfollikeln münden (5).

1.1.2. Verankerungsproteine in der Haut

Desmosomen und Hemidesmosomen sind wichtige Verankerungsproteine in der Haut und binden über Aktin- und Intermediärfilamente an die Keratinfilamente des Zytoskeletts der Epithelzellen. Dabei verbinden Desmosomen Epithelzellen untereinander, während Hemidesmosomen Epithelzellen mit der Basalmembran verankern. Desmosomen sind Strukturproteine aus zwei Anteilen: Transmembranös liegen die Ca^{2+} -abhängigen sogenannten Cadherine. Hierzu zählen Desmogleine und Desmocolline. Intrazellulär liegen desmosomale Plaques, an welche die Cadherine binden.

Neben einer stabilen Adhäsion innerhalb der Epidermis ist diese ebenfalls zwischen Epidermis und Dermis notwendig. Dieses wird über Verankerungsproteine in der dermo-epidermalen-Junktionszone (DEJ) gewährleistet. Die DEJ kann in drei Zonen eingeteilt werden: die Lamina lucida, die Lamina densa und die Sublamina densa. An die aus den Proteinen BP180 und Plectin bestehenden hemidesmosomale Plaques, die an den basalen Keratinozyten liegen, binden transmembranöse Ankerfilamente. Deren extrazellulärer Anteil ist in der Lamina lucida lokalisiert, der intrazelluläre Anteil – bestehend aus den Proteinen BP 180 und $\alpha 6\beta 4$ -Filament – bindet an die hemidesmosomalen Plaques. In der Lamina densa ist das Typ IV Kollagen ein wichtiger Bestandteil, während in der Sublamina densa das Typ VII Kollagen vorherrschend ist. Auch hier gibt es weitere Ankerfilamente, die für die Stabilität und Adhäsion der Hautschichten unabdingbar sind (s. Abb.1) (6).

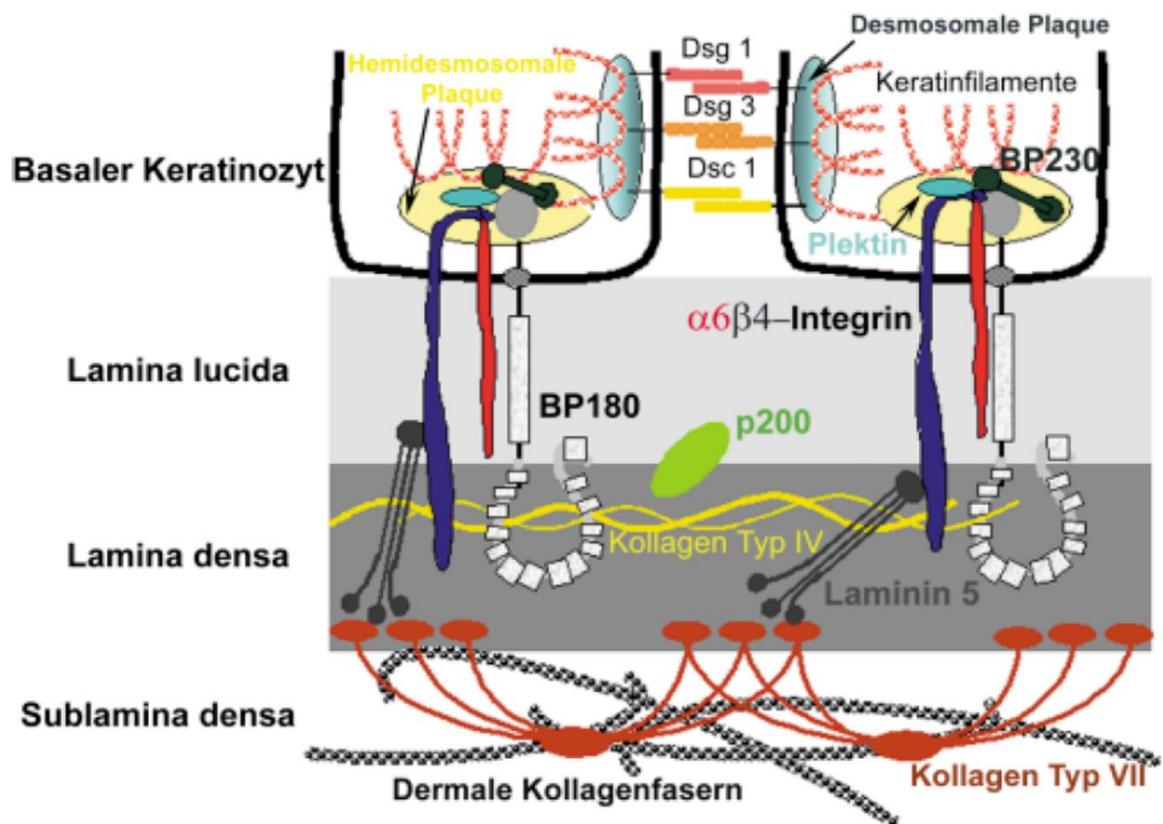


Abb. 1: Strukturproteine in der Epidermis und Dermis

(Aus Sitaru et al. 2004 (6)) Die Keratinozyten sind untereinander mit Desmosomen verknüpft, die Dermis hingegen ist über Hemidesmosomen in der sogenannten dermo-epidermalen-Junktionszone mit der Epidermis verknüpft. Dadurch ist eine stabile Adhäsion der Hautzellen und Hautschichten gewährleistet (DSC: Desmocollin, DSG: Desmoglein, BP: bullöses Pemphigoid)

1.2. Blasenbildende Autoimmunerkrankungen der Haut

Der Begriff Autoimmunität soll aufgrund der Komplexität an dieser Stelle nur kurz erläutert werden: Ein Zusammenspiel von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen führt dazu, dass die Selbsttoleranz gegenüber körpereigenen Strukturen verloren geht. In der Regel werden Lymphozyten, die körpereigene Strukturen angreifen, vorzeitig eliminiert. Dennoch existiert auch bei gesunden Menschen eine gewisse Anzahl an Lymphozyten, die eine geringe Affinität zu Autoantigenen besitzen und die unerlässlich für das Funktionieren des angeborenen Immunsystems sind. Durch sogenannte Selbsttoleranzmechanismen kann der Ausbruch einer Autoimmunerkrankung verhindert werden. Bei genetischer Prädisposition und einem zusätzlichen Trigger, wie z.B. einer Infektion, kann allerdings das komplexe Kontrollsystem aus-

fallen, der Stimulus die Affinität zu Autoantigenen erhöhen und letztlich eine Autoimmunerkrankung ausbrechen. An der Gewebszerstörung und Entzündungsreaktion sind autoreaktive B-, und T- Zellen, ebenso wie Antikörper beteiligt (7).

Blasenbildende Autoimmunerkrankungen lassen sich dadurch charakterisieren, dass Antikörper gegen Zielantigene in der Haut und/oder Schleimhäute produziert werden. Zu den blasenbildenden Autoimmundermatosen zählen die Pemphigus-Gruppe, die Pemphigoid-Gruppe, Epidermolysis bullosa acquisita, Dermatitis herpetiformis Dühring und der bullöse systemische Lupus erythematoses. Sie lassen sich sowohl anhand der Zielantigene als auch anhand der Lokalisation der Blasenbildung und des klinischen Erscheinungsbildes unterscheiden (s. Tabelle 1, 2) (6). Die Zielantigene sind Strukturen in der Haut, die für Zell-Zell-Kontakte und die Adhäsion der Epidermis an die Dermis notwendig sind und die im Detail bereits oben beschrieben worden sind. Da die Zielantigene der Pemphigus-Gruppe zwischen den Epithelzellen liegen, kommt es durch die Immunreaktion zur intraepidermalen Blasenbildung. Die Zielantigene der anderen genannten Gruppen liegen hingegen unterhalb der Epidermis und führen zur subepidermalen Blasenbildung.

Blasenbildung	Erkrankung	Zielantigen
intraepidermal	Pemphigus-Gruppe	
	Pemphigus vulgaris	Dsg 1 Dsg 3
	Pemphigus foliaceus	Dsg 1
	IgA- Pemphigus	Dsc 1 Dsg 3
	Paraneoplastischer Pemphigus	Dsg 1 Dsg 3
		Verschiedene Plaktine
subepidermal	Pemphigoid-Gruppe (Auswahl)	
	Bullöses Pemphigoid	BP 180 BP 230
	Pemphigoid gestationis	BP 180 BP 230
	Lineare IgA- Dermatose	LAD-1 BP 230
	p200 Pemphigoid	p200
	Epidermolysis bullosa acquisita	Typ VII Kollagen
	Dermatitis herpetiformis Duhring	Transglutaminase

Tab. 1: Einteilung blasenbildender Autoimmundermatosen und deren dazugehörige Antigene

Dsg: Desmoglein, Dsc: Desmocollin, BP180: 180kDa Bullöses Pemphigoid-Antigen, BP 230: 230kDa Bullöses Pemphigoid-Antigen Bullöses Pemphigoid, LAD: linear IgA dermatosis antigen. (5,6,8)

Erkrankung	Charakteristika	indirekte IF	direkte IF
Pemphigus-Gruppe			
	positives Nikolskyzeichen		
Pemphigus vulgaris	fast immer Schleimhautbefall	interzellulär: IgG	Interzellulär: IgG und C3
Pemphigus foliaceus	ohne Schleimhautbefall	interzellulär: IgG	Interzellulär: IgG und C3
IgA-Pemphigus		interzellulär: IgA	Interzellulär: IgA und C3
paraneoplastischer Pemphigus	z.B. Bronchial-CA, Lymphom	interzellulär: IgG	Interzellulär, DEJ: IgG und C3
Pemphigoid-Gruppe			
	negatives Nikolskyzeichen		
Bullöses Pemphigoid	Spannungsblasen und Erosionen	IgG epidermal	DEJ: linear C3 und IgG
Pemphigoid gestationis	während oder nach der Schwangerschaft	komplementfixierende IgG epidermal	DEJ: linear C3 und IgG
Lineare IgA-Dermatose	Spannungsblasen und Erosionen	IgA epidermal	DEJ: linear C3 und IgA
Schleimhautpemphigoid	Prädominantes Auftreten an der Mukosa	IgG, IgA epidermal oder dermal	DEJ: linear IgG, IgA und C3
p200 Pemphigoid	pralle Blasen	IgG dermal	DEJ: linear IgG und C3
Epidermolysis bullosa acquisita	Mechanobullöse und entzündliche Form	IgG, IgA dermal	DEJ: linear IgG, IgA, C3
Dermatitis herpetiformis Duhring	gehäuftes Auftreten bei Zöliakie	IgG gegen Endomysium	dermale Papillen: granuläre IgA-Ablagerungen

Tab. 2: Immunpathologische und phänotypische Charakteristika blasenbildender Autoimmundermatosen (5,6,8)

1.2.1. Epidermolysis bullosa acquisita (EBA)

Die EBA ist eine seltene blasenbildende Autoimmunerkrankung der Haut, verursacht durch eine Antikörperbildung gegen Typ VII Kollagen, infolgedessen es zu einer subepidermalen Blasenbildung kommt (9). Erwähnt wurde EBA erstmals 1895 von Elliott (10). Das klinische Bild der EBA ist vielseitig, lässt sich jedoch prinzipiell in zwei Formen einteilen: den nicht-inflammatorischen/ klassischen Typ und den inflammatorischen Typ. Diese Einteilung beruht auf der Klinik der Erkrankung, welche entweder EBA-typisch sein kann oder aber andere blasenbildende Autoimmunerkrankungen der Haut imitiert. Der Phänotyp kann sich im Krankheitsverlauf wandeln und verschiedene Ausprägungen und Schweregrade annehmen.

Am häufigsten, in zwei Drittel der Fälle, lässt sich der inflammatorische Typ beobachten. Dieser Typ zeigt ein ähnliches klinisches Bild anderer blasenbildender Autoimmunerkrankungen der Haut wie das bullöse Pemphigoid und die lineare IgA-Dermatose und kann so zu Fehldiagnosen führen. In entzündeten Hautarealen kommt es zur spontanen Blasenbildung. Besonders betroffen sind Regionen wie die Leiste, der Nacken sowie die Axilla. Zusätzlich leiden die Patienten häufig an Pruritus. Eine narbenlose Ausheilung folgt.

In einem Drittel der Fälle tritt der nicht-inflammatorische Typ auf, der sich phänotypisch mit spannungs- und traumatisch-induzierten Blasen, Erosionen, Milien, spröder Haut und narbiger Ausheilung zeigt. Betroffen sind die Körperregionen auf Seiten der Extensoren wie Knie und Ellenbogen sowie dorsale Handflächen. Begleitend können eine Nageldystrophie sowie eine narbige Alopezie auftreten. Eine postinflammatorische Hyper- oder Hypopigmentierung ist möglich. Beim nicht-inflammatorischen Typ tritt kein Erythem auf.

EBA betrifft nicht nur die Haut, sondern kann sich auch extrakutan an der Mukosa manifestieren: vaginal, anal, oral, okkular sowie gastrointestinal können Schleimhäutläsionen auftreten und zu schweren Komplikationen wie Ösophagusstrikturen und Verlust des Sehvermögens führen (9,11).

Pathophysiologisch kommt es aus nicht geklärter Ursache zu einem Toleranzverlust gegen COL7, infolgedessen IgG- und zum Teil IgA-Autoantikörper gebildet werden und dieses zu einer subepidermalen Separation führt (9). COL7 wurde erstmals 1983 beschrieben (12) und stellt einen Hauptbestandteil der sogenannten Verankerungsfasern in der Haut dar (13). Unterhalb der Lamina densa in der Basalmembran gelegen, fungiert es als Bindeglied zwischen der Epidermis und Dermis (14). COL7

setzt aus drei identischen α -Ketten zusammen, wobei jede α -Kette aus einer zentralen Kollagen-Domäne besteht und welche zusammen eine Tripelhelix bilden. Terminiert wird die Helix von einer sogenannten „non-collagenous amino-terminal domain“ (NC1) und einer C-terminalen NC2-Domäne [8]. COL7 befindet sich auf dem Chromosom 3 (3p21) und hat eine Masse von insgesamt 290 kDa (15).

Im Rahmen der EBA binden die Autoantikörper vor allem an Epitope in der NC1-Domäne, welche in der Lamina densa lokalisiert ist (16,17), während sie nur in seltenen Fällen an Epitope der NC2-Domäne, die sich in der Dermis befindet (18), oder an die Tripelhelix binden (19).

In unterschiedlichen in-vitro und in-vivo Modellen wurde versucht, den Pathomechanismus der Blasenbildung durch die Autoantikörper zu erklären (20). Die an das Antigen Kollagen VII bindenden Autoantikörper aktivieren das Komplement-System – insbesondere den „alternative pathway“ – wodurch proinflammatorische Cytokine wie IL-1 freigesetzt werden. Dadurch wiederum werden neutrophile Granulozyten in die Haut rekrutiert (21,22). Anhand von menschlichen Kryoschnitten, die mit Seren von EBA-Patienten inkubiert werden, sowie in Tiermodellen (23) zeigt sich eine Fc γ -Rezeptor abhängige Aktivierung von Neutrophilen, die zu einer Separation der Epidermis von der Dermis führen (24). In den aktivierten neutrophilen Granulozyten werden radikale Sauerstoffspezies durch die NADPH-Oxidase generiert, die eine Gewebeschädigung verursachen (25). Ebenso scheinen die Elastase and Gelatinase B durch ihre Proteolysefähigkeit in eine dermal-epidermalen Separation zu resultieren (26). Dabei steigern T-Zellen die Rekrutierung und das Überleben der neutrophilen Granulozyten (27).

Die jährliche Inzidenz der EBA beträgt zwischen 0,2 bis 0,5 pro einer Million Einwohner, wobei laut Studien die Inzidenz in Singapur höher als in Frankreich und Deutschland ist. In Deutschland liegt die Prävalenz aktuell bei 2,8 Fällen pro einer Million Einwohner (28–31).

1988 konnte anhand einer Studie mit 29 EBA-Patienten eine Assoziation mit HLA-DR gezeigt werden (32). Weiterhin ist EBA mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert, trifft jedoch häufiger bei Patienten mit Morbus Crohn als mit Colitis ulcerosa auf (33). In einem Fall wurde berichtet, dass über eine plazentäre Übertragung von IgG-Antikörpern gegen Typ VII Kollagen der Mutter eine EBA im Kind induziert wurde (34).

Ebenso wie für andere blasenbildende Autoimmunerkrankungen ist eine langfristige Remission von EBA unter den bisher verfügbaren Therapeutika häufig schwer zu erreichen. Zunächst werden die Patienten mit systemischen Corticosteroiden behandelt, jedoch werden meist gleichzeitig andere Immunsuppressiva bzw. -modulatoren zur Reduktion der Corticosteroiddosis verwendet. Insbesondere zählen Colchicin und Dapsone zu den Therapeutika erster Wahl (11,35).

In therapierefraktären Fällen werden weitere Therapieversuche initiiert. Eine Therapie mit intravenös verabreichten Immunglobulinen (IVIg) zeigte ebenso wie Rituximab kombiniert mit intravenösem Immunglobulin eine signifikante Reduktion der klinischen Manifestation von EBA (36–38). Es wurde von einem Fall berichtet, in dem unter der Therapie von Minocyclin, einem tetrazyklischen Antibiotikum, eine Remission erreicht werden konnte (39). Zudem konnten in therapieresistenten Fällen durch eine extrakorporale Photochemotherapie Therapieerfolge verzeichnet werden (40).

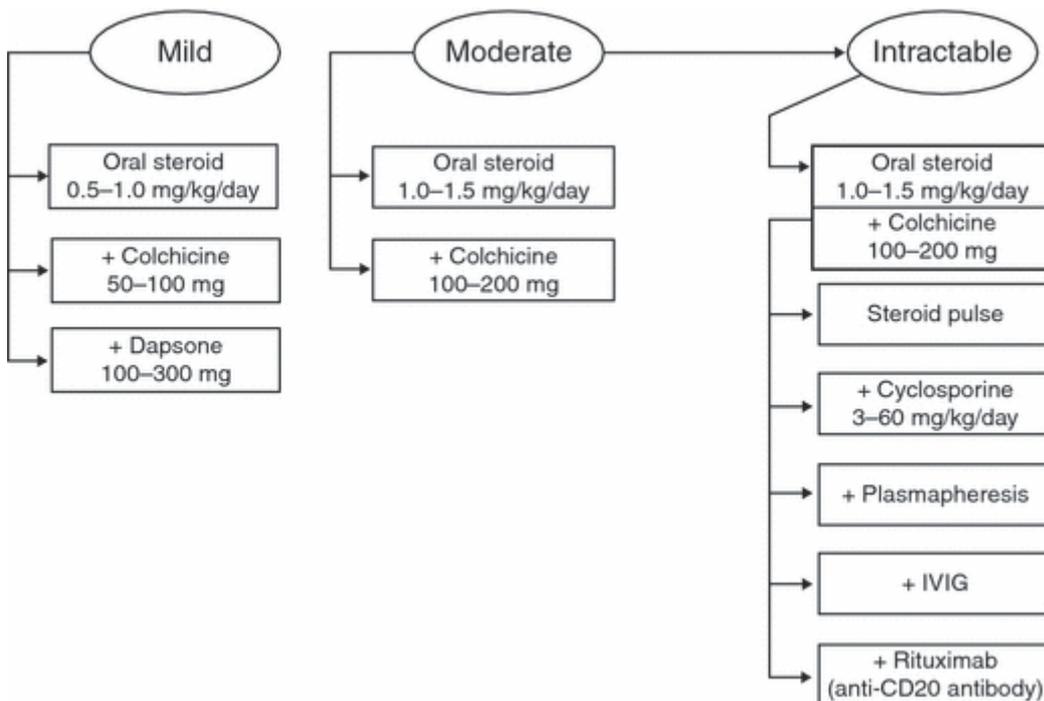


Abb. 2: Möglicher Therapie- Algorithmus einer EBA

(nach Ishii et al.2010)(35)

1.3. Neutrophile Granulozyten

1.3.1. Funktion

50-70% der weißen Blutzellen sind neutrophile Granulozyten – auch genannt Neutrophile oder polymorphkernige Leukozyten – die besonders für die schnelle Abwehr gegen pathogene Mikroorganismen eine zentrale Rolle spielen (41). Während sie lange Zeit nur als schnell destruierende Zellen der angeborenen Immunabwehr betrachtet worden waren, konnten in den letzten Jahren viele neue Erkenntnisse über die Funktionen der Zellen gewonnen werden, die zu dem Schluss führten, dass sie bei inflammatorischen und allergischen Prozessen ebenso wie bei der Entstehung der Artherosklerose und anderen Erkrankungen beteiligt sind (42). Sie rücken immer mehr in den Fokus bei chronischen und akuten Entzündungen sowie bei Autoimmunerkrankungen, in denen sie durch eine Hyperreagibilität Schäden an körpereigenen Strukturen verursachen. Auf der anderen Seite kann jedoch ein Mangel an funktionsfähigen Neutrophilen zu lebensbedrohlichen Infektionen führen (41). Gebildet werden Neutrophile im Knochenmark, aus dem sie als ausgereifte Zellen in den Blutkreislauf freigesetzt werden (43). Die Freisetzung wird durch Chemokinrezeptoren und ihren Liganden, im Speziellen CXCR2, CXCR4 (CXCL1 und -2 und CXCL12) (44,45) sowie G-CSF (46), reguliert. Im Blut zirkulieren sie für etwa sechs bis acht Stunden, ehe sie durch den programmierten Zelltod, die sogenannte Apoptose, wieder eliminiert werden (47).

Zur Aktivierung kommt es durch Zytokine, insbesondere IL-1 β , IL-6 und TNF α , Chemokine und bakterielle Produkte wie Lipopolysaccharid (LPS) und fMLP, die eine Expression von Adhäsionsmolekülen auf den des Entzündungsgeschehens nahe gelegenen Endothelzellen induzieren (48). Diese Moleküle, P- und E-Selektine sowie ICAMs, werden von den sich auf der Oberfläche der zirkulierenden Neutrophilen befindlichen stets exprimierten L-Selektinen und P-Selektin-Glykoproteinliganden-1 (PSGL-1) erkannt und führen neben dem charakteristischen „Rollens“ zu einer Aktivierung von für die weiteren Abwehrschritte notwendigen Kinasen wie Syk und Phosphoinosit-3-Kinase (PI3K). Während des „Rollens“ entlang des Endothels werden β 2-Selektine auf der Neutrophilenoberfläche exprimiert, die letztlich die Adhäsion der Zellen an das Endothel herbeiführen, wodurch die transendotheliale Migration ermöglicht wird. Chemische und inflammatorische Lockstoffe im Interstitium leiten dann die Neutrophilen zum Entzündungsgeschehen. Gleichzeitig werden

durch diese Moleküle Signalkaskaden in den neutrophilen Granulozyten aktiviert, woraufhin das Repertoire an Abwehrmechanismen entfaltet werden kann (49). Die neutrophilen Granulozyten phagozytieren die Pathogene und töten diese mithilfe der durch die NADPH-Oxidase generierten ROS (reaktive oxygen species) oder der in den Granula enthaltenen Enzyme ab. Weitere Möglichkeiten zur Eliminierung stellen die Degranulation sowie die Bildung sogenannter neutrophil extracellular traps (NETs) dar (50). Dabei stoßen die Zellen neben den Granula auch das Chromatin aus dem Zellkern ab, woraus sich eine extrazelluläre Matrix formiert, welche Pathogene bindet und an der Ausbreitung hindert. Dieser Prozess wird als NETosis bezeichnet (50,51) und dient besonders der Eliminierung größerer Pathogene wie Mykobakterien und Pilzen, während kleinere Erreger durch die schneller ablaufende Phagozytose getötet werden, was gleichzeitig zur Hemmung der NETosis führt (52). Allerdings scheinen NETs auch an der antiviralen Bekämpfung beteiligt zu sein (53).

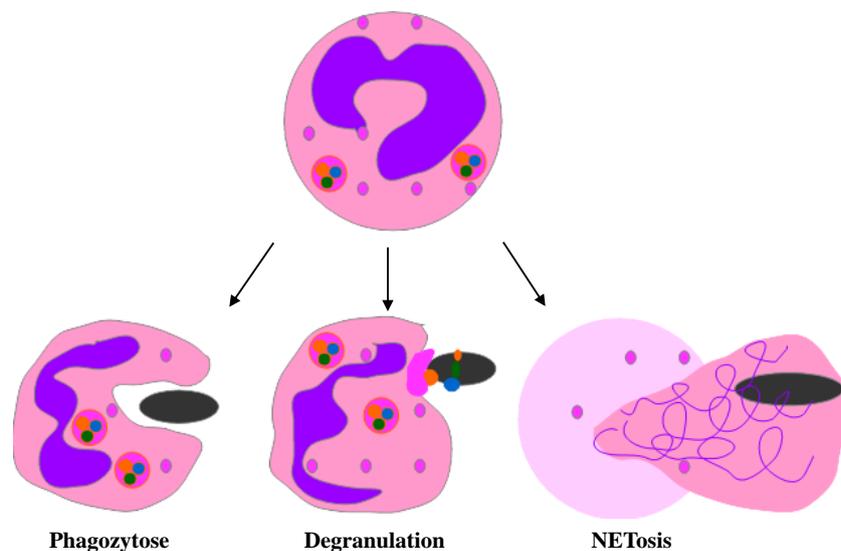


Abb. 3: Eliminierungsmöglichkeiten pathogener Keime durch neutrophile Granulozyten

(modifiziert nach Kolaczowska und Kubes (54)) Neutrophile Granulozyten können entweder Pathogene phagozytieren, durch Degranulation ihrer Granula zerstören oder durch Ausstoßen von Chromatin unschädlich machen.

Bei den oben erwähnten Granula handelt es sich um intrazelluläre Kompartimente, in denen neutrophile Granulozyten unterschiedliche Enzyme und Proteine anrei-

chern. Die Granula können je nach Inhalt und Reifungsprozess in vier Klassen eingeteilt werden: die azurophilen oder primären Granula, die spezifischen – sekundären – Granula, die gelatinasehaltigen Granula und die sekretorischen Vesikel, welche als Erstes mobilisiert werden. Neben der direkten antimikrobiellen Wirkung auf die Keime haben die Granula auch indirekte Funktionen für die Abwehr, wie z.B. durch die Exozytose von Gelatinase zum Durchdringen von Typ IV Kollagen (55)(47,56).

Zwar gehören neutrophile Granulozyten zu dem angeborenen Immunsystem, trotzdem darf nicht außer Acht gelassen werden, dass es notwendige Interaktionen mit den Zellen des erworbenen Immunsystems gibt, deren Analyse Bestandteil aktueller Forschung ist. Durch die Entleerung der Granula im entzündlichen Gewebe werden die T-Zell- stimulierenden Zytokine, IL-1 und IL-6 durch die Elastasen und Cathepsin G inaktiviert, die ROS- Produktion und die Arginasen führen zu einer Herunterregulierung der TCR ζ auf T-Zellen. Durch die Arginasen liegt weniger L-Arginin vor, welches für Proliferations- und Zellaktivierungsprozesse notwendig ist (57).

In Mausmodellen konnte weiterhin eine Interaktion zwischen B- Zellen und Neutrophilen in Lymphknoten und primären Lymphorganen beobachtet werden. Hier können die Granulozyten durch die Freisetzung von BAFF, APRIL und IL-21 an der Antikörperproduktion und dem „Switching“ der B- Zellen mitwirken (57).

1.3.2. Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch Fc γ -Rezeptoren

Auf der Zelloberfläche der neutrophilen Granulozyten wird eine Vielzahl an Rezeptoren exprimiert. Zu den wichtigsten Rezeptorklassen zählen die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die Adhäsionsrezeptoren, Cytokinerezeptoren, Rezeptoren für das angeborene Immunsystem wie Toll-like-Rezeptoren und Fc-Rezeptoren (58).

Die Fc-Rezeptoren werden in Fc α -, Fc γ - und Fc ϵ - Rezeptoren gegliedert. Die Fc γ -Rezeptoren werden wiederum weiter in drei Hauptklassen unterteilt: Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) und Fc γ RIII (CD16). Mäuse besitzen überdies einen mFc γ RIV (59) (60). Diese Rezeptoren interagieren mit dem Fc-Anteil der IgG-Antikörper und initiieren durch ihre strukturelle Heterogenität unterschiedliche Signalprozesse in den Zellen. Während in Mäusen die Stimulierung eines Rezeptors (Fc γ RIII, Fc γ RIV) zur Aktivierung der Neutrophilen ausreicht, ist beim Menschen die Stimulierung zweier Rezeptoren notwendig (61). Die Subklassen der Klasse IIB hingegen (Fc γ RII-B1

und Fc γ RII-B2) fungieren über ITIMs (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs) als inhibitorische Rezeptoren und regulieren so die Stimulierbarkeit der Zellen hinunter (62,63).

Bis auf den Fc γ IIA-Rezeptor und den Fc γ IIIB-Rezeptor sind die Fc-Rezeptoren mit transmembranen Adapterproteinen, den γ -Untereinheiten, assoziiert, welche Regionen mit aktivierenden ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) enthalten, die zur Aktivierung von Signalkaskaden durch Kinasen führen. Die Fc γ IIA- und Fc γ RIIB-Rezeptoren enthalten die ITAM- bzw. ITIM-Region im eigenen zytoplasmatischen Rezeptoranteil (58,64), (65).

Fc γ -Rezeptoren besitzen eine unterschiedlich hohe Affinität zu Immunglobulinen und eine unterschiedliche Expression auf den Zellen. Durch z.B. IFN- γ kann die Expression von Fc γ RI auf der Zelloberfläche induziert werden (66). Die Avidität der Rezeptoren zu den Immunglobulinen wird erst dann erhöht, wenn die Antikörper an die Antigene binden. So wird verhindert, dass eine Immunreaktion durch frei zirkulierende Immunglobuline ausgelöst wird (7).

	FcγRI	FcγRIIA	FcγRIIC	FcγRIIIA	FcγRIIIB	FcγRIIB
	aktivie- rend	aktivie- rend	aktivie- rend	aktivie- rend	aktivie- rend	inhibie- rend
Ex- pres- sion	Neutro- phile Eosinophile Monozyten Makropha- gen DC	Neutro- phile Monozyten Makropha- gen DC Thrombozy- ten	NK-Zellen	Monozyten Makropha- gen DC NK-Zellen	Neutro- phile Eosinophile Mastzellen	Neutro- phile Basophile Mastzellen Monozyten Makropha- gen DC B-Zellen Plamazel- len
Affini- tät	hoch	gering	gering	gering	gering	gering
Phos- phory- lierung	ITAM (γ- Kette)	ITAM (Rezep- tor)	ITAM (γ- Kette)	ITAM (γ- Kette)	GPI-Re- zeptor	ITIM

Tab. 3: **Überblick über die Fcγ-Rezeptoren und deren Expression auf den Zellen**

(Modifiziert nach Smith und Clatworthy [40]) Bis auf den FcγRIIB haben alle Rezeptoren eine aktivierende Funktion auf die Zelle. Der FcγRI besitzt eine hohe Affinität zu IgG und bindet somit auch an Monomere, während die anderen Rezeptoren nur eine geringe Affinität aufweisen und damit nur an IgG in Immunkomplexen binden. Durch Bindung an die Rezeptoren werden in bestimmten Regionen, die entweder in der assoziierten γ-Kette oder in der zytoplasmatischen Domäne liegen, Tyrosine phosphoryliert, die damit Signalkaskaden aktivieren. DC: dendritic cells; GPI: Glycosylphosphatidylinositol

1.3.3. Signaltransduktion durch die Spleen-Tyrosin-Kinase in Neutrophilen

Das menschliche Genom verschlüsselt für etwa 90 verschiedene Tyrosinkinasen, die in Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen und Rezeptor-Tyrosinkinasen eingeteilt werden. Die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen, zu denen 32 Kinasen gezählt werden, können in zehn Subfamilien untergliedert werden. Die größte Subfamilie mit insgesamt acht Kinasen stellt die Src-Subfamilie dar (67,68). Eine Subfamilie bildet die Syk (Spleen-tyrosin-kinase)-Gruppe mit zwei Kinasen (Syk und Zeta-chain-associated protein kinase 70 (ZAP-70), die in Säugetieren exprimiert werden (69). Im Folgenden beziehen sich alle Erläuterungen nur auf die Syk-Kinase und nicht auf ZAP-70. Syk ist eine zytoplasmatische Kinase, die sowohl in lymphatischen als auch myeloischen Stammzellen exprimiert wird und in Signalkaskaden von Immunrezeptoren ebenso wie von Integrinen involviert ist. Sie besitzt zwei N-terminale SH2-

Domänen, die an die in Rezeptoren enthaltenen phosphorylierten Tyrosine in sogenannten ITAMS binden und so zur Aktivierung der Kinase führen (s. Abb.4). Die Motifs der ITAMs enthalten immer die gleiche Sequenz (pYxxI/L; Y= Tyrosin, I= Iso-leucin, L= Leucin), die durch 7-12 Aminosäuren voneinander getrennt sind. Die N-terminale SH2-Domäne von Syk bindet an das C-terminal gelegene pYxxL/I Motiv, die C-terminale SH2-Domäne an das N-terminal gelegene pYxxL/I Motiv (70). Dabei unterscheidet sich das humane Syk nicht vom murinen Syk. Im inaktiven Zustand zeigt die Zwischendomäne A eine ungeordnete Struktur, die durch Bindung an die ITAMs in einen geordneten Zustand übergeht. Allerdings bleibt dabei eine gewisse Flexibilität erhalten, die es wahrscheinlich der Kinase ermöglicht, an ITAM- Variationen zu binden (68). Alternativ ist eine Aktivierung von Syk durch direkte Phosphorylierung (Autophosphorylierung oder Phosphorylierung durch andere Kinasen, z.B. aus der Src-Familie) möglich. Da beide Aktivierungswege die gleiche Enzymaktivität herbeiführen, spricht man auch von einem „Or-gate-switch“-Molekül (71).

Die aktivierte Syk-Kinase phosphoryliert Substrate wie Vav, SLP-76 und die PLC γ 1 und 2, was zum Ca²⁺-Einstrom, einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und damit zur Gentranskription, zur Degranulation, ROS-Produktion und Freisetzung von Mediatoren führt (s. Abb.5) (61,72). Damit hat sich Syk in den letzten Jahren zu einem beliebten Forschungsgegenstand in der Entwicklung neuer Therapieansätze in allergischen, autoimmunologischen und chronisch entzündlichen Erkrankungen etabliert (73,74).



Abb. 4: **Schematische Darstellung der Spleen-Tyrosin-Kinase**

Über die N-terminal gelegenen SH2-Domänen interagiert die Kinase mit den ITAMs. Die Zwischendomäne A (inter-SH2 linker) verbindet die beiden SH2-Domänen. Die Zwischendomäne B (SH2-kinase linker) verbindet die SH2-Domäne mit der Kinase und trägt einen „activation loop“ für die Kinase. In dieser Zwischendomäne sowie in der C-terminal gelegenen Kinase liegen wichtige regulatorische Tyrosine (68).

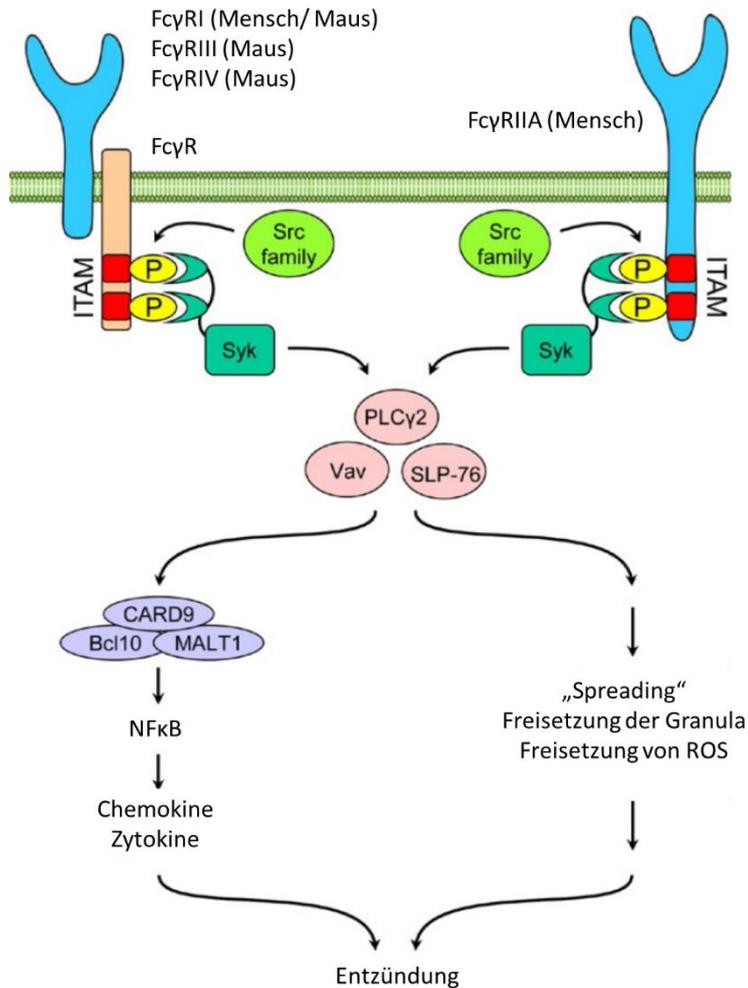


Abb. 5: **Syk-abhängige Signaltransduktion der FcγR in neutrophilen Granulozyten**

(Modifiziert nach Futosi und Moscai (61)) Syk wird über zwei „tandem“ SH2-Domänen durch die ITAMs aktiviert, in denen zwei phosphorylierte Tyrosine vorliegen, und löst dadurch Signalkaskaden aus, die NFκB-abhängig und -unabhängig zur Entzündungsreaktion führen. P: Phosphatrest, PLC: Phospholipase C, Vav: The ‘onc F’ proto-oncogene (6. Buchstabe im hebräischen Alphabet), SLP-7: SH2 domain-containing leukocyte protein, CARD 9: Caspase recruitment domain-containing protein 9, Bcl10: B-cell lymphoma 10, MALT1: Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1, NFκB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell

1.4. Ziel der Dissertation

Autoimmunerkrankungen, und damit AIBDs inbegriffen, werden oftmals mittels un-spezifischer und/oder zytotoxischer Pharmazeutika behandelt, die zu unerwünschten Nebenwirkungen oder nicht ausreichender Remission führen. Eine Heilung durch gezielte Modulation des Immunsystems zu erreichen, ist bisher nicht gelungen, jedoch Ziel vieler Forschungsgruppen. Es konnten unter immunsuppressiver Therapie zwar Remissionen beobachtet werden, die zur Remission führenden Prozesse sind jedoch noch nicht ausreichend erklärt.

In dieser Arbeit wurde versucht –basierend auf Erkenntnissen der Pathophysiologie – die Immunreaktion in EBA durch Immunmodulation zu mindern. Als Target wurde dabei Syk gewählt. Mittels in-vitro und in-vivo Versuchen wurden die Auswirkungen der Syk-Inhibierung auf die Aktivität humaner und muriner neutrophiler Granulozyten sowie auf den Krankheitsverlauf in Mausmodellen untersucht.

Die Inhibierung von Syk als therapeutische Zielstruktur in EBA wurde gewählt (s. Abb.6), da

- gezeigt werden konnte, dass die Expression der mRNA von Syk in der Haut von Mäusen mit experimenteller EBA erhöht ist (75),
- neutrophile Granulozyten durch die ROS-Produktion zur Blasenbildung führen,
- Syk über den Fcγ-Rezeptor eine zentrale Bedeutung in der Signaltransduktion in neutrophilen Granulozyten hat,
- in chronischen Entzündungen sowie in Autoimmunerkrankungen jenseits der EBA die Syk-Inhibierung erfolgversprechende Ergebnisse zeigte.

Mit dieser Arbeit sollen folgende Hypothesen überprüft werden:

- Spezifische Syk-Inhibierung führt zu einer verringerten ROS-Produktion,
- wodurch eine Separation an der DEJ reduziert werden kann,
- sodass das phänotypische Bild der EBA weniger ausgeprägt ist.
- Spezifische Syk-Inhibitoren als neuer Therapieansatz in der Behandlung einer EBA in Betracht gezogen werden sollten

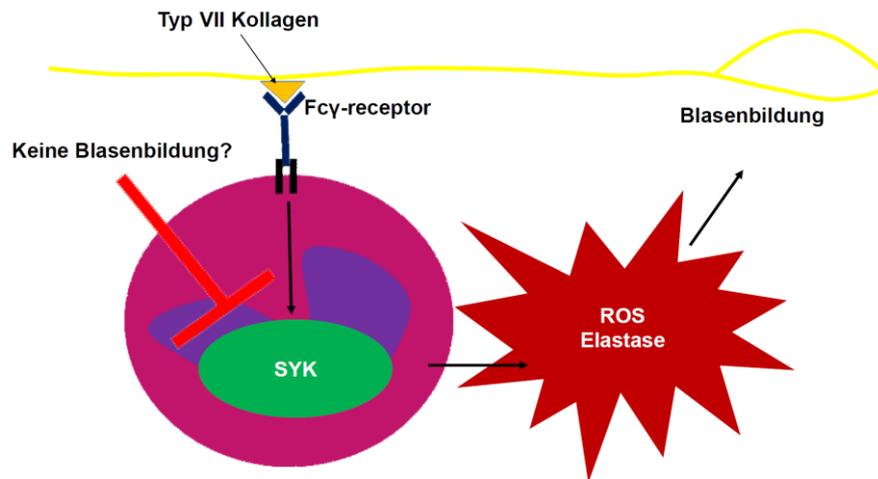


Abb. 6: **Schematische Darstellung der Fragestellung dieser Dissertation**

Kann durch die spezifische Inhibierung der Spleen-Tyrosin-Kinase die Signaltransduktion über den Fc- γ -Rezeptor reduziert werden und damit durch die verminderte Freisetzung von ROS die Krankheitsschwere gelindert werden?

2. Materialien

2.1. Verwendete Laborgeräte

Airsterilisator US PATS	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Analysenwaage Analytical Plus	Ohaus Corporation, New Jersey, USA
Begasungsbrutschrank	Heraerus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Biophotometer 8,5 mm	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Bio Vortex V1	lab4you GmbH, Berlin, Deutschland
Centrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5804R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eindeckautomat Leica CV 5030	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Elektrische Feinwaage PT 150	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
ELISA Plattenreiniger	TECAN, Männedorf, Schweiz
Eppendorf Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Gefrierkombination (+ 4 °C, -20 °C)	Liebherr International AG, Bulle, Schweiz
Gefriertruhe C660 (-80 °C)	New Brunswick Scientific, Cambridge, England
Kühlkammer (4 °C)	Viessmann GmbH & Co. KG, Allendorf, Deutschland
Kryostat Leica CM 3050 S	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Laborabzug captairchem	Erlab D.F.S S.A.S, Köln, Deutschland
Magnetrührer IKA ® RH basic 2	IKA ® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Mikroskop Wilovert S	Helmut Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop Olympus BX40	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
pH-Meter ph526	MultiCal WTW, Weilheim, Deutschland
Pipettierhilfe, pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland

Plattenschütteltisch	TECAN, Männedorf, Schweiz
Reaktionsgefäßständer	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Schütteltisch Duomax 1030	Heidolph Instruments, Nürnberg, Deutschland
Sterilbank, Biowizard Kojair	W. H. Mahl, Reinraumtechnik GmbH, Magdeburg, Deutschland
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Tischzentrifuge Hettich Mikro 20	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
VICTOR ³ -Reader	PerkinElmer, CA, USA
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
Waage	OHAUS®, Nänikon, Schweiz
Wasserbad WTH 500	Karl Hecht GmbH & Co., Sondheim, Deutschland
Wasserstrahlpumpe	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Zentrifuge MEGAf Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge, Varifuge 3.0 R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland

2.2. Verbrauchsmaterialien

Aluminiumfolie Paclan	A. Hartenstein Laborbedarf, Würzburg, Deutschland
Annexin V- FITC Detection Kit	BD Pharmigen™, Heidelberg, Deutschland
Aqua Spüllösung	Deltaselect GmbH, Dreieich, Deutschland
Butterflykanüle	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Centricon-Röhrchen 50 ml	Millipore, Darmstadt, Deutschland

Deckgläser 24 x 60 mm	Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Dialysiermembran Membra-Cel™	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Dunkelkammer	Werner Hassa GmbH, Lübeck, Deutschland
Einbettungsmedium Tissue-Tek®	Sakura Finetek Europe B.V., Zoulerwoude, Niederlande
Einmal-Kanülen BD Microlance 3	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Einmal-Küvetten UVette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Einmal-Skalpell	Feather Safety Razor Co., LTD, Osaka, Japan
ELISA-Platten hoch bindend (F96-microwell plates)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
ELISA-Platten nicht bindend (F96-microwell plates)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
ELISA-Platten-Abdichtfolie	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Erlenmeyerkolben	A. Hartenstein Laborbedarf, Würzburg, Deutschland
Filter	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Filter	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Falcon-Röhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Einwegküvetten	BRAND GmbH, Wertheim, Deutschland
Objektträger 26 x 76 mm/ca. 1mm	Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg, Deutschland
Objektträger SuperFrost /Plus	Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland

Nadeln (BD Microlance 3, 26Gx1/2)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Nadeln (BD Microlance 3, 30Gx1/2)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Neubauer- Zählkammer	A. Hartenstein Laborbedarf, Würzburg, Deutschland
Ölstift, DAKO Pen	DAKO Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Parafilm M Laboratory Film	Pechiney Plastic Packaging, Menasha, Wisconsin, USA
Perfusionsbesteck BD Valu-Set	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Protein G Sepharose Säulen	Amersham Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,0 ml, 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
S-Monovette® EDTA	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette® Serum	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten 10 ml, 25 ml	Sarstedt AG & Co. Nümbrecht, Deutschland
Spritzen 20 ml (BD Discardit II)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Styroporkasten	Apotheke UKSH, Campus Lübeck, Deutschland
Tissue-Tek® Cryomold	Sakura Finetek Europe B.V. Alphen aan den Rijn, Niederlande
Tissue-Tek® O.C.T. Compound	Sakura Finetek Europe B.V. Alphen aan den Rijn, Niederlande
Vernichtungsbeutel	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland Sarstedt
Zellmembrandialyseschlauch	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland

2.3. Chemikalien und Farbstoffe

Ammoniak-Lösung	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Aqua dest.	Apotheke UKSH, Campus Lübeck, Deutschland
Biotinfreies BSA	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Dimethylsulfoxide minimum 99,5 % GC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Dextran T 500	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Di-Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)	Gibco, Paisley, Vereinigte Königreiche
Eosin	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure-Alkohol	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 70 %	Apotheke UKSH, Campus Lübeck, Deutschland
Formaldehyd-Lösung 5 %	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Hämatoxylin	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Histopaque 1119	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
25 mM HEPES	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ketaminhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
L-Glutaminsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Lymphocyte Separation Medium 1077	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland

Mowiol 4-88	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
NaOH	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine (fMLP)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
p- Formaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Percoll Density Centrifugation Media	GE Healthcare, Hamburg, Deutschland
Polymorphprep™	Axis-Shield, Heidelberg, Deutschland
Roti®-Histofix 4 % (Phosphate-buffered formaldehyde solution)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Trypan Blau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Xylol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland

2.4. Puffer, Lösungen, Medien

Ampuwa® Spüllösung	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Blockierender Puffer	PBS+ 1 % biotinfreies BSA+ 0,05 % Tween
Chemilumineszenz-Medium	RPMI-1640 ohne Phenolrot, mit stabilisierendem L-Glutamin, mit 25 mM HEPES+ 1 % FCS
3 % Dextran-/ 0,9 % NaCl- Lösung	30 g Dextran+ 9 g NaCl auf 1 l destilliertes Wasser
Glycinpuffer	7.52 g Glycin in 1 l destilliertes Wasser, pH- Einstellung auf 2.8 mit 1N HCl
Lysierender Puffer	D-PBS mit destilliertem Wasser 1:5 verdünnen
Moviol 4-88	6 g Glycerin+ 2,4 g Mowiol+ 6 ml H ₂ O
Natriumchlorid	58,44 g NaCl in 1 l destilliertes Wasser

Natrium-Karbonatpuffer	5,3 g Na ₂ CO ₃ , 5,04 g NaHCO ₃ in 1 l destilliertes Wasser, pH-Einstellung auf 9,6 mit 1N HCl
PBS 1-fach	8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na ₂ HPO ₄ , K ₂ HPO ₄ in destilliertes H ₂ O
PBST (phosphate buffered saline-Tween20)	0.05 ml Tween 20 in 1 l PBS (1x)
RPMI 1640 Medium ohne L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
RPMI 1640 ohne Phenolrot mit L-Glutamin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
TRIS-Puffer	181.71 g von TRIS Base in 1 l destilliertes Wasser. pH- Einstellung auf 8.8 mit 1N HCl
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
20 % Ethanol	20 ml 96 %iger Ethanol in 80 ml destilliertes Wasser

2.5. Verwendete Pharmaka und Antikörper

BAY 61-3606 Dihydrochlorid	MedChem Express, New York, USA
FITC-konjugierte Ziegenantikörper (IgG) gegen murines C3	Cappel MP Biomedicals LLC, Ohio, USA
Heparin Natrium 25.000 I.E.	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Normales Kaninchen Serum	C.C.Pro, Oberdorla, Deutschland
Ziegenantikörper gegen Kaninchen IgG	DakoCytomation, Hamburg, Deutschland
(FITC) CD15 Antikörper	Bio-Legend, San Diego, USA
(FITC) CD62L Antikörper	Bio-Legend, San Diego, USA
(FITC) CD66b Antikörper	Bio-Legend, San Diego, USA

2.6. Angewandte Programme

Cell Quest® pro Software	BD Biosciences, San Diego, USA
Excel 2013	Microsoft Cooperation, Redmond, USA
Graphpad	Graphpad Software, San Diego, USA

R statistic software

The R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich

SigmaPlot 13.0

Systat Software, Erkrath, Deutschland

Wallac Workstation Software

PerkinElmer, Californien, USA

3. Methoden

3.1. Verwendung von humanem Material

Für die Versuche wurden polymorphkernige Zellen aus humanem venösem Blut nach der schriftlichen Einverständniserklärung der gesunden Spender isoliert. Für Versuche mit humaner Haut wurden Vorhäute verwendet, die von einer urologischen Praxis in Lübeck zur Verfügung gestellt wurden. Die Ethikkommission der Universität zu Lübeck hat alle Experimente genehmigt und die Durchführung erfolgte nach Aufklärung und schriftlichem Einverständnis in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki (76) (Aktenzeichen: 09-140, 04-061, 04-144, 05-056).

3.2. Versuchstiere

Es wurden C57Bl/6-Mäuse im Alter von 6-10 Wochen eingesetzt, die aus den Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) stammten. LysM-Cre Mäuse, CD2-Mäuse und SYK-loxP-flanked Mäuse stammten aus dem Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Durch Dr. Katja Bieber wurde Syk entweder aus myeloidischen (LysM-Cre) oder lymphatischen (CD2-Cre) Zellen im „knockout“-Verfahren eliminiert, sodass für den hier erfolgten Versuch folgende Allele vorlagen: SYK^{+/+} LysM-cre, SYK^{fl/+} LysM-cre und SYK^{fl/fl} LysM-cre, SYK^{+/+} CD2-Cre, SYK^{fl/+} CD2-Cre, SYK^{fl/fl} CD2-Cre. Die Züchtung aller für diese Arbeit verwendeten Mäuse erfolgte durch Dr. Katja Bieber, die Genotypisierung durch Claudia Kauderer.

Die Mäuse wurden entsprechend § 7 des Tierschutzgesetzes artgerecht gehalten, erhielten standardisierte Nahrung und hatten jederzeit Wasser zur Verfügung. Die Blutentnahmen, die klinische Beurteilung sowie Biopsieentnahmen erfolgten unter intraperitoneal verabreichter Narkose mit Ketamin (100 µg/g) und Xylazin (15 µg/g) und die Tiere wurden durch Verwendung von Wärmelampen vor Auskühlung geschützt. Fachgerecht wurden die Mäuse nach Beendigung der Experimente getötet und entsorgt. Das Ministerium für *Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume* des Landes Schleswig-Holstein (Kiel) hatte zuvor dem Antrag für die Tierversuche in diesem Projekt seine Zustimmung erteilt (Projektnummer: 78-5/12) und die Durchführung erfolgte ausschließlich durch zertifiziertes Personal.

3.3. Gewinnung von humanen polymorphkernigen Zellen

Zur Gewinnung von humanen polymorphkernigen Zellen lassen sich unterschiedliche Methoden heranziehen, die sich in ihrer Reinheit an isolierten Zellen unterscheiden (77).

Isolierung mittels Polymorphprep™

Frisches Vollblut (nicht älter als 2 Stunden) wird in EDTA-Röhrchen zur Antikoagulation gesammelt und im Mengenverhältnis 1:1 auf das vorher bereitgestellte Polymorphprep™ (Axis-Shield, Heidelberg, Deutschland) pipettiert. Die Durchführung erfolgt gemäß des Herstellerprotokolls.

Isolierung mittels Percoll- Gradienten

Das in dieser Arbeit verwendet Protokoll orientiert sich an einer bereits veröffentlichten Versuchsdurchführung und zeigt nur leichte Abänderungen (78). 18 ml humanes venöses Blut werden mit EDTA-Röhrchen entnommen und mit 7 ml DPBS auf 25 ml aufgefüllt. Ein 1:1 Gemisch aus 12,5ml Histopaque 1119 (Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland) und 12,5ml Lymphocyte separation medium 1077 (PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland) wird hergestellt. Anschließend wird das gewonnene und in DPBS verdünnte Blut auf das Gemisch pipettiert und für 30 Minuten bei 20 °C bei 1000 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Dies führt zu einer Auftrennung der Zellpopulationen im Blut, welche sich als unterschiedlichen Banden in den Röhrchen gruppieren. Die vorletzte Schicht am Boden des Röhrchens beinhaltet die polymorphkernigen Zellen, die vorsichtig herauspipettiert werden. In einem 50 ml Falcon-Röhrchen werden diese Zellen gesammelt, das Röhrchen mit DPBS (einfach) bis 50 ml aufgefüllt und für 10 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen; das sich aus den Zellen gebildete Pellet wird in 5 ml RPMI 1640-Medium gelöst. Nebenbei wird zur weiteren Isolierung ein Percoll-Gradient mit unterschiedlichen Konzentrationen (85 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 %) vorbereitet und anschließend mit den aufgereinigten polymorphkernigen Zellen beschichtet. Für den Gradienten werden zunächst 36 ml Percoll (GE Healthcare, Hamburg, Deutschland) mit 4 ml DPBS (zehnfach) gemischt. Danach wird das Gemisch in 15 ml-Röhrchen mit RPMI 1640-Medium und 1 % FCS-Medium auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt. Nun werden 2,5 ml der Zellsuspension auf

das Medium gegeben. Nach einer 25-minütigen Zentrifugation bei 2000 rpm ohne Bremse sind in dem Röhrchen etwa fünf helle weißliche Schichten zu sehen, wobei die mittleren zwei bis drei Schichten die gewünschten Granulozyten enthalten und entnommen werden. Diese werden nochmal für zehn Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert und das entstandene Pellet dann in RPMI gelöst.

Isolierung mittels Dextran

Die Isolierung erfolgt nach einem standardisierten Protokoll in unserem Labor: 80 ml venöses Blut werden entnommen und mit insgesamt 4 ml Heparin antikoaguliert. Eine 3 % Dextran- 0,9 % NaCl- Suspension wird in 50 ml-Falcon-Röhrchen gegeben, mit dem gewonnenen Blut bedeckt und für 30 Minuten inkubiert. Dabei bilden sich zwei Phasen aus Erythrozyten (untere Phase) und Leukozyten (obere Phase). Der Überstand wird in drei weitere Falcon-Röhrchen mit einer 10 ml-Pipette überführt und für 12 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Das so entstehende Pellet wird in 10 ml RPMI 1640-Medium + L-Glutamin resuspendiert und erneut zentrifugiert. Im Folgenden wird das Pellet in 0,2 prozentiger NaCl-Lösung resuspendiert, nach 20 Sekunden erfolgt die Zugabe von 1,6 prozentiger NaCl-Lösung. Erneut wird die Suspension, dieses Mal bei 4 °C, zentrifugiert und zum Schluss noch zweimal mit RPMI 1640-Medium + L-Glutamin gewaschen und auf Eis gelagert.

3.4. Herstellung der Kryoschnitte

Die aus einer urologischen Praxis zur Verfügung gestellten Vorhäute werden zunächst in einem RPMI 1640-Medium konserviert. Es erfolgt eine Einbettung in TissueTec® Einbettmedium (Sakura Finetek Europe B.V. Alphen aan den Rijn, Niederlande) in sogenannten Cryomolds. Bei -20 °C werden die Schnitte tiefgefroren. Mit einem Kryostaten (Leica 3050S CM) können sodann dünne Hautschnitte von 6 µm Dicke geschnitten und auf die Superfrost- Objektträger übertragen werden. Die Lagerung zur weiteren Verwendung erfolgt bei -20 °C.

3.5. Vorbereiten des Syk-Inhibitors BAY 61-3606

Der spezifische Syk-Inhibitor BAY 61-3606 (MedChem Express, New York, USA) wird in Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert.

3.6. Bestimmung von freigesetzten Sauerstoffradikalen aus humanen neutrophilen Granulozyten

Polymorphkernige Zellen aus peripherem Blut werden wie oben beschrieben mittels Polymorphprep™ gewonnen und durch Immunkomplexe aktiviert. Die Aktivität lässt sich anhand der ROS-Produktion messen: Zunächst werden hochbindende 96-Loch ELISA-Platten (Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland) mit Fragmenten des rekombinanten humanen Typ VII Kollagen (hCOI7) aus der NC1-Domäne (mit Natriumkarbonatpuffer auf eine Konzentration von 20µg/ml verdünnt) für drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Sodann werden die Platten insgesamt fünfmal mit PBS+0,05 % Tween λ gewaschen. Danach wird ein Puffer aus PBS mit 1 % biotinfreiem BSA und 0,05 % Tween λ aufgetragen und die Platte bei 4 °C über Nacht schüttelnd gelagert. Am nächsten Tag wird die Platte erneut gewaschen. Anschließend werden Immunglobuline gegen humanes Typ VII Kollagen (IgG1 oder IgA) auf die Platte pipettiert und für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert, sodass sie mit den Antigenen Immunkomplexe bilden können. Sowohl die Antigenfragmente als auch die Antikörper wurden von Dr. Andreas Recke bereitgestellt (79).

Die Freisetzung von Sauerstoffradikalen aus aktivierten polymorphkernigen Zellen kann mittels Chemilumineszenz unter Verwendung von Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazine-dion, Sigma- Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland) gemessen werden, wobei blaues Licht ($\lambda_{\max} = 425 \text{ nm}$) detektiert wird (80,81).

Den neutrophilen Granulozyten wird der Inhibitor BAY 61-3606 (MedChem Express, New York, USA) in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten auf Eis werden die neutrophilen Granulozyten auf die Antigen-Antikörper-beschichteten Platten gegeben. Die Chemilumineszenz wird für eine Stunde mit Victor³ gemessen und dabei mit der Wallac Workstation software (Wallac 1420 Manager) erfasst. Mit dem Programm *R statistical package version 3.0.2* (URL: <http://www.r-project.org>) sowie *Microsoft Excel 2013* und *SigmaPlot 13.0* wurden die Daten ausgewertet. Für die Auswertung wurde angenommen, dass die ROS- Freisetzung nach Bildung von Immunkomplexen 100% beträgt. Hiermit wurde dann die Freisetzung nach Gabe von BAY 61-3606 verglichen. Zusätzlich wurde der Mittelwert und die Standardabweichung der ROS- Freisetzung bei unterschiedlichen Dosierungen des Syk- Inhibitors aus allen Versuchsdurchführungen

gebildet. Zur Beurteilung, ob eine signifikante Reduktion erreicht werden konnte, erfolgte die einfaktorielle Varianzanalyse. Anschließend erfolgte als post- hoc- Test der Dunn's Test.

3.7. CD66b-, CD62L-Detektion

Humane neutrophile Granulozyten werden mit Polymorphprep™ (Axis-Shield, Heidelberg, Deutschland) nach oben beschriebenem Protokoll isoliert. Für 15 Minuten werden die Zellen mit dem Inhibitor in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Sodann werden sie auf wie im Versuch 3.5 vorbereiteten ELISA-Platten für eine Stunde aktiviert bzw. unstimuliert belassen. Im Folgenden wird PBS mit 3 % BSA hinzugefügt, ebenfalls werden jeweils 2 µl der Marker für CD62L (Klon G10F5) (FITC-konjugierte Mausantikörper gegen humanes CD62L, BioLegend, San Diego, USA), CD66b (KlonL3D10) (FITC- konjugierte Mausantikörper gegen humanes CD66b; BioLegend, San Diego, USA) und CD15 (BioLegend, San Diago, USA) hinzu pipettiert. Für 30 Minuten werden die Marker bei 4 °C inkubiert, anschließend für 7 Minuten bei 2500 rpm zentrifugiert. Nach einem Waschvorgang kann der FACS- Puffer hinzugegeben werden, mit der FACSCalibur Durchflusszytometrie begonnen und anschließend mit *CellQuest® pro software* ausgewertet werden.

3.8. Dermo-epidermale Separation in Kryoschnitten

Kryoschnitte humaner Vorhaut werden mit einer Schichtdicke von 6 µm geschnitten (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) und auf Objektträger übertragen. Die Lagerung erfolgt bei -20 °C. 50 µl aus Kaninchen gewonnene Antikörper (vierfach konzentrierte IgG1) gegen humanes Typ VII Kollagen werden auf die Schnitte pipettiert und für eine Stunde bei 37 °C in einer dunklen Feuchtigkeitskammer inkubiert. Normales Kaninchenserum (NRS) wird als Negativkontrolle auf einen Schnitt aufgetragen. Im Anschluss werden die Schnitte mit PBS für 5 Minuten gewaschen und mit einem weiteren Objektträger gedeckelt.

Währenddessen wird von gesunden Spendern Blut gewonnen und mit Heparin antikoaguliert. Die Isolierung der neutrophilen Granulozyten erfolgt mit einer 3 %-Dextran und 0,9 %-NaCl-Lösung wie oben beschrieben.

BAY 61-3606 (MedChem Express, New York, USA) wird in verschiedenen Konzentrationen zu den neutrophilen Granulozyten hinzugegeben, sodann werden die ge-

waschenen Kryoschnitte mit 500 µl der Zellsuspension bedeckt. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei 37 °C werden die Zellen mit PBS aus den Schnitten gewaschen.

Es folgt die Anfärbung mit Hämatoxylin-Eosin. Hierfür werden die Schnitte zuerst mit Formalin fixiert, dann die Kerne mit Papanicolaou angefärbt. In den folgenden Schritten werden sie zuerst in Essigsäure und dann in Ammoniakwasser gelegt. Mit Wasser werden die Flüssigkeiten jeweils abgewaschen. Nun erfolgt die Färbung mit Eosin, in deren Anschluss die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (96 %, 96 %, 100 %-iger Alkohol, Xylol) dehydriert werden. Zum Schluss werden die Schnitte mit dem Glasdeckautomat Leica CV 5030 eingedeckt.

Unter dem Lichtmikroskop wird die dermo-epidermale Separation betrachtet und der prozentuale Anteil losgelöster Epidermis im Präparat bestimmt (vgl. Sitaru et al. (20)).

3.9. Zellviabilitäts- und Toxizitätsüberprüfung an neutrophilen Granulozyten

Polymorphkernige Leukozyten werden nach oben beschriebener Methode mit Percoll aus humanem peripherem Blut isoliert. Die Zellen werden in Eppendorfgefäße pipettiert, der Inhibitor BAY 61-3606 (MedChem Express, New York, USA) wird in verschiedenen Konzentrationen ergänzt und für 2 Stunden inkubiert. Als Positivkontrolle werden Zellen für 20 Minuten mit UV-Licht (254 nm) behandelt, welches die apoptotischen Prozesse in Leukozyten beschleunigt (82). Anschließend erfolgt die Detektion von Nukleinsäure mit Propidiumiodid und Phosphatidylserin mittels Annexin V nach dem Protokoll des Herstellers (Annexin V-FITC Detection Assay, BD Pharmingen™, Heidelberg, Deutschland). In der Durchflusszytometrie (FACSCalibur flow cytometer) werden die Zellen hinsichtlich der Fluoreszenz von Annexin V und Propidiumiodid diskriminiert (83) und mit *CellQuest® pro software* ausgewertet.

3.10. Gewinnung der Anti-Maus-Kollagen-VII-Immunglobuline

Zur Gewinnung von Immunglobulinen aus Kaninchenserum wird ein bereits etabliertes Protokoll verwendet (23).

New Zealand White Kaninchen werden hierfür mit rekombinanten Fragmenten des Typ VII Kollagen von Mäusen immunisiert, um aus deren Seren die Antikörper gegen das murine Typ VII Kollagen zu gewinnen. Die Immunisierung der Kaninchen erfolgt durch das Unternehmen Eurogentec GmbH in Deutschland.

Die cDNA der gewünschten Fragmente wird durch eine reverse Transkription gewonnen, amplifiziert und in einen Phagen mit dem linearen Vektor pGEX-6P-1 (Amersham Biosciences, Heidelberg, Deutschland) transferiert, wodurch der rekombinante Vektor pGEX-mCol7 kloniert werden kann. Danach wird dieser Vektor in den E.coli-Stamm BL21 transformiert und dort letztlich exprimiert. Durch Verwendung einer Glutathion-Agarose-Affinitäts-Chromatographie kann das so generierte Typ VII Kollagen gewonnen und der Eurogentec GmbH für die Immunisierung zur Verfügung gestellt werden. Für diese Arbeit wurden sodann aus den Seren Immunglobuline gewonnen.

Zur Aufreinigung der Immunglobuline aus den Kaninchenseren werden gekühlte Protein G-Sepharose-Säulen (Amersham Biosciences, Heidelberg, Deutschland) benutzt. Das gefrorene Serum wird aufgetaut, im Verhältnis von 1:1 mit PBS verdünnt und auf den Säulen für eine Stunde bei 4 °C schaukelnd inkubiert. Es folgt ein Waschvorgang der Säulen mit PBS. Die Antikörper werden mit 0,1 M Glycin-Puffer (pH = 2,8) eluiert und mit 1 M Tris-Base (pH = 9) auf einen pH von 7,2 neutralisiert. Zur Konzentrierung werden die Antikörper auf Polyethylenglycol für drei Stunden gelagert und anschließend in PBS (pH = 7,2) über Nacht dialysiert. Zur Gewinnung der spezifischen Antikörper gegen Typ VII Kollagen werden die bereits erhaltenen Antikörper auf eine zweite Protein G-Sepharose-Säulen (Amersham Biosciences, Heidelberg, Deutschland) gegeben und für 20 Minuten schüttelnd inkubiert. Danach wird die Flüssigkeit wieder aufgefangen und bei 4 °C gelagert, da der Vorgang insgesamt dreimal wiederholt wird. Es folgt ein Waschvorgang der Säule mit zunächst PBS*1 (pH = 7,2), dann mit PBS + 850 mM NaCl + 0,1 % Triton und erneut mit PBS*1 (pH = 7,2). Die spezifischen Antikörper werden sodann mit 0,1 M Glycin-Puffer (pH=2,9) eluiert. Mit 1 M Tris-Base (pH = 9) wird die Lösung auf einen pH von 7,2 neutralisiert. Die so isolierten spezifischen Antikörper werden erneut für drei Stunden auf Polyethylenglycol konzentriert und für 2 Tage in PBS (pH = 7,2) dialysiert. Danach folgt das sterile Filtrieren (Porengröße 0,22 µm) sowie die photometrische Bestimmung der Konzentration bei 280 nm. Im Falle einer nicht ausreichenden Konzentration kann mit 30 kDa-Filtern von Millipore eine weitere

Konzentrierung durchgeführt werden. Die spezifischen Antikörper werden bei 4 °C bis zum Gebrauch gelagert.

3.11. Induktion von EBA mit Anti-Maus-Kollagen VII-transferierten IgGs in Mäusen und Inhibierung der Syk-Signalkaskade mit BAY 61-3606

In diesem etablierten Tierversuchsmodell induzieren die aus dem Kaninchenserum gewonnenen Anti-Maus-Kollagen-VII-Immunglobuline in Mäusen eine experimentelle EBA (23). Wie weiter oben genannt, wurden in dieser Arbeit C57Bl/6-Mäuse verwendet, da dieser Mausstamm besonders suszeptibel gegenüber der Induktion einer experimentellen EBA durch anti-COL7 IgG Injektionen ist (84).

Insgesamt werden 300 µg der spezifischen Antikörper, die nach dem oben beschriebenen Verfahren gewonnen werden, verabreicht, wobei sie in drei Dosen à 100 µg intraperitoneal an den Tagen 0, 2 und 4 appliziert werden.

Zur Evaluation des Krankheitsgeschehens werden an den Tagen 4, 8 und 12 Veränderungen der Hautoberfläche in Sedierung erfasst. Zur Auswertung und Vergleichbarkeit wird dabei die betroffene Körperoberfläche in Prozent angegeben (85). Aus den gewonnenen Daten wird die Area under the curve (AUC) berechnet, so dass die verschiedenen Inhibitorkonzentrationen sowie die Kontrollgruppe bezüglich ihrer Krankheitsaktivität miteinander verglichen werden können (s. Tabelle 4).

Körperteil	Anteil Körperregion an der Gesamtkörperfläche (%)	betroffene (%)	Fläche
linkes Ohr	2,5	0	
rechtes Ohr	2,5	0	
linkes Auge	0,5	0	
rechtes Auge	0,5	40	
Schnauze	2,5	5	
orale Mukosa	2,5	0	
Hals und Kopf	9	5	
vorderes Bein links	5	20	
vorderes Bein rechts	5	65	
hinteres Bein links	10	0	
hinteres Bein rechts	10	35	
Schwanz	10	1	
Stamm	40	0	
betroffene Körperoberfläche		8,6	

Tab. 4: Beispielhafte Beurteilung der von EBA betroffenen Körperoberfläche in Prozent

Die Körperoberfläche wird zur besseren Beurteilung in einzelne Regionen eingeteilt. Der prozentuale Anteil der Region an der Gesamtfläche ist eine vorgegebene Größe (s. Spalte 2). In jeder Region wird der prozentuale Anteil an der Hautläsion beschrieben. Dabei ist zunächst die Region als 100 % anzunehmen (s. Spalte 3). Spalte 2 und Spalte 3 werden multipliziert. Die Werte werden wiederum addiert und durch 100 dividiert. So ergibt sich die betroffene Körperoberfläche (vgl. (85)).

Am Tag 12 werden den Mäusen zusätzlich Serumproben und Gewebeproben für histologische und immunologische Untersuchungen entnommen.

Der spezifische Syk-Inhibitor BAY 61-3606 wird, wie bereits in einem anderen, an Ratten durchgeführten Versuchsmodell, oral verabreicht (86). Hierfür werden zwei unterschiedliche Dosen, 25 und 50 mg/kg Körpergewicht, zweimal täglich per os appliziert; d.h. 2x täglich 25 oder 50 mg/kg pro Körpergewicht. Die Kontrollgruppen der C57Bl/6-Mäuse bekommen oral das Solvens Wasser injiziert.

Es wird darauf geachtet, dass bei der Einteilung in die unterschiedlichen Versuchsgruppen beide Geschlechter in etwa gleicher Zahl aufgeteilt werden und zudem in jedem Käfig alle Versuchsgruppen vertreten sind.

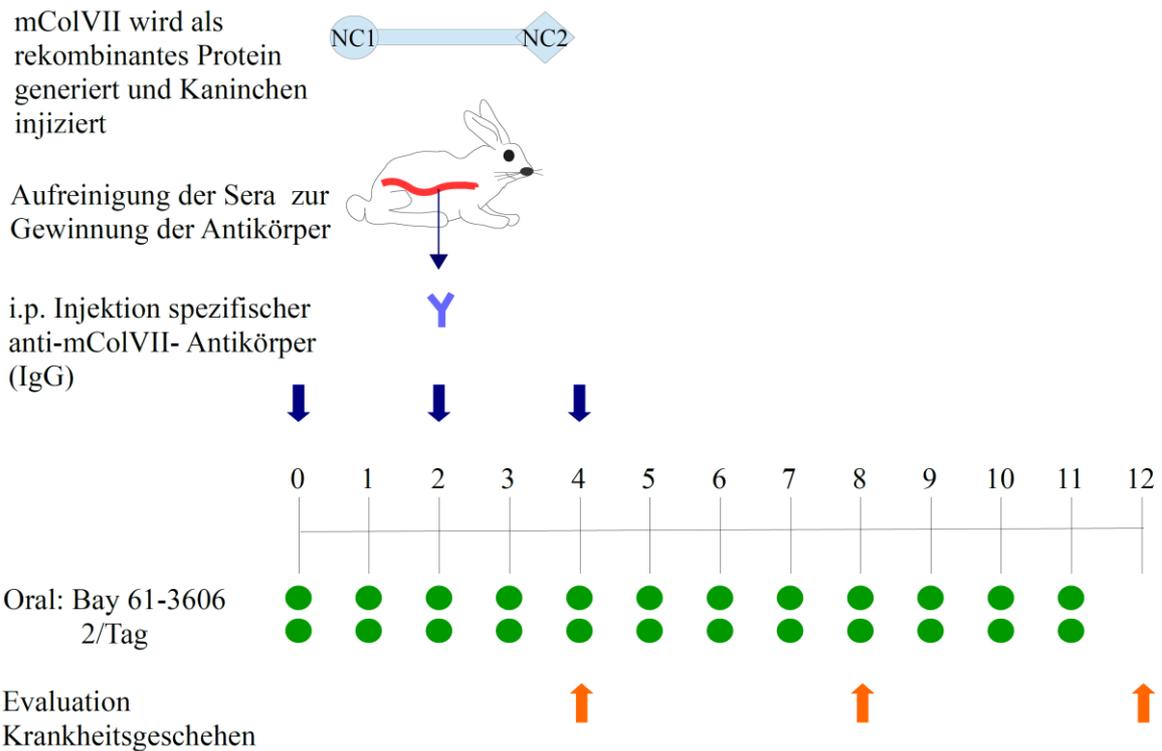


Abb. 7: Darstellung der Versuchsdurchführung des antikörpertransferierten induzierten EBA-Modells in Mäusen

Durch die Firma Eurogentec GmbH werden Kaninchen mit Fragmenten des rekombinanten murinen ColVII immunisiert. Die daraufhin gebildeten Antikörper (anti-mColVII) werden aus dem Serum unter Verwendung von Protein G-Affinitäts-Säulen aufgereinigt und in drei Dosen à 100 µg intraperitoneal den C57Bl/6-Mäuse injiziert. Zweimal täglich erfolgt die Gabe von BAY 61-3606 und an den Tagen 4,8 und 12 (orangene Pfeile) wird das Krankheitsgeschehen beurteilt.

3.12. Induktion von EBA mit Anti-Maus-Kollagen-VII-transferierten IgGs in Mäusen in LysM-Cre und CD2-Cre Syk-knockout-Mäusen

Bei gleichem Versuchsaufbau wie unter 3.11. beschrieben, jedoch ohne die Gabe des Syk-Inhibitors werden unterschiedlichen Mausstämmen IgG gegen murines Typ VII Kollagen injiziert. Zuvor wurde Syk entweder aus myeloischen (LysM-Cre) oder lymphatischen (CD2-Cre) Zellen im „knockout“- Verfahren eliminiert, sodass für den Versuch folgende Allele vorlagen: SYK^{+/+} LysM-cre, SYK^{fl/+} LysM-cre und SYK^{fl/fl} LysM-cre, SYK^{+/+} CD2-Cre, SYK^{fl/+} CD2-Cre, SYK^{fl/fl} CD2-Cre. Über zwölf Tage wurde das Krankheitsgeschehen beobachtet. Die Versuchsdurchführung erfolgte gemeinsam mit Dr. Unni Krishna Samavedam aus unserem Institut.

3.13. Direkte Immunfluoreszenz

Die direkte Immunfluoreszenz wird an läsionsfreiem Gewebe durchgeführt und dient zum Nachweis von Kaninchen IgG gegen das murine Typ VII Kollagen an der DEJ sowie zum Nachweis von murinem C3 an der DEJ. Die am Tag 12 gewonnenen Gewebeproben werden hierzu zunächst in TissueTec® (Sakura Finetek Europe B.V. Alphen aan den Rijn, Niederlande) eingefrorenen. Für die Anfärbung werden sie dann lichtgeschützt auf Objektträger transferiert, mit Fluorescein Isothiocyanate (FITC)-markierten Antikörpern gegen Kaninchen IgG (1:100 verdünnt, DakoCytomation, Hamburg, Deutschland) und mit FITC-markierten anti-Maus-C3-Antikörpern (1:50 mit PBS verdünnt, Cappel MP Biomedicals LLC, OH, USA) beschichtet und für 45 Minuten in einer dunklen Feuchtigkeitskammer inkubiert. Dann werden sie mit PBS für 30 Minuten gereinigt, mit Glycerol eingedeckt und unter dem Mikroskop betrachtet.

3.14. Histologische Anfärbungen

Gewebeproben von den Ohren und der Haut werden nach Beendigung der Tierversuche den Mäusen entnommen und in 4 % Histofix (Roth, Karlsruhe, Deutschland) konserviert. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung erfolgt durch Frau Rebecca Cames. Eine mikroskopische Beurteilung der Schnitte bezüglich des Entzündungsgrades wird blind durch drei Personen erhoben. Auf einer Skala von 1-5 werden dabei die Infiltration durch neutrophile Granulozyten sowie die Gewebsveränderungen beurteilt. Stufe 1 bedeutet hierbei kein oder nur geringes Entzündungsgeschehen, 5 ist die schwerste Entzündungsform.

3.15. Statistische Auswertung

In allen Versuchsdurchführungen wurden jeweils mehr als 2 Gruppen miteinander verglichen. Um signifikante Unterschiede berechnen zu können, wurde zunächst die einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Mittels Bonferroni- Test oder Dunn's Test wurde die Signifikanzberechnung korrigiert.

Im Falle einer simultanen Berücksichtigung mehrerer unabhängiger Faktoren erfolgte die Signifikanztestung mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse. Als signifikant wurde $p < 0,05$ vorausgesetzt.

Zur Auswertung wurde entweder Microsoft Excel 2013 oder SigmaPlot 13.0 verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. ROS-Freisetzung aus immunkomplexstimulierten neutrophilen Granulozyten nach Zugabe des Syk-Inhibitors BAY 61-3606

Zur Bestimmung der Produktion von ROS durch neutrophile Granulozyten nach Aktivierung durch Immunkomplexe aus rekombinanten hColVII und IgG1 (n = 35) bzw. IgA1 (n = 6) wurden insgesamt 41 Blutproben getestet. Es wurden beide Antikörperklassen getestet, da sie in EBA nachgewiesen worden sind (vgl. Tab. 2). Die Konzentration des Syk-Inhibitors BAY 61-3606 (MedChem Express, New York, USA) umfasste einen Bereich von 5 ng/ml bis 25000 ng/ml. Als Positivkontrolle wurden die Neutrophile durch Immunkomplexe ohne Zugabe des Inhibitors stimuliert. Mittels Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthlazedione, Sigma-Aldrich-Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland) erzeugter Chemilumineszenz wurden die freigesetzten Sauerstoffradikale detektiert. Die gemessene ROS-Produktion ohne Zugabe des Inhibitors wurde als 100 % Aktivität festgesetzt, die ROS-Produktion nach Zugabe des Inhibitors wurde dazu ins Verhältnis gesetzt und als prozentualer Anteil der maximalen Aktivität berechnet.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 8-11 dargestellt. Abbildung 8 zeigt die Veränderung der ROS-Freisetzung nach 60 Minuten für IgG1. Während bei einer Zugabe von 5 ng/ml noch kein signifikanter Effekt auftritt, reduzieren höhere Dosen die Freisetzung deutlich. Abbildung 9 zeigt repräsentativ die zeitliche ROS-Freisetzung. Nach einer kurzen Latenzphase von wenigen Minuten kommt es zu einem deutlichen Anstieg von ROS. Eine maximale Produktion wird nach etwa 15-20 Minuten erreicht. Danach kommt es zu einem Abfall. Es zeigt sich ein fehlender Anstieg der ROS-Produktion ab Inhibitorkonzentrationen von 1,5µg/ml und höher.

Ähnliche Beobachtungen lassen sich für IgA1 machen. Auch hier kommt es zu einem signifikanten Abfall der ROS-Produktion ab Dosen von 5 ng/ml. Ab 1500 ng/ml scheint ein Sättigungseffekt einzutreten (vgl. Abb.10). Jedoch ist die Stichprobe wesentlich kleiner.

Abbildung 11 zeigt ebenso wie Abbildung 9 repräsentativ die zeitliche ROS-Freisetzung. Nach einer kurzen Latenzphase von wenigen Minuten kommt es zu einem deutlichen Anstieg von ROS. Eine maximale Produktion wird nach etwa 20 Minuten

erreicht mit folgendem Abfall. In diesem Graphen zeigt sich ein fehlender Anstieg der ROS-Produktion bei InhibitorKonzentrationen von 500 ng/ml und höher.

Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass Neutrophile durch Immunkomplexe aus rekombinanten hCOIVII-Antigenen und den Antikörpern IgG1 und IgA1 ROS produzieren. Bei Zugabe von BAY 61-3606 (MedChem Express, New York, USA) wurde dosisabhängig weniger ROS sowohl bei IgG-haltigen Immunkomplexen als auch bei IgA-haltigen Immunkomplexen detektiert. Eine signifikante Reduktion ist ab einer InhibitorDosis von 125 ng/ml zu beobachten.

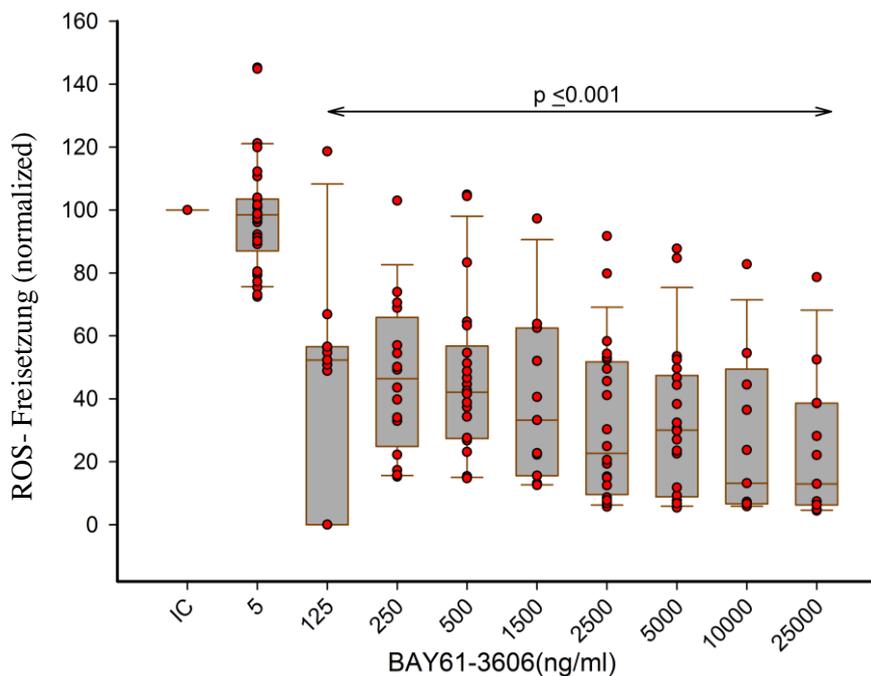


Abb. 8: Dosisabhängige Reduktion der ROS-Produktion durch BAY 61-3606 bei Verwendung von IgG1

(Modifiziert nach Samavedam, Mitschker et al (75)) Durch Immunkomplexe stimulierte neutrophile Granulozyten produzieren reaktive Sauerstoffspezies. Mikrotiterplatten werden mit hColVII und monoklonalen Antikörpern der Klasse IgG1 inkubiert. Neutrophile mit und ohne Inhibitor werden hinzugegeben und ROS unter Verwendung von Luminol detektiert. Die Freisetzung wird für verschiedene Konzentrationen an BAY 61-3606 aufgezeigt (n = 35). Dargestellt ist die kumulative und normalisierte ROS Freisetzung über eine Zeit von 60 Minuten. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit dem ANOVA Test gefolgt von dem Dunn's Test. Medianwert (rote Linie), 27/75 Perzentile (graue Box) und die 5/95 Perzentile (rote Säule). IC= Immunkomplexe mit dem Solvens Wasser.

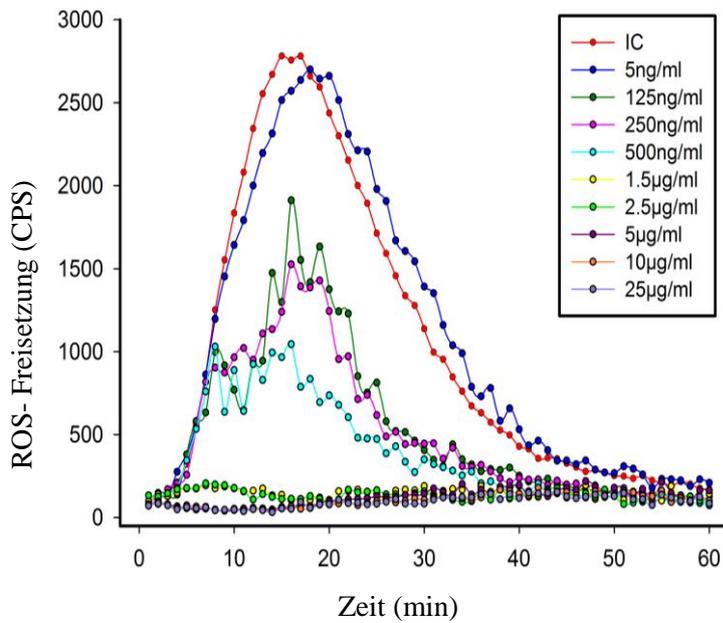


Abb. 9: Exemplarische ROS-Freisetzung aus neutrophilen Granulozyten nach Gabe von BAY 61-3606 bei Verwendung von IgG1

Neutrophile Granulozyten werden durch Immunkomplexe aus hCoVII und IgG1 stimuliert. Über einen Zeitraum von einer Stunde wurden ROS mittels Luminol detektiert. CPS = counts per second. IC = Immunkomplexe mit dem Solvens Wasser. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf BAY61-3606 im Solvens Wasser. $n = 35$

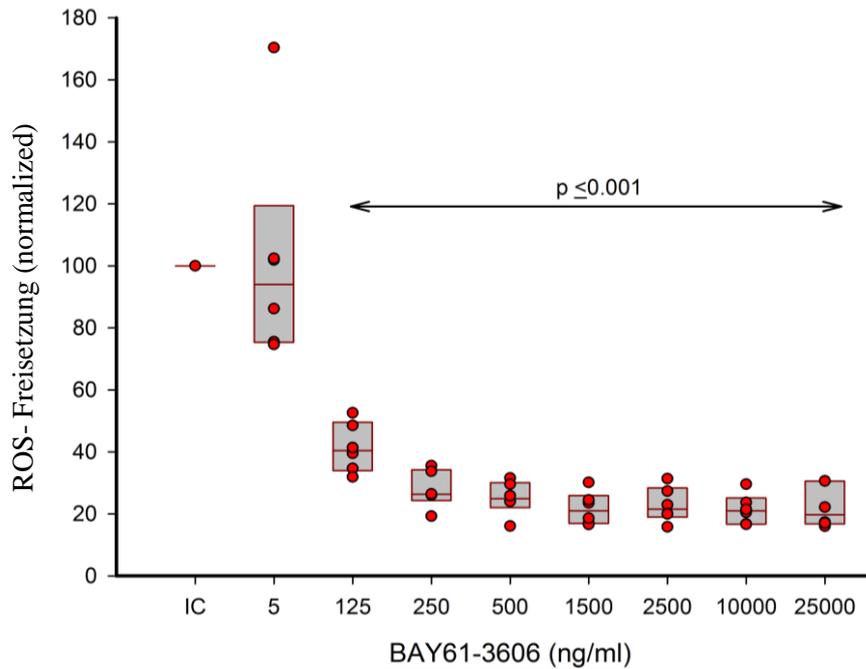


Abb. 10: **Dosisabhängige Reduktion der ROS-Produktion durch BAY 61-3606 bei Verwendung von IgA1**

(Modifiziert nach Samavedam, Mitschker et al. (75)) Durch Immunkomplexe stimulierte neutrophile Granulozyten produzieren reaktive Sauerstoffspezies. Mikrotiterplatten werden mit hColVII und monoklonalen Antikörpern der Klasse IgA1 inkubiert. Neutrophile mit und ohne Inhibitor werden hinzugegeben und ROS unter Verwendung von Luminol detektiert. Die Freisetzung wurde für verschiedene Konzentrationen an BAY 61-3606 aufgezeigt ($n = 6$). Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit dem ANOVA Test gefolgt von dem Dunn's Test. Medianwert (rote Linie), 27/75 Perzentile (graue Box). IC = Immunkomplexe mit dem Solvens Wasser.

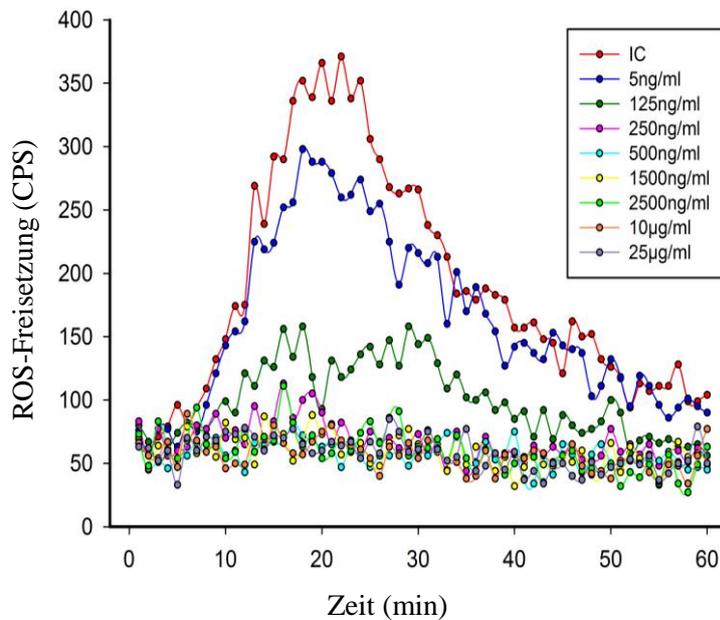


Abb. 11: Exemplarische ROS-Freisetzung aus neutrophilen Granulozyten nach Gabe von BAY 61-3606 bei Verwendung von IgA1

Neutrophile Granulozyten werden durch Immunkomplexe aus hColVII und IgA1 stimuliert. Über einen Zeitraum von einer Stunde werden ROS mittels Luminol detektiert. CPS = counts per second. IC = Immunkomplexe mit dem Solvens Wasser. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf BAY61-3606 im Solvens Wasser. $n = 6$

4.2. Einfluss der Syk Inhibition auf die Expression von CD66b und CD62L auf neutrophile Granulozyten

Aus dem Blut von vier verschiedenen Spendern wurden neutrophile Granulozyten isoliert und die Expression von CD62L und CD66b mit und ohne Zugabe des Syk-Inhibitors BAY 61-3606 (MedChem Express, New York, USA) auf den Zellen bestimmt. Zur Detektion der neutrophilen Granulozyten wurde ebenfalls CD15 markiert. Zuvor wurden Mikrotiterplatten mit hColVII und IgG1 inkubiert. Die Immunkomplexe aktivierten die Neutrophile. Neutrophile Granulozyten, die nicht durch Immunkomplexe stimuliert wurden, dienten als Kontrolle. Die getesteten Inhibitorkonzentrationen lagen zwischen 5 ng/ml und 25000 ng/ml.

Exemplarisch wird die Expression von CD62L und CD66b in Abbildung 12 dargestellt. Es zeigt sich, dass in nicht stimulierten Zellen CD62L exprimiert wird. Bei den immunkomplexstimulierten Zellen ist die Expression hingegen kaum vorhanden. Auch bei Zugabe des Inhibitors bleibt die Expression von CD62L gering ohne signifikante Änderung im Vergleich zu immunkomplexstimulierten Zellen (vgl. Abb. 13).

Die CD66b- Expression ist in nicht stimulierten Zellen gering. Nach Aktivierung zeigt sich eine deutlich erhöhte Expression. Bei vorheriger Zugabe von BAY 61-3606 in geringen Dosen ist die Expression ebenfalls erhöht, in höheren Dosen allerdings zeigt sich die Expression von CD66b verringert. Ab einer Konzentration von 25000 ng/ml ist eine signifikant reduzierte Expression erreicht ($p = 0,007$). Hieraus lässt sich schließen, dass hohe Dosen des Syk-Inhibitors zur reduzierten Expression von CD66b führen, während die Expression von CD62L bei Zugabe des Inhibitors im Vergleich zu immunkomplexstimulierten Zellen nicht verändert wird.

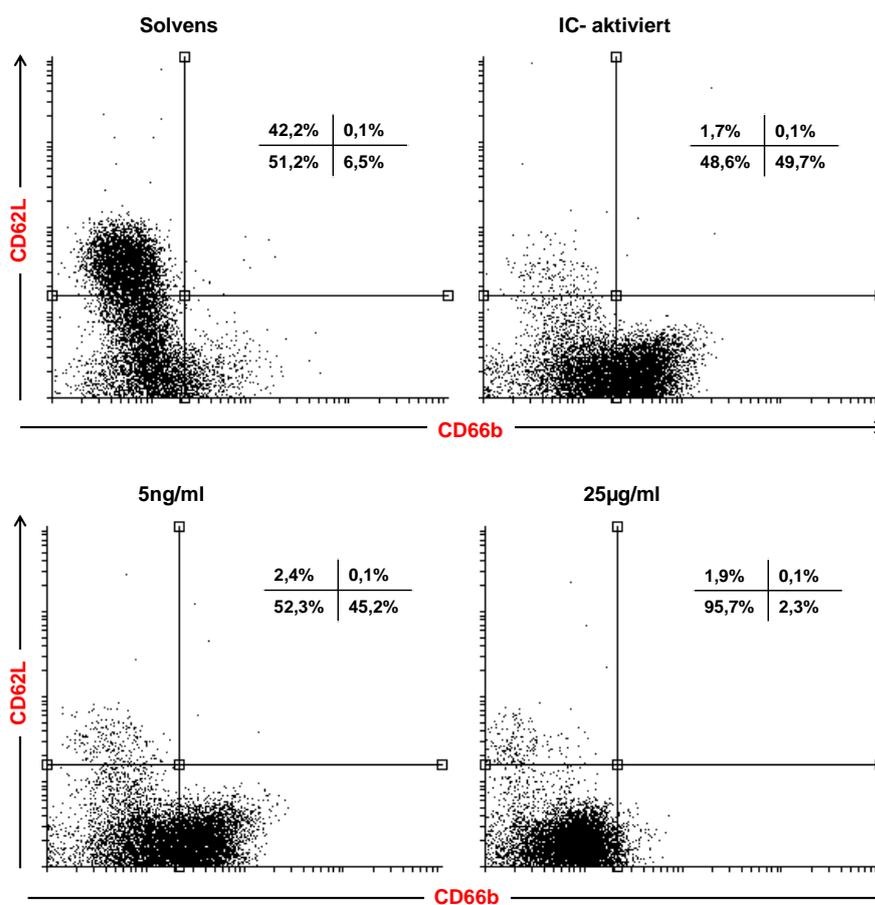


Abb. 12: Repräsentative Darstellung der Expression von CD66b und CD62L

(Modifiziert nach Samavedam, Mitschker et al. [75]) Mikrotiterplatten werden mit hCoVII und monoklonalen IgG1-Antikörpern inkubiert. Frisch isolierte neutrophile Granulozyten werden auf diese Platten gegeben, nachdem sie zuvor für 15 Minuten mit unterschiedlichen Konzentrationen an BAY 61-3606 behandelt worden sind. FITC-Antikörper gegen humanes CD62L und FITC- Antikörper gegen humanes CD66b sowie der CD15- Marker werden sodann für 30 Minuten in den Lochplatten inkubiert. Mittels FACSCalibur Durchflusszytometrie werden die Marker detektiert und mit der Cell Quest® pro Software dargestellt.

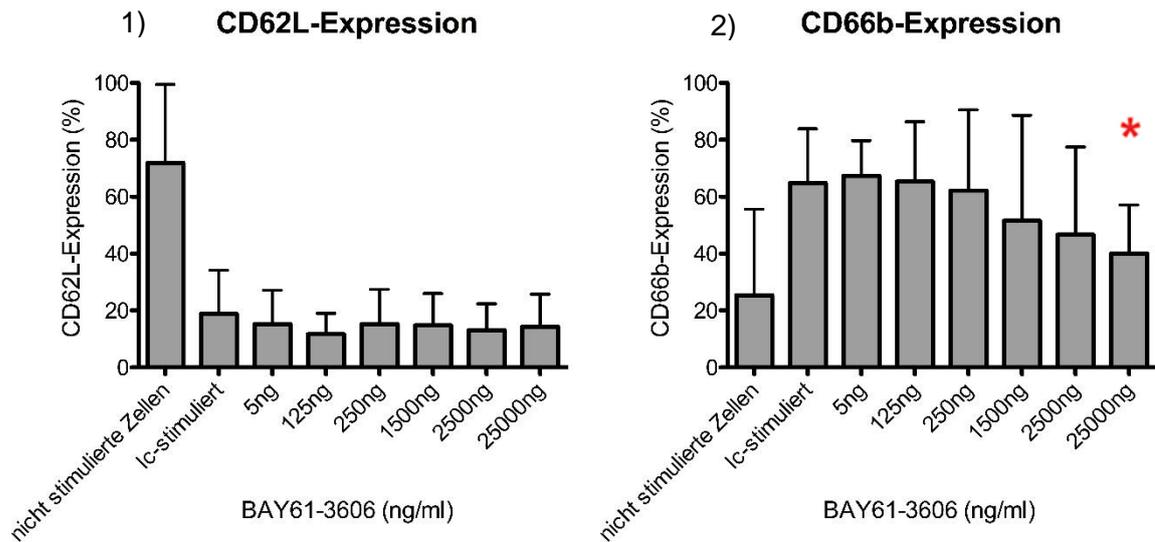


Abb. 13: Graphisch Darstellung der Expression von CD62L und CD66b

Wie in Abbildung 12 beschrieben erfolgt der Versuchsablauf zur Detektion von CD62L und CD66b. 1) Darstellung der Expression von CD62L auf nicht stimulierten Zellen, IC-stimulierten Zellen und IC-stimulierten Zellen nach vorheriger Zugabe von BAY61-3606 in unterschiedlichen Konzentrationen. 2) Darstellung der Expression von CD66b auf nicht stimulierten Zellen, IC-stimulierten Zellen und IC-stimulierten Zellen bei Zugabe von BAY61-3606. Signifikante Reduktion von CD66b bei 25000ng/ml (roter Stern: $p = 0,007$). $n = 4$

4.3. Aktivität der neutrophilen Granulozyten unter Verwendung von BAY 61-3606 im ex-vivo Model der EBA

Zur Beurteilung der dermo-epidermalen Separation durch neutrophile Granulozyten in Kryoschnitten werden auf die Vorhautschnitte, die in TissueTec® eingebettet auf eine Dicke von 6 μm geschnitten worden sind, humane neutrophile Granulozyten mit oder ohne Inhibitor gegeben. Zuvor erfolgte eine Inkubation mit anti-COL7 IgG, welche so Immunkomplexe mit dem Typ VII Kollagen bilden konnten, die zur Aktivierung der neutrophilen Granulozyten führen. Als Negativkontrolle erfolgt ebenfalls eine Inkubation mit NRS.

Nach einer H&E-Färbung wird der prozentuale Anteil abgelöster Epidermis an der Gesamtlänge des Schnittes unter dem Mikroskop beurteilt.

In insgesamt fünf von zwölf Versuchen trennte sich die Epidermis von der Dermis ab. In der Negativkontrolle mit NRS zeigte sich der Hautschnitt intakt. Bei geringen

Dosen des Inhibitors konnte weiterhin eine Ablösung der Epidermis beobachtet werden. Bei Dosen über 250 ng/ml allerdings war dieses mikroskopisch nicht mehr erkennbar. Ab einer Dosis von 5 ng/ml konnte bereits eine signifikant verringerte Blasenbildung beobachtet werden.

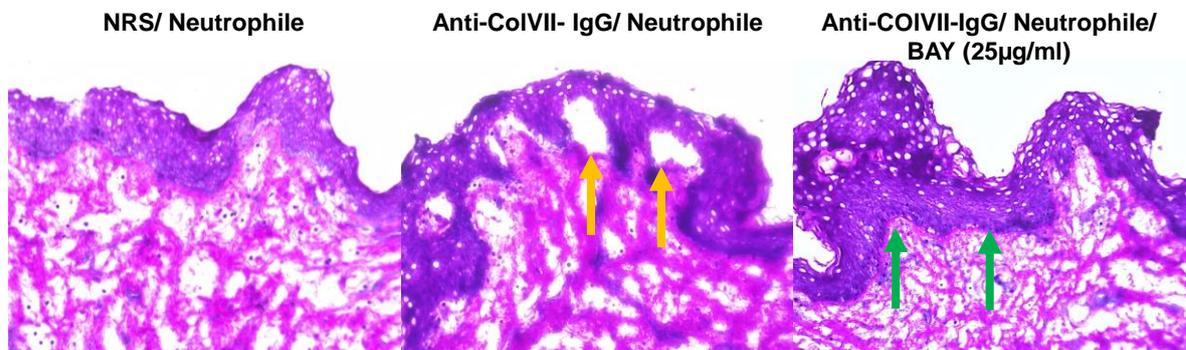


Abb. 14: **Ex-vivo Modell der EBA in Kryoschnitten**

(Modifiziert nach Samavedam, Mitschker et al. [75]) Dargestellt sind Kryoschnitte von humanen Vorhäuten in H&E- Färbung. Zur Erzeugung einer EBA ex-vivo werden Antikörper gegen humanes Typ VII Kollagen auf die Schnitte pipettiert. Nach einer einstündigen Inkubation, in der sich Immunkomplexe formen, werden für 2 Stunden neutrophile Granulozyten mit und ohne BAY 61-3606 hinzugefügt. Ohne Inhibitor kommt es zu einer Trennung der Epidermis von der Dermis (s. gelbe Pfeile). Bei Verwendung von BAY 61-3606 wird die Separation inhibiert (s. grüne Pfeile). Als Negativkontrolle dient NRS.

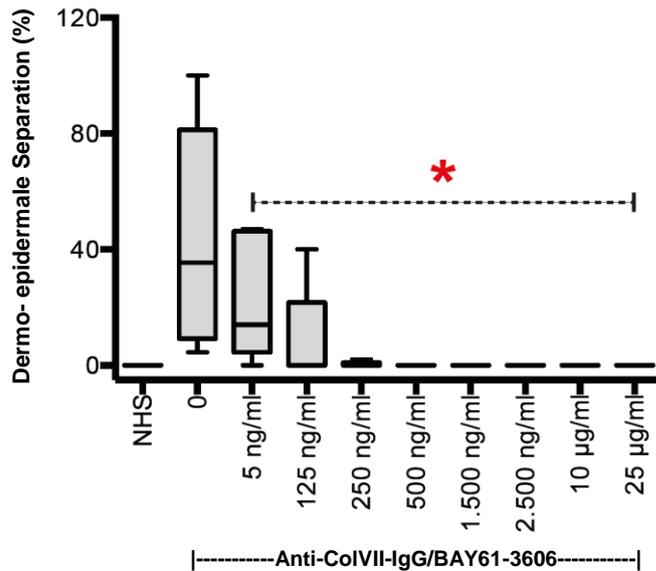


Abb. 15: **Dermo-epidermale Separation im ex-vivo Modell der EBA bei Zugabe von BAY61-3606**

(Modifiziert nach Samavedam, Mitschker et al. [75]) Graphische Darstellung der lichtmikroskopischen Beurteilung der dermo-epidermale Separation in den Kryoschnitten humaner Vorhäute (n = 5). Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung. Zur Berechnung der Signifikanz wurde ANOVA mit dem Dunn's Test angewandt. Der signifikante Bereich ist mit einem roten Stern markiert.

4.4. Zytotoxizität von BAY 61-3606 auf neutrophile Granulozyten

Zum Ausschluss eines möglichen zytotoxischen Effekts von BAY 61-3606 auf neutrophile Granulozyten wurden diese aus dem Blut von fünf Spendern aufgereinigt und hinsichtlich der Anfärbbarkeit mittels Annexin V und Propidiumiodid bei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen beurteilt. Annexin V bindet an Phosphatidylserin, welches beim programmierten Zelltod auf die Außenfläche der Plasmamembran wechselt. Propidiumiodid ist ein Nukleinsäureinterkalator, der nur in den Zellkern toter Zellen gelangt. Lebendige und unbehandelte Zellen sind Annexin-V- und Propidiumiodid-negativ, früh apoptotische Zellen sind Annexin-V-positiv und Propidiumiodid-negativ. Durch die Gewinnung von Neutrophilen können bereits einige Zellen die Apoptose einleiten, sodass bei den Zellversuchen ein kleiner Anteil Annexin-V-positiv ist. Die spät apoptotischen oder nekrotischen Zellen sind Annexin-V- und Propidiumiodid-positiv (82,87). Nekrotische Zelluntergänge können durch UV-Licht provoziert und als Positivkontrolle verwendet werden. Zu beurteilen

ist in diesem Versuch, ob die Annexin-V-positiven und Propidiumiodid-positiven Zellen durch die Zugabe von BAY 61-3606 im Vergleich zu den unbehandelten Zellpopulationen zunehmen.

Beispielhaft werden in Abb.16 die Zellpopulationen eines Spenders mit unbehandelten Zellen, UV- Licht bestrahlten Zellen sowie Zellen nach Hinzugabe der niedrigsten und höchsten Inhibitorkonzentration dargestellt. In den unbehandelten Zellen gibt es nur einen kleinen Anteil Annexin-V-positiver Zellen (4,4 %). Die meisten Zellen sind vital (94,9 %). Bei den mit UV-Licht behandelten Zellen sinkt der Anteil vitaler Zellen auf 56,4 %. Der Anteil Annexin-V-positiver Zellen steigt auf 40,9 %. Ebenfalls sind nun auch vermehrt Annexin-V-positiv und Propidiumiodid-positiv Zellen vorhanden (2,8 %).

Durch die Zugabe des Inhibitors wird die Anzahl vitaler Zellen nicht reduziert (95,2 % bei 5 ng/ml und 95,6 % bei 25 µg/ml). Eine signifikante Zunahme Annexin-V-positiver und Propidiumiodid-positiver Zellen bleibt aus. Der Versuch wurde an 5 unterschiedlichen Blutproben durchgeführt.

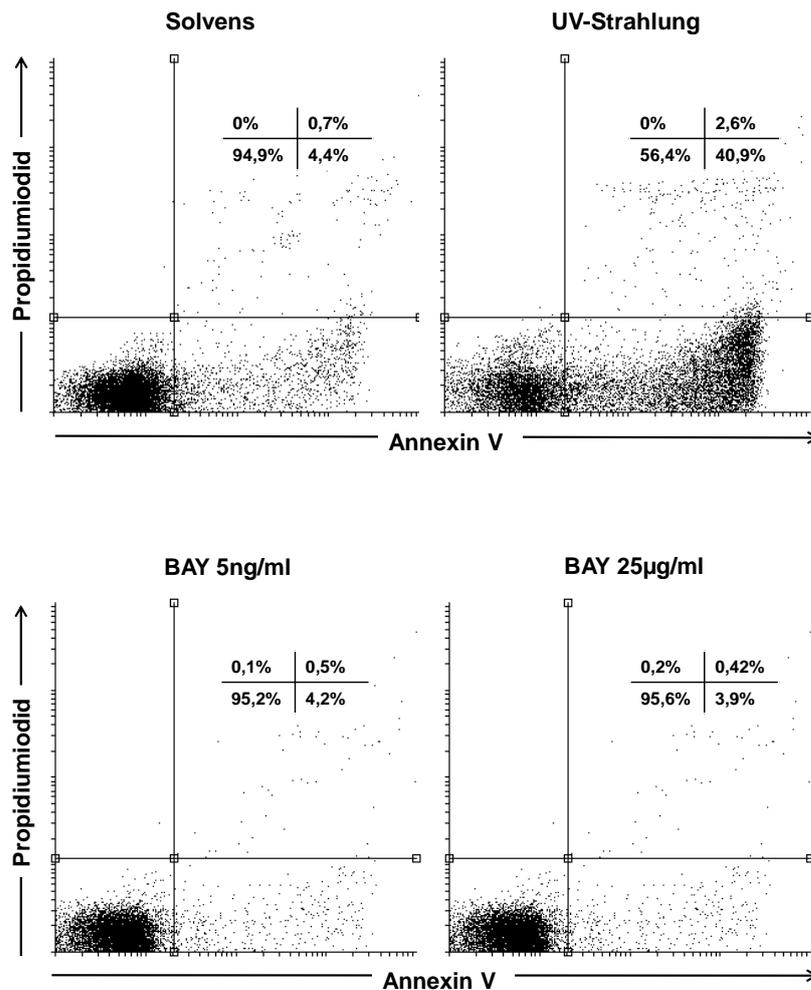


Abb. 16: Vitalität neutrophiler Granulozyten bei der Behandlung mit BAY61-3606

(Modifiziert nach Samavedam, Mitschker et al. [75]) Neutrophile Granulozyten werden aus dem Blut aufgereinigt und für 2 Stunden mit BAY 61-3606 in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Für die Negativkontrolle erfolgt ebenfalls eine Inkubation mit dem Solvens (Wasser). Die Zellen für die Positivkontrolle werden für 15 Minuten mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt. Danach werden Annexin V (FITC konjugiert) und Propidiumiodid (FITC konjugiert) hinzugefügt und diese mittels Durchflusszytometrie detektiert. Repräsentative Darstellung nach der Auswertung mit der CellQuest® pro Software. Insgesamt wurde der Test bei 5 verschiedenen Blutproben wiederholt.

4.5. Die orale Applikation von BAY 61-3606 im IgG-transferierten Mausmodell

In diesem Mausmodell wurde die orale inhibitorische Wirkung des Syk-Inhibitors in zwei unterschiedlichen Dosen (25 mg/kg (n = 4) und 50 mg/kg (n = 4)) auf das

Krankheitsgeschehen in EBA nach Injektion von anti-Maus-COLVII über 12 Tage getestet. Als Kontrolle diente der Maustyp C57Bl/6 (n = 5).

Wie in der Abbildung 17 zu sehen ist, kam es in allen drei Gruppen zur Ausbildung von Krankheitssymptomen einer „murinen“ EBA in zwölf Tagen. Dies zeigte sich durch Alopezie, Krustenbildung, Rötung und Schuppung auf der Haut (vgl. Abb. 19). In den ersten vier Tagen war bei der Ausprägung der Symptome kein Unterschied zwischen den Gruppen zu erkennen bzw. in den ersten vier Tagen gab es nahezu keine Symptome. Am Tag acht allerdings war die Körperoberfläche der C57Bl/6-Mäuse signifikant mehr betroffen als die mit BAY 61-3606 behandelten Mäuse, zwischen den Gruppen der oralen Therapie gab es keinen signifikanten Unterschied. Bis zum Tag zwölf zeigten die mit BAY 61-3606 behandelten Mäuse eine signifikant minder ausgeprägte Krankheitssymptomatik als die C57Bl/6-Mäuse. Während die C57Bl/6-Mäuse am Tag 12 an etwa 15 % der Körperoberfläche Veränderungen aufwiesen, lagen diese bei den behandelten Mäusen unter 5 %.

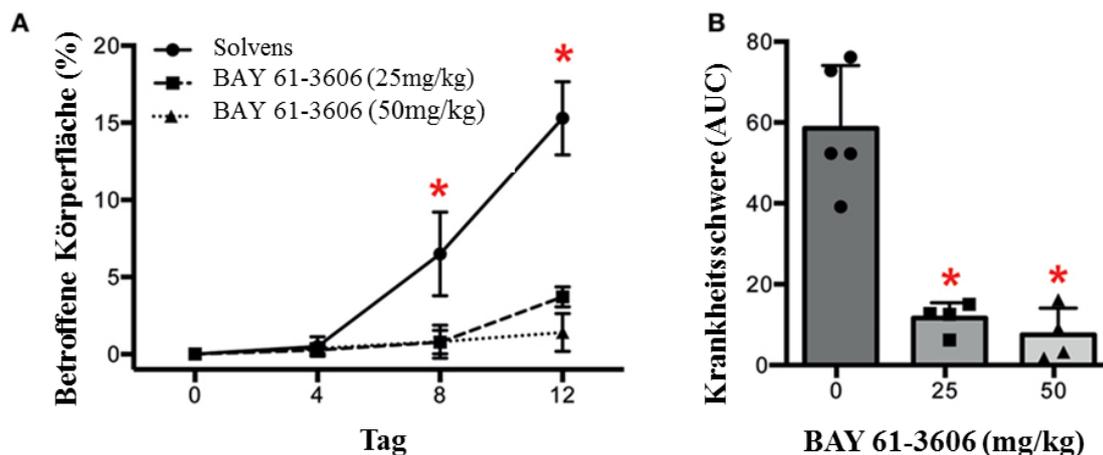


Abb. 17: Krankheitsverlauf im IgG-transferierten EBA-Modell unter der Therapie von BAY61-3606

(Vgl. Samavedam, Mitschker et al. (75)) In der Abbildung A ist die Zunahme der Läsionen auf der Körperoberfläche ohne Inhibitor sowie mit Inhibitor in Dosen von 25 und 50 mg/kg dargestellt. Zu sehen sind hier die Mittelwerte (mit Standardabweichung) an den Tagen 4, 8 und 12. Die roten Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede. ($p < 0,05$; berechnet mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse und Bonferroni-Test).

In der Abbildung B ist die gesamte Krankheitsaktivität in zwölf Tagen dargestellt. Diese wurde als Area under curve (AUC) berechnet. Die Darstellung zeigt die Mittelwerte der AUC mit der Standardabweichung.

Gewebeproben aus Ohr und Haut wurden an Tag 12 entnommen und unter dem Mikroskop bezüglich der Infiltration und Gewebereaktion von drei Personen blind evaluiert. Wie in Abbildung 18 dargestellt ist, wurde eine Skala von 1-5 verwendet. Während 1 keine Entzündung bedeutet, ist 5 eine starke Reaktion. C57Bl/6-Mäuse zeigten im Durchschnitt sowohl in den Ohrgewebsproben als auch in denen aus der Haut eine stärkere Entzündungsreaktion als die mit BAY 61-3606 behandelten Mäuse. Es waren mehr Leukozyten sowie eine deutliche Zunahme der Epidermisdicke in den C57Bl/6-Mäusen zu erkennen. Durch den Inhibitor konnte in beiden Gewebearten eine Reduktion der Entzündung sowohl im Ohr als auch in der Haut erreicht werden. Dabei war eine Dosierung von 25 mg/kg bereits für eine signifikante Linderung der Krankheitsgeschehens ausreichend (Ohr: $p < 0,001$, Haut: $p < 0,001$).

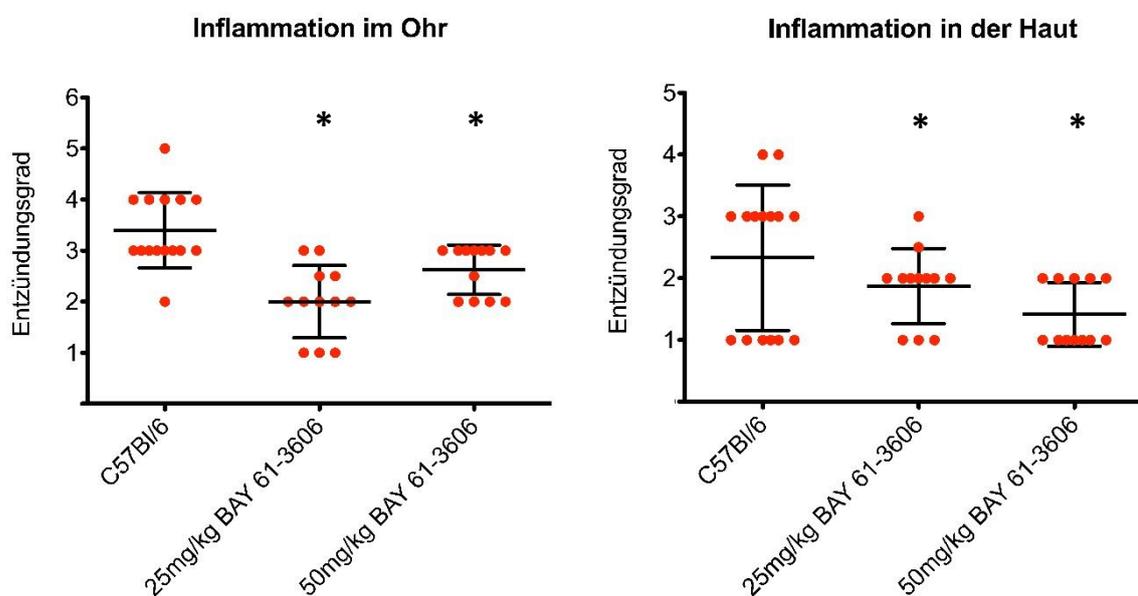


Abb. 18: **Graphische Darstellung der histologischen Entzündungsschwere an Tag 12**

Nach Beendigung des Versuchs erfolgte die histologische Anfärbung der Ohren und periläsionaler Haut mittels H&E. Blind wurde durch 3 wissenschaftliche Mitarbeiter die Entzündungsreaktion auf einer Skala von 1-5 beurteilt. Die Entzündung ohne Inhibitor war sowohl in den Ohren als auch in der Haut stärker ausgeprägt. Dabei zeigt sich eine Signifikanz zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit 25 mg/kg (Ohr: $p < 0,001$, Haut: $p < 0,001$) sowie mit 50 mg/kg (Ohr: $p = 0,004$, Haut $p < 0,001$). Zu sehen ist hier der Mittelwert mit Standardabweichung. Einzelne Punkte zeigen die Entzündung in jeder einzelnen Maus.

Weiterhin wurden IgG- und C3-Ablagerungen in den Gewebeschnitten aus periläsionaler Haut und den Ohren angefärbt und mit einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. In allen Schnitten zeigte sich eine vergleichbare Anfärbung entlang der dermo-epidermalen Junktionszone, sodass die Antigen-Antikörper-Reaktion als erfolgt betrachtet werden kann. Beispielhaft ist diese in den Abb.19 in C57Bl/6 Mäusen und in Mäusen nach Gabe von 50mg/kg dargestellt.

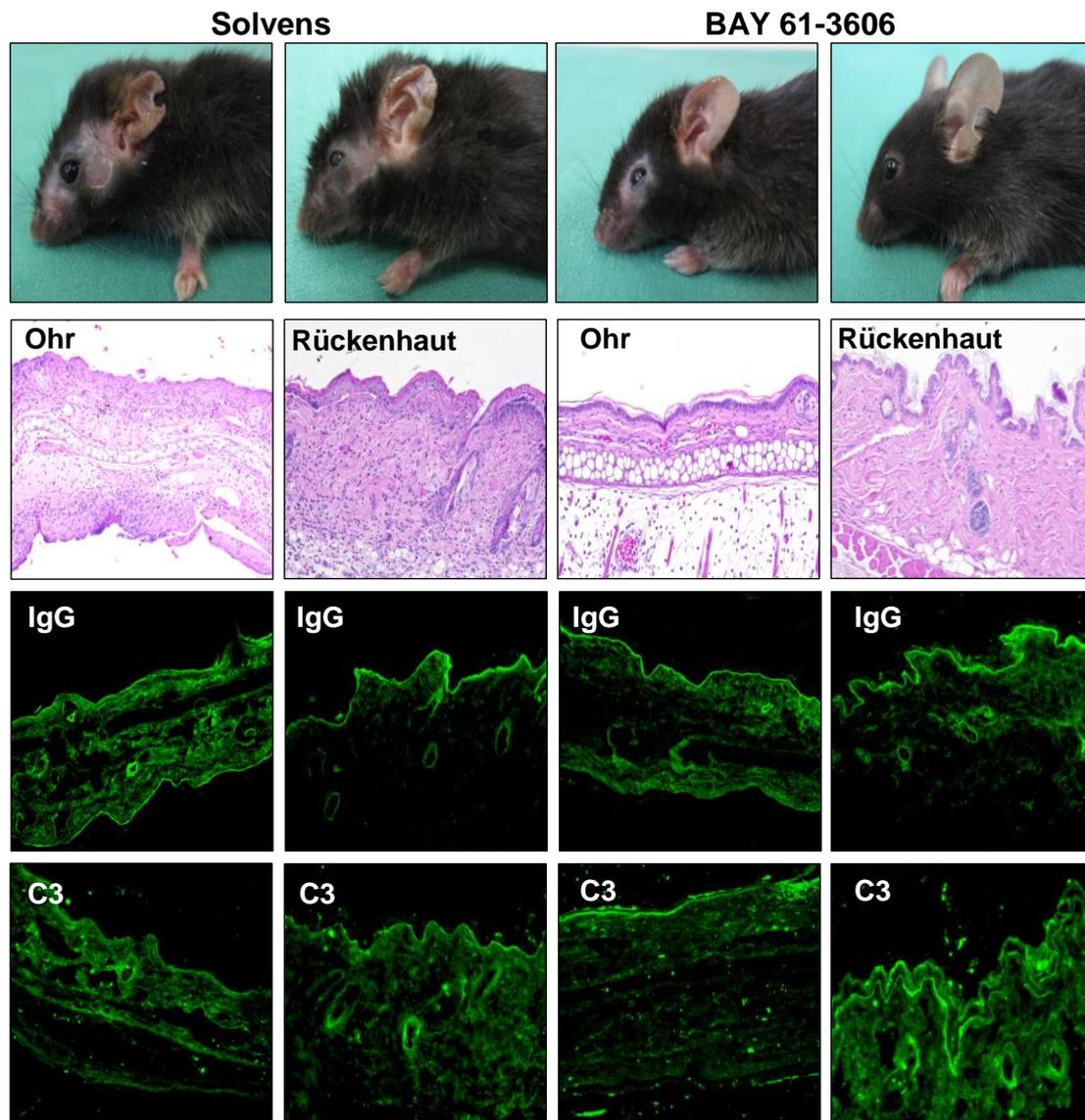


Abb. 19: Phänotypischer und histologischer Vergleich der IgG-transferierten EBA mit und ohne BAY 61-3606

(Vergleiche Samavedam, Mitschker et al. [75]) Phänotypisch ist bereits ein deutlicher Unterschied zwischen Mäusen ohne sowie mit Inhibitor zu erkennen. Auch im H&E-gefärbten Gewebe zeigt sich in unbehandelten Mäusen eine stärkere Gewebereaktion als in behandelten Mäusen. In allen Geweben lässt sich eine Ablagerung von IgG und C3 nachweisen.

4.6. Induktion der Anti-Maus-COLVII-Antikörper-transferierten EBA in myeloischen und lymphatischen Zellreihen bei zellspezifischen Syk-knockout-Mäusen

In diesem Tiermodell wurde untersucht, ob die Expression von Syk in myeloischen und lymphatischen Zellen Einfluss auf den Krankheitsverlauf in einer durch Antikörper transferierten EBA hat. Auch hier wurde über 12 Tage das Krankheitsgeschehen beobachtet, wobei aus Kaninchen gewonnene Antikörper gegen murines Typ VII Kollagen transferiert worden sind. Im Gegensatz zu dem vorherigen Versuch wurde kein Syk-Inhibitor verwendet, vielmehr wurde das Syk-Allel zum Teil oder komplett in myeloischen (LysM-Cre-Mäuse) und lymphatischen (CD2-Cre-Mäuse) Zellen ausgeschaltet.

Dabei zeigte sich, dass in Syk^{fl/fl} LysM-Cre-Mäusen (n = 4) der Ausbruch der EBA vollständig verhindert werden konnte (vgl. Abb. 20 und 21). Ist nun ein Allel ausgeschaltet, (Syk^{fl/+} LysM-Cre-Mäuse, n = 7) zeigt sich eine zunehmende Krankheitschwere über die 12 Tage. Unter der Berücksichtigung der Zeit ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Syk^{fl/fl} LysM-Cre-Mäusen und Syk^{+/+} LysM-Cre-Mäusen ab Tag 8, zwischen den Syk^{fl/+} LysM-Cre-Mäusen und den Syk^{+/+} LysM-Cre-Mäusen ab Tag 12 (berechnet mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Bonferroni- post- hoc- Test). Im Gegensatz dazu zeigte sich keine Änderung des Krankheitsgeschehens in Syk^{fl/fl} CD2-Cre-Mäusen (vgl. Abb.22 und 23).

Daraus lässt sich schließen, dass die Syk- Expression in neutrophilen Granulozyten entscheidend für die Manifestation der EBA ist, Syk in lymphatischen Zellen jedoch keinen – zumindest in diesem Versuchsmodell – Einfluss auf das Entzündungsgeschehen in der EBA hat.

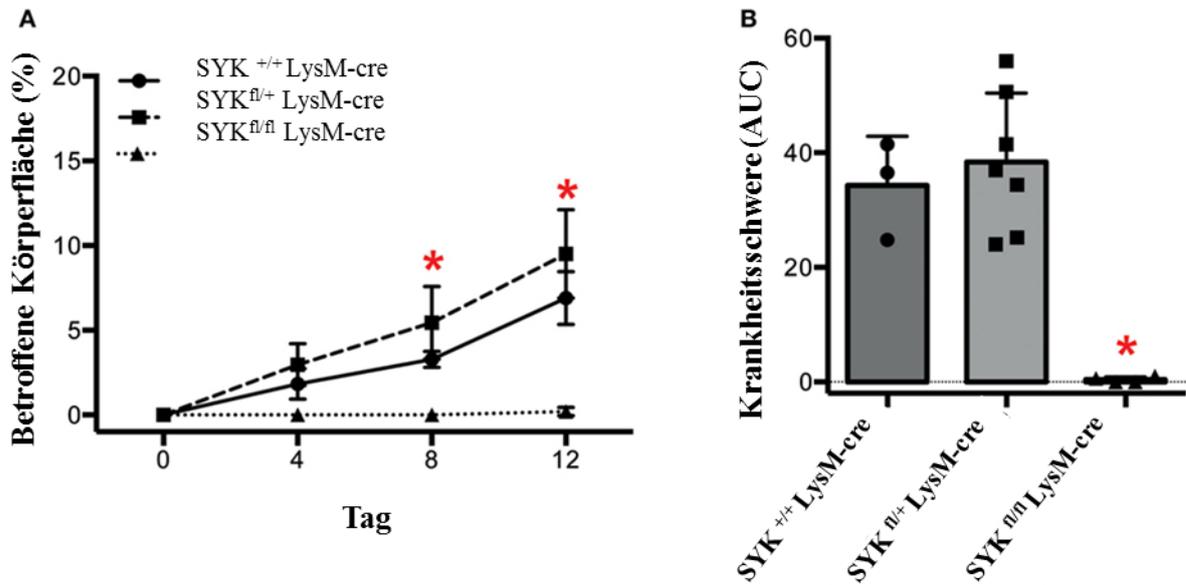


Abb. 20: Krankheitsschwere von Mäusen im IgG-induzierten EBA-Modell bei einem Syk-Knockout in myeloischen Zellen

(Modifiziert nach Samavedam, Mitschker et al. [75]) A: Dargestellt ist der Krankheitsverlauf über 12 Tage nach Injektion von Anti-Maus-Kollagen-VII-IgG. In den Wildtypen (SYK^{+/+} LysM-cre; n=3) zeigt sich die erwartete klinische Entwicklung einer EBA. Auch in Mäusen, in denen nur ein Syk-Allel vorkommt (SYK^{fl/+} LysM-cre; n=7), zeigen sich die klinischen Manifestationen einer EBA, wobei am Tag 12 ein signifikanter Unterschied zu den SYK^{+/+} LysM-cre-Mäusen besteht. In Mäusen ohne Syk-Expression (SYK^{fl/fl} LysM-cre; n=4) zeigen sich phänotypisch gesunde Mäuse. Berechnung der Signifikanz mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse und Bonferroni-Test.

B: Die Krankheitsschwere aller einzelnen Mäuse wurde als AUC zusammengefasst. Mäuse ohne Syk-Allele ((SYK^{fl/fl} LysM-cre) in myeloischen Zellen sind vor dem Ausbruch der Krankheit geschützt. Berechnung der Signifikanz mit ANOVA und Bonferroni-Test.

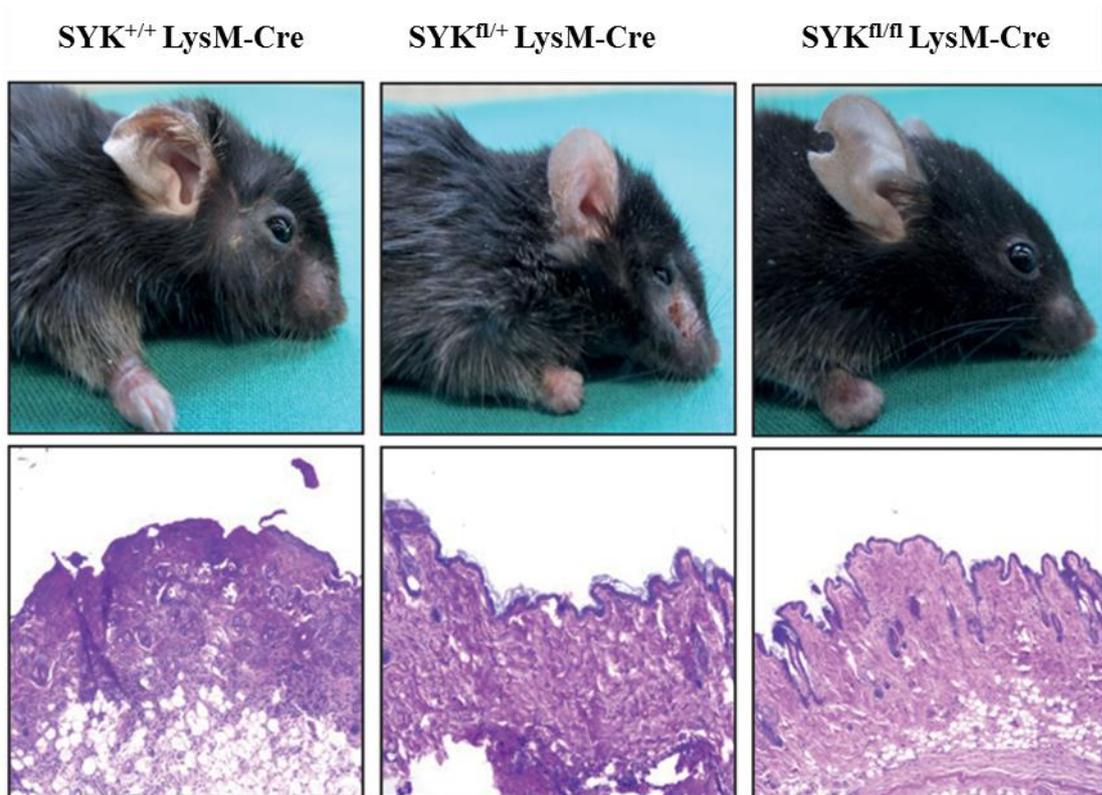


Abb. 21: Darstellung der phänotypischen und der histologischen Unterschiede im Wildtyp sowie nach Ausschalten der Syk-Allele in myeloischen Zellen

(Vergleiche Samavedam, Mitschker et al. [75]) Sowohl im Wildtyp (SYK^{+/+} LysM-cre; n=3) als auch in Mäusen mit nur einem Syk-Allel (SYK^{fl/+} LysM-cre; n=7) erkranken die Mäuse an der EBA. Histologisch ist die Epidermis verdickt und zeigt eine Zunahme der Verhornung. Fehlen die Syk-Allele (SYK^{fl/fl} LysM-cre; n=4), zeigt sich weder phänotypisch noch histologisch das Bild einer EBA.

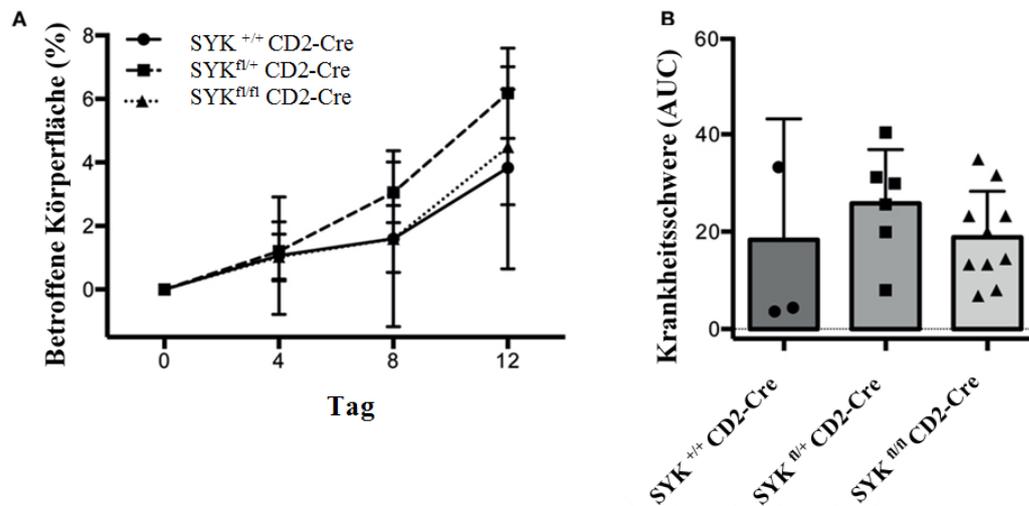


Abb. 22: Krankheitsschwere von Mäusen im IgG-induzierten EBA-Modell bei einem Syk-Knockout in lymphatischen Zellen

(Modifiziert nach Samavedam, Mitschker et al. [75]) A: Dargestellt ist der Krankheitsverlauf über 12 Tage nach Injektion von Anti-Maus- Kollagen- VII-IgG. In den Wildtypen (SYK^{+/+} CD2-cre; n=3) zeigt sich die erwartete klinische Entwicklung einer EBA. Auch in Mäusen, in denen nur ein Syk- Allel vorkommt (SYK^{fl/+} CD2-cre; n=6), sowie ohne Syk- Allele (SYK^{fl/fl} LysM-cre; n=9) zeigen sich die klinischen Manifestationen einer EBA ohne signifikanten Unterschied zum Wildtyp (zweifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni- post- hoc- Test).

B: Die Krankheitsschwere aller einzelnen Mäuse wurde als AUC zusammengefasst. Mäuse ohne Syk-Allele in lymphatischen Zellen entwickeln ebenso wie der Wildtyp eine EBA.

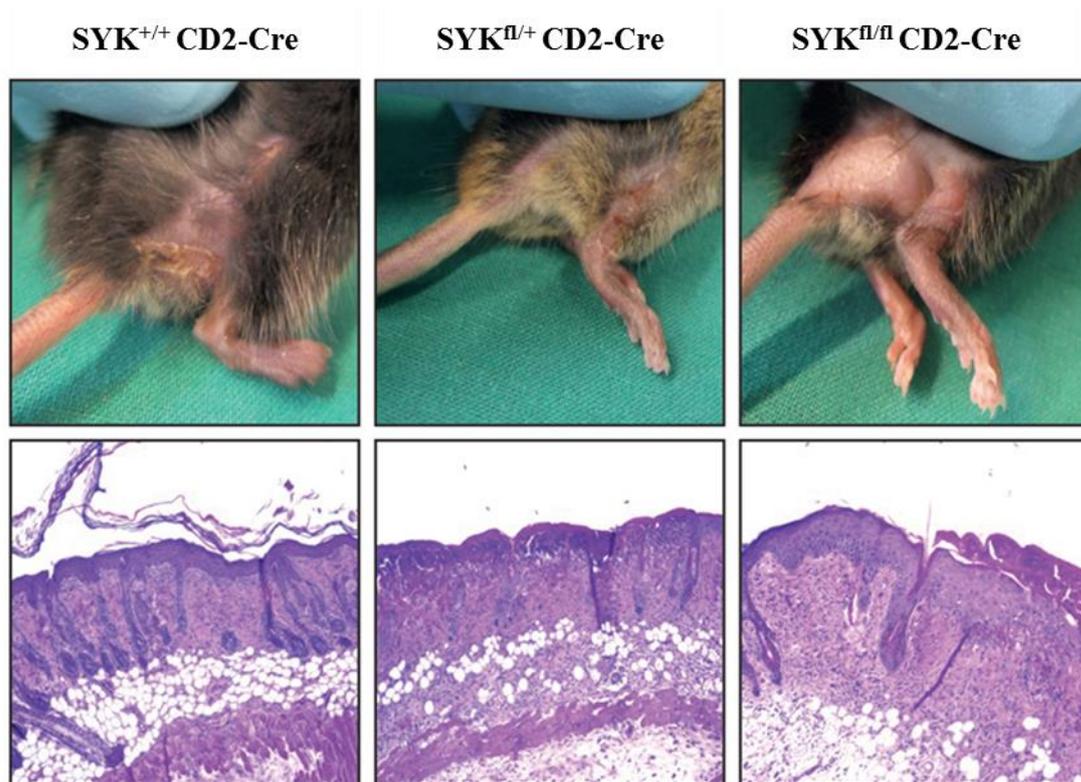


Abb. 23: Darstellung der phänotypischen und der histologischen Unterschiede im Wildtyp sowie nach Ausschalten der Syk-Allele in lymphatischen Zellen

(Vergleiche Samavedam, Mitschker et al. [75]) Sowohl im Wildtyp (SYK^{+/+} CD2-cre) als auch in Mäusen ohne Syk-Allel (SYK^{fl/+} CD2-cre, SYK^{fl/fl} CD2-cre) erkranken die Mäuse an der EBA. Histologisch zeigt sich in allen Mäusen die Epidermis verdickt.

5. Diskussion

EBA ist ein Prototyp einer organspezifischen Autoimmunerkrankung, die durch den Toleranzverlust gegen das in der Sublamina densa gelegene Typ VII Kollagen zu einer subepidermalen Blasenbildung führt. Eine entscheidende Rolle, vor allem in der Effektorphase der Erkrankung, scheinen dabei neutrophile Granulozyten zu spielen, die in das Gewebe migrieren, durch Immunkomplexe aktiviert werden und dann durch die Produktion von Sauerstoffradikalen und Zytokinen die Entzündungsreaktion und subepidermale Blasenbildung auslösen.

Die bisherigen Therapieoptionen der EBA und anderer Autoimmundermatosen sind unspezifische Immunsuppressoren wie Cortison und Ciclosporin. Wie auch bei anderen Autoimmunerkrankungen wird daher versucht, neue spezifische Therapieoptionen zu etablieren.

Ein Forschungsschwerpunkt unserer Arbeitsgruppe ist die gezielte Modulation einer Immunantwort basierend auf neuen Erkenntnissen in der Signaltransduktion. Sowohl in unseren Arbeiten als auch in einer Arbeitsgruppe von Mocsai et al. konnte Syk als entscheidende Signalkaskade in EBA identifiziert werden (88).

Bereits in anderen Studien wurden Syk-Inhibitoren zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung eines spezifischen Syk-Inhibitors (BAY61-3606) in-vitro, ex-vivo und in-vivo getestet.

5.1. Syk-Inhibitoren in Studien

Syk ist bereits in anderen Autoimmunerkrankungen als Therapietarget untersucht worden. Zu den bekanntesten Syk-Inhibitoren zählen R406, Fostamatinib (oral verfügbares Prodrug von R406) und Piceatannol, die vor allem auf ihre Wirksamkeit in rheumatoider Arthritis untersucht worden sind.

Fostamatinib wurde in einer Phase III Studie mit 918 Patienten zur Behandlung von rheumatoider Arthritis verwendet, wobei letztlich zwar eine signifikante Besserung bezüglich der ACR20%-Responder Kriterien (American collage of Rheumatology) gezeigt werden konnte, allerdings blieb eine signifikante Besserung in den radiologischen Untersuchungen der Gelenke unter Verwendung des Sharp/Van der Heijde-Score (SHS) aus (89). Zu den häufigsten Nebenwirkungen zählten arterieller Hypertonus, Neutropenie sowie Diarrhoen. Auch wenn die Neutropenien zum Teil

den Schweregrad 3 erreichten, blieben schwerwiegende Immunerkrankungen oder opportunistische Erkrankungen aus (90,91).

Da über die B-Zell-Rezeptoren die Proliferation und das Überleben der B-Zellen reguliert werden, sind Syk-Inhibitoren in der Etablierung neuer Therapieansätze gerade bei malignen lymphatischen Erkrankungen von großer Bedeutung. Insbesondere wurden für CLL mehrere Studien durchgeführt. Auch in diesen Studien zeigten sich durch die Einnahme von Fostamatinib Nebenwirkungen wie Diarrhoen und Neutropenien. Bei der Verwendung von spezifischeren Syk-Inhibitoren wie Entospletinib (GS-9973) wurden ebenfalls diese Nebenwirkungen beobachtet, allerdings wurde der Inhibitor von den Probanden besser vertragen. Die Ergebnisse der Phase 1 und 2 Studien zeigten insgesamt viel versprechende Ergebnisse in der Behandlung von B-Zell-Lymphomen (92), (93).

In allergischen Erkrankungen wie Asthma ist Syk von großem Interesse, da durch eine Syk-Inhibierung die durch Mastzellen vermittelte Entzündungsreaktionen gehemmt werden (74).

Auch wird ein Syk-Inhibitor (GSK2646264) als topische Therapie in der Behandlung von CLE (NCT Nummer: NCT02927457) (94) und Urtikaria (NCT Nummer: NCT02424799) getestet (95,96) .

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Syk ein attraktives Target in unterschiedlichsten Teilgebieten immunologischer Erkrankungen darstellt, dass Nebenwirkungen durch die Inhibierung jedoch zum Teil die Therapie in den Studien limitierten. Zur Minderung dieser Nebenwirkungen scheint die Testung weiterer spezifischer Syk-Inhibitoren sinnvoll zu sein, ebenso wie die Kombination von Syk-Inhibitoren mit schon zugelassenen Immunmodulatoren, da die Nebenwirkungen dosisabhängig waren. Gerade in der Therapie von Autoimmundermatosen ist jedoch auch die topische Anwendung ein besonderer Reiz, denn so könnte zumindest eine Symptomkontrolle erreicht werden, die vielen Patienten den hohen Leidensdruck nehmen könnte und unter Umständen ein niedriges Nebenwirkungsprofil mit sich brächte.

5.2. Reduzierte Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies aus PMN durch BAY 61-3606

In diesem Versuch konnte zum einen gezeigt werden, dass humane neutrophile Granulozyten durch Immunkomplexe aktiviert werden und zum anderen, dass die Produktion von ROS durch die Hinzugabe des Syk-Inhibitors BAY 61-3606 reduziert

werden kann. Immunkomplexe aus rekombinanten hCOIVII und den Antikörpern IgG1 und IgA1 führen zu einer Aktivierung der PMN, sodass ROS freigesetzt werden. Durch das Hinzufügen des Syk-Inhibitors in unterschiedlichen Dosierungen konnte eine Reduktion der ROS-Freisetzung gemessen werden. Dabei zeigte sich eine signifikante und dosisabhängige Reduktion ab einer Dosis von 125 ng/ml. Die Zellen ohne Inhibitor werden hingegen durch die Immunkomplexe über den Fcγ-Rezeptor aktiviert und folgend werden über eine Signalkaskade, in der Syk beteiligt ist, ROS freigesetzt.

Die ROS-Freisetzung bei Immunkomplexen mit IgG ereignete sich früher als bei Immunkomplexen mit IgA, ebenso wurde der Peak der höchsten Freisetzung mit IgG schneller erreicht. Zudem war die maximale ROS-Produktion bei Verwendung von IgG höher als von IgA (vgl. Abb. 9 und 11). Dieses scheint zunächst im Widerspruch zu den Ergebnissen einer Publikation von Recke et al. zu stehen (Vgl.(97)). Allerdings war in dieser Versuchsdurchführung das Ziel, eine ROS-Produktion zu erzeugen, um die Wirkung des Syk-Inhibitors zu testen, und nicht, wie in der Arbeit von Recke et al., einen Vergleich zwischen IgG und IgA bezüglich der Immunreaktion zu ziehen. Daher wurden in diesem Versuch auch nicht die genauen Konzentrationen der verwendeten Antikörper gemessen, so wie es in der Arbeit von Recke et al. mittels ELISA erfolgte. Aus den in dieser Arbeit gewonnenen Versuchsergebnissen können daher keine Rückschlüsse auf Unterschiede in der Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch verschiedene Immunglobulinklassen getroffen werden.

5.3. Expression von CD66b und CD62L (L-Selektin) bei einer Syk-Inhibition

CD66b und CD62L sind Oberflächenproteine auf Leukozyten. CD62L (L-Selectin) wird auf allen Leukozyten exprimiert (98) und hat eine wichtige Bedeutung bei der Adhäsion und Transmigration in das Gewebe (99). Bei Aktivierung von neutrophilen Granulozyten wird es allerdings herunterreguliert (100). CD66b, ein Mitglied der CEA (carcinoembryonic Ag)-Supergenfamilie, wird auf Granulozyten exprimiert und dient als Aktivierungsmarker (101). CD66b reguliert die Adhäsion zu E-Selektin auf Endothelzellen (102).

In diesem Versuch stellte sich dar, dass nicht stimulierte PMN CD62L exprimieren, während CD66b nur gering exprimiert wird. Aktivierte Zellen hingegen zeigen kaum

eine CD62L-Expression, dafür wird die Expression von CD66b erhöht. Zellen, die vor Aktivierung durch die Immunkomplexe mit BAY 61-3606 15 Minuten inkubiert wurden, zeigten eine unverändert niedrige Konzentration von CD62L, während die Expression von CD66b in der Tendenz dosisabhängig reduziert wurde.

Bisher wurde in der Literatur kein Zusammenhang zwischen Syk und der Expression von CD66b beschrieben. Auch scheint die Regulierung der Expression von CD66b selbst noch nicht geklärt zu sein. In einer Publikation aus dem Jahr 2013 (102) wurde eine Regulierung von CD66b durch p38-MAPK nach der Exposition zu Chemoattractanten beschrieben, wobei eine Hemmung der Kinase zu einer erhöhten Expression führte. Die Autoren schlossen daraus, dass p38-MAPK eine entscheidende Rolle in der Signalpriorisierung im Rahmen der Chemotaxis spielt.

Anhand der Ergebnisse lässt sich vermuten, dass die Syk-Signalkaskade, aktiviert durch Immunkomplexe mittels Fc-Rezeptoren, zu einer erhöhten Expression von CD66b führt. Folglich könnte Syk zu einer verstärkten Adhäsion an Endothelzellen und damit zur Chemotaxis führen. Es wäre daher sinnvoll, in weiteren Forschungsarbeiten die Regulation von CD66b durch den Fc γ -Rezeptor in neutrophilen Granulozyten zu erforschen und dabei der Syk-Signalkaskade besondere Aufmerksamkeit zu schenken.

Gleichzeitig haben wir in unserer Arbeit gezeigt, dass die CD62L-Expression nicht durch die Inhibierung von Syk verändert wurde, sodass sich daraus schließen lässt, dass die Expression nicht durch die Syk-Signalkaskade reguliert wird. Dieses Ergebnis passt zu den Ergebnissen von Abbal et al., die eine Regulation von P-Selectin durch Syk, nicht jedoch von L-Selectin beobachten konnten (103).

5.4. Hemmung der Separation an der dermo-epidermalen Junctionszone im ex-vivo Modell der EBA

Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass die NADPH-Oxidase in PMN ein entscheidender Faktor für die Separation an der DEJ darstellt (25) und Syk in der Aktivierungskaskade der Oxidase involviert ist (104), sollte in dieser Arbeit der Einfluss des Syk-Inhibitors auf die Spaltbildung untersucht werden. Dabei wurde ein bereits etabliertes ex-vivo Modell gewählt, in dem auf menschliche Gefrierschnitte nach Inkubation von Antigenen gegen humanes Typ VII Kollagen neutrophile Granulozyten aufgetragen werden (24).

Dabei zeigte sich, dass bei einer Syk-Inhibierung durch BAY 61-3606 eine signifikante Reduktion der Separation erreicht werden kann. Damit konnte zum einen bestätigt werden, dass neutrophile Granulozyten an der Blasenbildung beteiligt sind, zum anderen konnte bestätigt werden, dass Syk in den dafür ablaufenden Signalkaskaden involviert ist. Hieraus lässt sich folgern, dass die Syk-Inhibierung ein mögliches Target in blasenbildender Autoimmunerkrankungen darstellt. Allerdings darf in diesem Versuchsmodell nicht außer Acht gelassen werden, dass der Versuchsaufbau nicht den realen Bedingungen entspricht und insbesondere die komplexe Immunreaktion, die sich im entzündeten Gewebe ereignet, nicht berücksichtigt wird. Durch die Selektion einzig von PMNs können keine möglichen Wechselreaktionen mit anderen Zelltypen wie B- oder T-Zellen widerspiegelt werden. Es konnte aber bereits gezeigt werden, dass T-Zellen an der Entzündungsreaktion und Blasenbildung in EBA beteiligt sind (27). Des Weiteren kann durch das direkte Auftragen der Zellen auf die Gewebeschnitte die Migration, ein bedeutender Schritt in jedem Entzündungsgeschehen, nicht untersucht werden.

Insgesamt musste dieser Versuch häufig wiederholt werden, da trotz gleicher Bedingungen in vielen Positivkontrollen keine Spaltbildung erzeugt werden konnte, was den Abbruch der Versuchsdurchführung bedeutete. Auch bei Verwendung zuvor „erfolgreicher“ Blutspender und Gefrierschnitte eines Gewebes blieb häufig ein erfolgreicher Versuchsdurchlauf aus. Eine eindeutige Erklärung lässt sich dafür nicht finden. Die Versuchsdurchführung wurde stets nach dem gleichen Protokoll durchgeführt, die Antikörper gegen das humane Typ VII Kollagen entstammten aus einer Serie, die Gefrierschnitte wurden in gleicher Weise hergestellt. Es ist zu überlegen, ob durch die Aufreinigung der PMN diese ihre Aktivität hinunterreguliert haben oder dass bereits vor Blutentnahme, noch im Spender befindlich, eine Aktivierung oder Inhibierung der Zellprozesse in den PMN durch Immunreaktionen im Körper erfolgt sind. Möglicherweise haben sich in einigen Fällen trotz gleicher Durchführung keine Immunkomplexe gebildet, sodass eine Aktivierung der neutrophilen Granulozyten nicht erfolgen konnte. Gerade dabei ist nicht zu vergessen, dass in unserer Versuchsdurchführung auf menschliche Gewebeschnitte Antikörper von Kaninchen inkubiert wurden, diese wiederum menschliche Zellen aktivieren müssen. Somit ist nicht auszuschließen, dass diese Kombination eine suffiziente Immunreaktion erschwert. Zur Optimierung dieses ex-vivo Modells ist zu überlegen, Autoantikörper von Patienten zu verwenden (24).

Auch wenn der Versuch insgesamt eine hohe Abbruchrate zu verzeichnen hatte, lässt sich in denjenigen Fällen, in denen sich eine Spaltbildung in den Positivkontrollen ereignete, eine verminderte Separation durch den Syk-Inhibitor nachweisen. Dieser ex-vivo Versuch stellt ein vereinfachtes Modell der Autoimmunreaktion dar und dient somit der Untersuchung der Blasenbildung durch neutrophile Granulozyten.

5.5. Toxizitätsprüfung von BAY 61-3606 auf neutrophile Granulozyten

Zur Differenzierung von nekrotischem und apoptotischen Zelltod ist die Anfärbung der Zellen mittels Propidiumiodid und Annexin V ein etabliertes Versuchsmodell. Dabei bindet Annexin V an Phosphatidylserin, einem Molekül, welches bei apoptotischen und nekrotischen Vorgängen in die äußere Plasmamembran verlagert wird (87). Propidiumiodid interkaliert hingegen in der DNA und wird nur bei nekrotischen Prozessen und damit bei permeabler Plasmamembran an der Oberfläche exprimiert (105). Wie bereits oben beschrieben sind Annexin-V-positive/PI-negative Zellen apoptotisch, während Annexin-V-positive/PI-positive Zellen nekrotisch oder spät apoptotisch sind.

Dieser Versuch wurde zur Überprüfung eines möglichen toxischen Effekts von BAY61-3606 auf die PMN ausgewählt. Dabei ließ sich feststellen, dass selbst in der höchsten Konzentration des Inhibitors die Anzahl an nekrotischen oder apoptotischen Zellen nicht ansteigt. Somit ist die reduzierte ROS-Produktion nach Zugabe von BAY 61-3606 nicht auf einen Zelltod, sondern auf die Wirkung des Inhibitors zurückzuführen. Bei gezeigter fehlender Toxizität und gegebener Spezifität von BAY61-3606 scheint es sinnvoll, diesen Inhibitor für zukünftige Studien in Betracht zu ziehen.

5.6. Induktion einer EBA in Mäusen durch die Injektion von mCOIVII- Antikörpern aus Kaninchen

Zur weiteren Testung des Syk-Inhibitors wurde mittels aus Kaninchen gewonnenen IgG-Antikörpern eine EBA in Mäusen induziert. Anhand der Darstellung von C3 und IgG in der Fluoreszenz konnte eine Ablagerung in der DEJ in allen Versuchstieren nachgewiesen werden, sodass eine geringe Krankheitsausprägung nicht auf eine missglückte Induktion zurückzuführen ist. Auch wurden durch das gemischte Halten von beiden Geschlechtern sowie den unterschiedlichen Versuchsgruppen gleiche

Bedingungen hergestellt. Da sich innerhalb der zwölf Tage eine deutlich erkennbare Krankheitsausprägung erreichen lässt, ist der Versuchszeitraum als hinreichend anzunehmen. Insgesamt ist das Versuchsmodell genügend für erste in-vivo Experimente zu sehen. Allerdings weist es auch einige Schwächen auf, die im Folgenden näher erläutert werden sollen.

Tiermodelle sind in der Forschung und für die Entwicklung neuer Therapien in der Medizin weit verbreitet und gerade Mausversuche werden dabei präferiert. Da jedoch das Immunsystem von Maus und Mensch zum Teil erhebliche Unterschiede aufweist, ist stets bei der Bewertung der Daten darauf zu achten, diese kritisch zu interpretieren.

Im menschlichen Blut beträgt der Anteil an Leukozyten unter 1 %, das entspricht 4000-10000 Zellen/ μ l. Davon sind 40-60 % Granulozyten und nur 20-40 % Lymphozyten. In Mäusen beträgt der Anteil an neutrophilen Granulozyten hingegen nur 10-25%, während 70-90 % der Zellen Lymphozyten sind (106).

Beispielhaft für die Varietät des Immunsystems lässt sich anführen, dass Mäuse im Gegensatz zu Menschen einen FcRIV haben. Während alle aktivierenden Fc-Rezeptoren im Menschen die Subklasse IgG1 binden, bindet in Mäusen nur der FCRIII murine IgG1. Im Menschen können keine IgE an die Fc-Rezeptoren binden, in Mäusen hingegen werden die Rezeptoren Fc γ RIIB, Fc γ RIII, Fc γ und RIV durch murines IgE aktiviert. An die Fc-Rezeptoren der Mäuse können überdies auch humane Immunglobuline binden, humane Fc-Rezeptoren binden jedoch nicht oder nur sehr schwach murine Immunglobuline (107). Aufgrund dieses Wissens wurde in der Vergangenheit bereits versucht, in Mäusen eine EBA durch menschliche Autoantikörper zu induzieren. Hierbei konnten zwar die Immunglobuline in der DEJ nachgewiesen werden, die klinischen Symptome traten allerdings nicht auf, sodass daraus zunächst geschlossen wurde, dass eine Immunantwort so nicht zu erzielen ist (108,109). Erst im Jahr 2006 gelang es einer Forschungsgruppe durch hohe Konzentrationen an aufgereinigten Autoantikörpern in Mäusen eine EBA zu induzieren (110). Weiterhin ist festzuhalten, dass Unterschiede in der Fc-Rezeptor-Expression auf den Zelltypen im Blut bestehen (107) und überdies in Menschen andere Chemokine vorhanden sind als in Mäusen, gleiche Chemokine wiederum zu unterschiedlichen Effekten in den Zellen und damit im Immunsystem führen können (111).

Um diese doch relevanten Unterschiede zu minimieren, wird intensiv daran geforscht, genetisch veränderte Mäuse zu züchten, die immer mehr menschliche Übereinstimmungen besitzen (112).

Es ist eine Schwäche dieses Versuchs, dass die induzierte EBA nicht der Pathogenese einer Autoimmunerkrankung entspricht und somit wichtige Schritte, insbesondere der Verlust der Selbsttoleranz und die Bildung von Autoantikörpern, nicht erfolgen, sondern lediglich die entzündliche Effektorphase abgebildet wird.

In vorangegangenen Arbeiten wurde daher versucht, ein „aktives Modell“ zu entwickeln. Durch die Immunisierung von Mäusen mit rekombinanten autologen Typ VII Kollagen als Autoantigen konnte dabei in verschiedenen Maussträngen eine Immunantwort erzeugt werden, die je nach Strang unterschiedlicher klinische Ausprägung war, jedoch insgesamt den Symptomen der humanen EBA sehr ähnelte (20). Dieses Modell ist als das aktuell beste zu sehen, da hier sowohl die Bildung der Antikörper als auch die Immunreaktion widergespiegelt werden, allerdings kann auch hier nicht der Beginn des Verlustes der Selbsttoleranz provoziert werden. Basierend auf den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen sollte die Syk Inhibition in einem therapeutischen Ansatz im immunisierungs-induzierten EBA Mausmodell untersucht werden.

Da sich in dem hier verwendeten Tierversuchsmodell nicht nachweisen lässt, ob der protektive Effekt des Syk-Inhibitors auf der Inhibierung der neutrophilen Granulozyten oder der lymphatischen Zellen beruht, führten wir einen weiteren Tierversuch durch, in dem in myeloischen sowie lymphatischen Zellen ein „Syk-knockout“ erreicht wurde. Auch hier wurde eine EBA durch die Injektion von Antikörpern induziert, sodass dieses Modell die gleichen oben genannten Schwächen aufweist, allerdings konnten wir so nachweisen, dass Syk in der Effektorphase lediglich in myeloischen Zellen und nicht in lymphatischen Zellen eine Rolle spielt. Hier wäre es nun interessant, das aktive Modell der EBA mit Syk-knockout-Mäusen zu testen, denn so könnte untersucht werden, ob in den früheren Phasen der Autoimmunerkrankung Syk in anderen Zellen eine entscheidende Funktion beim Ausbruch der Erkrankung zukommt.

5.7. Mikroskopische Unterschiede in der EBA

Neben dem direkten klinischen Vergleich der Mäuse wurde auch das Gewebe bezüglich Infiltration durch neutrophile Granulozyten sowie die Zunahme der Epidermisdicke untersucht. Interessanterweise – auch wenn eine Signifikanz zwischen Gewebeproben von therapierten und nicht therapierten Mäusen bestand – konnte dennoch mikroskopisch bei einigen Mäusen nach Behandlung mit BAY 61-3606 eine große Zellzahl von Leukozyten im Gewebe gesehen werden. Dementsprechend wurde der Grad der Entzündung in diesen Fällen als hoch eingestuft, obwohl die Epidermis zum Teil weniger Veränderungen aufwies. Berücksichtigt man dabei die Ergebnisse der CD62L und CD66b Expression, in denen sich zeigte, dass die Syk-Inhibition nicht CD62L beeinflusst, stellt sich die Frage, ob Syk die Adhäsion oder Migration in das Gewebe signifikant regulieren kann. Um Erkenntnisse darüber zu gewinnen, würde sich die Durchführung von Migrationsassays anbieten (113).

5.8. Spezifität der Syk-Inhibierung

In unserer Arbeit wurde untersucht, ob neutrophile Granulozyten in ihrer Aktivität in den verschiedenen Versuchsmodellen in ihrer Funktion gehemmt werden. Allerdings ist gerade in den in-vivo Experimenten zu bedenken, dass Syk nicht ausschließlich in Neutrophilen vorkommt und somit die Möglichkeit besteht, dass eine Reduktion der Symptome nicht nur auf die Hemmung der Neutrophilen zurückzuführen ist.

In B-Zellen wird Syk entweder direkt über den BCR oder über die Src-Familie aktiviert, die wiederum durch den B-Zell-Rezeptor aktiviert wird und neben der Signalkaskade des BCR auch in der Differenzierung noch unreifer B-Zellen von Bedeutung ist. B-Zellen gehören wie die T-Zellen zum adaptiven Immunsystem und produzieren die Antikörper. Nach Antigenkontakt können sie sich in kurzlebige Plasmazellen oder langlebige Gedächtniszellen differenzieren (114,115).

Während lange Zeit davon ausgegangen worden ist, dass in T-Zellen ZAP-70, die zweite Kinase aus der Syk-Gruppe, und nicht Syk an der Signaltransduktion beteiligt ist, konnte mittlerweile auch Syk in T-Zellen nachgewiesen werden. Auch hier wird Syk über den FcR γ aktiviert und führt so zu einer Cytokinausschüttung (116). In

unserer Arbeitsgruppe konnte wiederum in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden, dass T-Zellen in der Effektorphase an der Migration und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten beteiligt sind (27).

Mit den Ergebnissen aus dem Versuch 4.6 konnten wir zeigen, dass Syk in den lymphatischen Zellen keine entscheidende Funktion zukommt. Berücksichtigt man jedoch das Vorkommen von Syk im adaptiven Immunsystem, welches wie zuvor beschrieben auch am Krankheitsgeschehen beteiligt ist, wäre es interessant zu zeigen, ob Syk in der Pathogenese der EBA weiteren Einfluss hat. Dieses kann in dem hier verwendeten Mausmodell nicht untersucht werden, da – wie ebenfalls schon zuvor beschrieben – lediglich die Effektorphase imitiert wird.

Weiterhin ist ein Vorkommen von Syk in Mastzellen beschrieben, in denen die Kinase durch IgE über den $Fc\epsilon$ -RI aktiviert wird. Mastzellen, in denen Syk inhibiert wird, können nicht mehr degranulieren und es werden keine Cytokine mehr produziert (117). Damit scheint Syk eine wichtige Signalkaskade in allergischen Erkrankungen darzustellen (118,119).

In Makrophagen, die Teil des angeborenen Immunsystems sind und an der Antigenpräsentation, an der Produktion von Zytokinen und ROS sowie an der Phagozytose beteiligt sind, ist Syk in der Signalkaskade des TLR4 beteiligt (120).

Thrombozyten werden über den $Fc\gamma$ RIIIa aktiviert, sodass sie folgend aggregieren. Der Fc-Rezeptor wird ebenfalls durch Immunkomplexe stimuliert und scheint bei Infektionen, insbesondere durch grampositive Erreger, an thrombembolischen Ereignissen beteiligt zu sein (121).

Überdies wird Syk nicht nur in den hämatopoetischen Zellen, sondern auch in anderen Zellreihen wie Fibroblasten, Endothelzellen und Hepatozyten exprimiert (122).

Bei Verwendung von Inhibitoren wie BAY61-3606 sollte somit stets bedacht werden, dass auf der einen Seite zwar gewünschte Effekte in der Regulation des Immunsystems bei Immunerkrankungen erzielt werden können, auf der anderen Seite jedoch auch in weiteren Zellreihen eine Inhibierung erfolgt, ohne dass man deren langfristige Folgen abschätzen kann. Interessant ist dabei zum Beispiel auch die Beobachtung, dass Syk einen antiinflammatorischen Effekt im Komplementsystem aufweist, da es proinflammatorische Effekte des C5aR hemmt (123). Es wird sich erst zukünftig herausstellen, ob die positiven Effekte einer Syk-Inhibierung möglichen negativen Nebenwirkungen überwiegen.

5.9. Zusammenfassung

Autoimmundermatosen wie bullöses Pemphigoid, Pemphigus vulgaris und Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) sind chronisch-entzündliche Erkrankungen der Haut, die durch Autoantikörper gegen intra- oder subepidermale Strukturproteine mit daraus resultierender Blasenbildung charakterisiert sind. Die EBA ist ein Prototyp für eine Autoimmunerkrankung, in der es nach einem Toleranzverlust von Typ VII Kollagen zur Bildung von Autoantikörpern kommt. Durch die Immunreaktion an der dermo-epidermalen Junktionszone werden neutrophile Granulozyten in das Gewebe rekrutiert und dort über ihren Fc γ -Rezeptor durch die Immunkomplexe aktiviert. Dieses führt zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen, die wiederum zur Entzündungsreaktion im Gewebe und so zur Blasenbildung führen. Da die Spleen-Tyrosin-Kinase (Syk) in der Signalkaskade des Fc γ -Rezeptors involviert ist und eine erhöhte Syk Expression in EBA nachgewiesen worden ist, wurde in dieser Arbeit die Wirkung einer Syk-Inhibierung untersucht. Verwendet wurde dabei BAY61-3606, ein oral verfügbarer selektiver Syk-Inhibitor. Untersuchen wurden in vitro als auch im Tiermodell der EBA durchgeführt. Die pharmakologische Syk-Blockade reduzierte in vitro die Immunkomplex-induzierte Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies aus humanen neutrophilen Granulozyten, die mit Immunkomplexen aktiviert wurden, und reduzierte deren Degranulation (gemessen anhand der CD66b Expression). In einem Mausmodell inhibierte BAY61-3606 dosisabhängig die Induktion einer experimentellen EBA. Unter Verwendung zellspezifischer Syk-defizienter Mäuse konnte gezeigt werden, dass Syk in lymphatischen Zellen keinen Einfluss auf die Ausprägung der EBA hat. War Syk dagegen in myeloiden Zellen nicht exprimiert, schützte dies komplett vor der Induktion einer experimentellen EBA. Die hier gewonnen Erkenntnissen der in vitro Versuche an humanen Biomaterialien und im Mausmodell der EBA sind vielversprechend, eine Übertragbarkeit in Patienten scheint gut möglich zu sein, wobei noch weitere Untersuchungen erfolgen müssten. Insbesondere muss dabei die Wirkung einer Syk-Inhibition auf das Immunsystem überprüft werden. In Zusammenschau dieser Ergebnisse lässt sich konstatieren, dass Syk als ein neues Therapietarget in der Therapie der EBA identifiziert werden konnte.

6. Quellenverzeichnis

1. Silverstein AM. Autoimmunity versus horror autotoxicus: the struggle for recognition. *Nat Immunol.* April 2001;2(4):279–81.
2. McQueen F. A B cell explanation for autoimmune disease: the forbidden clone returns. *Postgrad Med J.* April 2012;88(1038):226–33.
3. Hayter SM, Cook MC. Updated assessment of the prevalence, spectrum and case definition of autoimmune disease. *Autoimmun Rev.* 1. August 2012;11(10):754–65.
4. Lerner A, Jeremias P, Matthias T. The World Incidence and Prevalence of Autoimmune Diseases is Increasing. *Int J Celiac Dis.* 16. November 2015;3(4):151–5.
5. Moll I. *Duale Reihe Dermatologie.* 8.Aufl. S.15-26, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2016.
6. Sitaru C, Goebeler M, Zillikens D. Bullöse Autoimmundermatosen (I): Pathogenese und Diagnostik. *JDDG J Dtsch Dermatol Ges.* 1. Februar 2004;2(2):123–39.
7. Murphy, Weaver C. *Janeway Immunologie.* 9. Aufl. Berlin: Springer Spektrum; 2018.
8. Shimanovich I, Rose C, Hirako Y, Butt-Dörje E, Zillikens D. Anti-p200-Pemphigoid – Eine neue blasenbildende Autoimmundermatose. *JDDG J Dtsch Dermatol Ges.* 2004;2(1):7–14.
9. Gammon WR. Epidermolysis bullosa acquisita: A disease of autoimmunity to type VII collagen. *J Autoimmun.* Februar 1991;4(1):59–71.
10. Elliott GT. Two cases of epidermolysis bullosa. *J Cutan Genitourin Dis.* 1895;13:10.
11. Ludwig RJ. Clinical Presentation, Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment of Epidermolysis Bullosa Acquisita. *ISRN Dermatol.* 2013;2013:1–25.
12. Bentz H, Morris NP, Murray LW, Sakai LY, Hollister DW, Burgeson RE. Isolation and partial characterization of a new human collagen with an extended triple-helical structural domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Juni 1983;80(11):3168.
13. Sakai LY, Keene DR, Morris NP, Burgeson RE. Type VII collagen is a major structural component of anchoring fibrils. *J Cell Biol.* 10. Januar 1986;103(4):1577–86.
14. Keene DR, Sakai LY, Lunstrum GP, Morris NP, Burgeson RE. Type VII collagen forms an extended network of anchoring fibrils. *J Cell Biol.* 1. März 1987;104(3):611–21.
15. Parente MG, Chung LC, Ryyänen J, Woodley DT, Wynn KC, Bauer EA, u. a. Human type VII collagen: cDNA cloning and chromosomal mapping of the gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15. August 1991;88(16):6931.

16. Lapiere JC, Woodley DT, Parente MG, Iwasaki T, Wynn KC, Christiano AM, u. a. Epitope mapping of type VII collagen. Identification of discrete peptide sequences recognized by sera from patients with acquired epidermolysis bullosa. *J Clin Invest.* 1. Oktober 1993;92(4):1831–9.
17. Gammon WR, Murrell DF, Jenison MW, Padilla KM, Prisayanh PS, Jones DA, u. a. Autoantibodies to Type VII Collagen Recognize Epitopes in a Fibronectin-Like Region of the Noncollagenous (NC1) Domain. *J Invest Dermatol.* Mai 1993;100(5):618–22.
18. Ishii N, Yoshida M, Hisamatsu Y, Ishida-Yamamoto A, Nakane H, Iizuka H, u. a. Epidermolysis bullosa acquisita sera react with distinct epitopes on the NC1 and NC2 domains of type VII collagen: study using immunoblotting of domain-specific recombinant proteins and postembedding immunoelectron microscopy. *Br J Dermatol.* Mai 2004;150(5):843–51.
19. Ishii N, Yoshida M, Ishida-Yamamoto A, Fritsch A, Elfert S, Bruckner-Tuderman L, u. a. Some epidermolysis bullosa acquisita sera react with epitopes within the triple-helical collagenous domain as indicated by immunoelectron microscopy. *Br J Dermatol.* Mai 2009;160(5):1090–3.
20. Sitaru C. Experimental models of epidermolysis bullosa acquisita. *Exp Dermatol.* Juni 2007;16(6):520–31.
21. Mihai S, Chiriac MT, Takahashi K, Thurman JM, Holers VM, Zillikens D, u. a. The Alternative Pathway of Complement Activation Is Critical for Blister Induction in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita. *J Immunol.* 15. Mai 2007;178(10):6514–21.
22. Sadeghi H, Lockmann A, Hund A-C, Samavedam UKSRL, Pipi E, Vafia K, u. a. Caspase-1-independent IL-1 release mediates blister formation in autoantibody-induced tissue injury through modulation of endothelial adhesion molecules. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15. April 2015;194(8):3656–63.
23. Sitaru C, Mihai S, Otto C, Chiriac MT, Hausser I, Dotterweich B, u. a. Induction of dermal-epidermal separation in mice by passive transfer of antibodies specific to type VII collagen. *J Clin Invest.* 1. April 2005;115(4):870–8.
24. Sitaru C, Kromminga A, Hashimoto T, Bröcker EB, Zillikens D. Autoantibodies to type VII collagen mediate Fcγ-dependent neutrophil activation and induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. *Am J Pathol.* Juli 2002;161(1):301–11.
25. Chiriac M, Roesler J, Sindrilaru A, Scharffetter-Kochanek K, Zillikens D, Sitaru C. NADPH oxidase is required for neutrophil-dependent autoantibody-induced tissue damage. *J Pathol.* Mai 2007;212(1):56–65.
26. Shimanovich I, Mihai S, Oostingh GJ, Ilenchuk TT, Bröcker E-B, Opdenakker G, u. a. 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.* Dezember 2004;204(5):519–27.

27. Bieber K, Witte M, Sun S, Hundt JE, Kalies K, Dräger S, u. a. T cells mediate auto-antibody-induced cutaneous inflammation and blistering in epidermolysis bullosa acquisita. *Sci Rep* [Internet]. 5. Dezember 2016;6.
28. Bernard P, Vaillant L, Labeille B, Bedane C, Arbeille B, Denoeux J-P, u. a. Incidence and Distribution of Subepidermal Autoimmune Bullous Skin Diseases in Three French Regions. *Arch Dermatol*. 1. Januar 1995;131(1):48–52.
29. Wong SN, Chua SH. Spectrum of subepidermal immunobullous disorders seen at the National Skin Centre, Singapore: a 2-year review. *Br J Dermatol*. September 2002;147(3):476–80.
30. Bertram F, Bröcker E-B, Zillikens D, Schmidt E. Prospective analysis of the incidence of autoimmune bullous disorders in Lower Franconia, Germany. *J Dtsch Dermatol Ges*. Mai 2009;7(5):434–9.
31. Koga H, Prost-Squarcioni C, Iwata H, Jonkman M, Ludwig R, Bieber K. Epidermolysis Bullosa Acquisita: The 2019 Update. *Front Med*. 10. Januar 2019;5:362.
32. Gammon WR, Heise ER, Burke WA, Fine JD, Woodley DT, Briggaman RA. Increased frequency of HLA-DR2 in patients with autoantibodies to epidermolysis bullosa acquisita antigen: evidence that the expression of autoimmunity to type VII collagen is HLA class II allele associated. *J Invest Dermatol*. September 1988;91(3):228–32.
33. Reddy H, Shipman AR, Wojnarowska F. Epidermolysis bullosa acquisita and inflammatory bowel disease: a review of the literature. *Clin Exp Dermatol*. April 2013;38(3):225–30.
34. Abrams ML, Smidt A, Benjamin L, Chen M, Woodley D, Mancini AJ. Congenital Epidermolysis Bullosa Acquisita: Vertical Transfer of Maternal Autoantibody From Mother to Infant. *Arch Dermatol*. 1. März 2011;147(3):337.
35. Ishii N, Hamada T, Dainichi T, Karashima T, Nakama T, Yasumoto S, u. a. Epidermolysis bullosa acquisita: What's new? *J Dermatol*. 1. März 2010;37(3):220–30.
36. Iwata H, Vorobyev A, Koga H, Recke A, Zillikens D, Prost-Squarcioni C, u. a. Meta-analysis of the clinical and immunopathological characteristics and treatment outcomes in epidermolysis bullosa acquisita patients. *Orphanet J Rare Dis*. 4. September 2018;13.
37. Engineer L, Ahmed AR. Emerging treatment for epidermolysis bullosa acquisita. *J Am Acad Dermatol*. Mai 2001;44(5):818–28.
38. Oktem A, Akay BN, Boyvat A, Kundakci N, Erdem C, Bostancı S, u. a. Long-term results of rituximab-intravenous immunoglobulin combination therapy in patients with epidermolysis bullosa acquisita resistant to conventional therapy. *J Dermatol Treat*. 10. Mai 2016;1–5.
39. Kawase K, Oshitani Y, Mizutani Y, Shu E, Fujine E, Seishima M. Inflammatory epidermolysis bullosa acquisita effectively treated with minocycline. *Acta Derm Venereol*. September 2014;94(5):615–6.

40. Sanli H, Akay BN, Ayyildiz E, Anadolu R, Ilhan O. Remission of severe autoimmune bullous disorders induced by long-term extracorporeal photochemotherapy. *Transfus Apher Sci.* 1. Dezember 2010;43(3):353–9.
41. Lanini LLS, Prader S, Siler U, Reichenbach J. Modern Management of Phagocyte defects. *Pediatr Allergy Immunol.* 1. September 2016
42. Mocsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med.* 1. Juli 2013;210(7):1283–99.
43. Tak T, Tesselaar K, Pillay J, Borghans JAM, Koenderman L. What’s your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. *J Leukoc Biol.* 10. Januar 2013;94(4):595–601.
44. Day RB, Link DC. Regulation of neutrophil trafficking from the bone marrow. *Cell Mol Life Sci CMLS.* Mai 2012;69(9):1415–23.
45. Lapidot T, Kollet O. The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2mnull mice. *Leukemia.* 2. Oktober 2002;16(10):1992–2003.
46. Semerad CL, Liu F, Gregory AD, Stumpf K, Link DC. G-CSF Is an Essential Regulator of Neutrophil Trafficking from the Bone Marrow to the Blood. *Immunity.* 1. Oktober 2002;17(4):413–23.
47. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *Annu Rev Immunol.* 23. April 2012;30(1):459–89.
48. Bardoel BW, Kenny EF, Sollberger G, Zychlinsky A. The Balancing Act of Neutrophils. *Cell Host Microbe.* 14. Mai 2014;15(5):526–36.
49. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* September 2007;7(9):678–89.
50. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, u. a. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science.* 5. März 2004;303(5663):1532–5.
51. Schönrich G, Raftery MJ. Neutrophil Extracellular Traps Go Viral. *Mol Innate Immun.* 2016;366.
52. Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, Wang Q, Gutierrez MG, Brown GD, u. a. Neutrophils sense microbial size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol.* November 2014;15(11):1017–25.
53. Jenne CN, Wong CHY, Zemp FJ, McDonald B, Rahman MM, Forsyth PA, u. a. Neutrophils Recruited to Sites of Infection Protect from Virus Challenge by Releasing Neutrophil Extracellular Traps. *Cell Host Microbe.* 13. Februar 2013;13(2):169–80.
54. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 25. Februar 2013;13(3):159–75.

55. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the Human Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocyte. *Blood*. 15. Mai 1997;89(10):3503–21.
56. Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology*. 9. Januar 2010;49(9):1618–31.
57. Leliefeld PHC, Koenderman L, Pillay J. How Neutrophils Shape Adaptive Immune Responses. *Front Immunol*. 14. September 2015;6.
58. Futosi K, Fodor S, Mócsai A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol*. November 2013;17(3):638–50.
59. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc γ Receptors: Old Friends and New Family Members. 2006. *Immunity*. Januar 2006; 19-28.
60. Nimmerjahn F, Bruhns P, Horiuchi K, Ravetch JV. Fc γ RIV: A Novel FcR with Distinct IgG Subclass Specificity. *Immunity*. Juli 2005;23(1):41–51.
61. Futosi K, Mócsai A. Tyrosine kinase signaling pathways in neutrophils. *Immunol Rev*. September 2016;273(1):121–39.
62. Anania JC, Chenoweth AM, Wines BD, Hogarth PM. The Human Fc γ RII (CD32) Family of Leukocyte FcR in Health and Disease. *Front Immunol* [Internet]. 2019;10.
63. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc γ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol*. Januar 2008;8(1):34–47.
64. Indik ZK, Park JG, Hunter S, Schreiber AD. The molecular dissection of Fc gamma receptor mediated phagocytosis. *Blood*. 15. Dezember 1995;86(12):4389–99.
65. Takai T. Fc Receptors and Their Role in Immune Regulation and Autoimmunity. *J Clin Immunol*. Januar 2005;25(1):1–18.
66. Ravetch JV, Kinet JP. Fc Receptors. *Annu Rev Immunol*. April 1991;9(1):457–92.
67. Robinson DR, Wu YM, Lin SF. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*. 20. November 2000;19(49):5548–57.
68. Bradshaw JM. The Src, Syk, and Tec family kinases: distinct types of molecular switches. *Cell Signal*. August 2010;22(8):1175–84.
69. Mócsai A, Ruland J, Tybulewicz VLJ. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol*. Juni 2010;10(6):387–402.
70. Fütterer K, Wong J, Gruzza RA, Chan AC, Waksman G. Structural basis for syk tyrosine kinase ubiquity in signal transduction pathways revealed by the crystal structure of its regulatory SH2 domains bound to a dually phosphorylated ITAM peptide. *J Mol Biol*. August 1998;281(3):523–37.
71. Tsang E, Giannetti AM, Shaw D, Dinh M, Tse JKY, Gandhi S, u. a. Molecular Mechanism of the Syk Activation Switch. *J Biol Chem*. 21. November 2008;283(47):32650–9.

72. Wong BR, Grossbard EB, Payan DG, Masuda ES. Targeting Syk as a treatment for allergic and autoimmune disorders. *Expert Opin Investig Drugs*. Juli 2004;13(7):743–62.
73. Weinblatt ME, Kavanaugh A, Genovese MC, Musser TK, Grossbard EB, Magilavy DB. An Oral Spleen Tyrosine Kinase (Syk) Inhibitor for Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med*. 30. September 2010;363(14):1303–12.
74. Geahlen RL. Getting Syk: Spleen Tyrosine Kinase as a Therapeutic Target. *Trends Pharmacol Sci*. August 2014;35(8):414–22.
75. Samavedam U, Mitschker N, Kasprick A, Bieber K, Schmidt E, Laskay T, u. a. Whole-genome expression profiling in skin reveals SYK as a key regulator of inflammation in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *Front Immunol*. 2018;9.
76. Deklaration-von-Helsinki_2013_DE.pdf [Internet]. [zitiert 7. Oktober 2018]. Verfügbar unter: http://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user_upload/downloads/pdf-Ordner/International/Deklaration-von-Helsinki_2013_DE.pdf
77. Zhou L, Somasundaram R, Nederhof RF, Dijkstra G, Faber KN, Peppelenbosch MP, u. a. Impact of Human Granulocyte and Monocyte Isolation Procedures on Functional Studies. *Clin Vaccine Immunol CVI*. Juli 2012;19(7):1065–74.
78. Aga E, Katschinski DM, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Muller K, u. a. Inhibition of the Spontaneous Apoptosis of Neutrophil Granulocytes by the Intracellular Parasite *Leishmania major*. *J Immunol*. 15. Juli 2002;169(2):898–905.
79. Recke A, Sitaru C, Vidarsson G, Evensen M, Chiriac MT, Ludwig RJ, u. a. Pathogenicity of IgG subclass autoantibodies to type VII collagen: Induction of dermal–epidermal separation. *J Autoimmun*. Juni 2010;34(4):435–44.
80. Stevens P, Winston DJ, Dyke KV. In vitro evaluation of opsonic and cellular granulocyte function by luminol-dependent chemiluminescence: utility in patients with severe neutropenia and cellular deficiency states. *Infect Immun*. Oktober 1978;22(1):41.
81. Gross S, Gammon ST, Moss BL, Rauch D, Harding J, Heinecke JW, u. a. Bioluminescence imaging of myeloperoxidase activity in vivo. *Nat Med*. April 2009;15(4):455–61.
82. Sweeney JF, Nguyen PK, Omann GM, Hinshaw DB. Ultraviolet irradiation accelerates apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes: protection by LPS and GM-CSF. *J Leukoc Biol*. Oktober 1997;62(4):517–23.
83. Sawai H, Domae N. Discrimination between primary necrosis and apoptosis by necrostatin-1 in Annexin V-positive/propidium iodide-negative cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 5. August 2011;411(3):569–73.
84. Iwata H, Witte M, Samavedam UKSRL, Gupta Y, Shimizu A, Ishiko A, u. a. Radio-sensitive Hematopoietic Cells Determine the Extent of Skin Inflammation in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita. *J Immunol*. 1. September 2015;195(5):1945–54.

85. Kasprick A, Bieber K, Ludwig RJ. Drug Discovery for Pemphigoid Diseases. *Curr Protoc Pharmacol.* 2019;84(1):e55.
86. Yamamoto N, Takeshita K, Shichijo M, Kokubo T, Sato M, Nakashima K, u. a. The orally available spleen tyrosine kinase inhibitor 2-[7-(3,4-dimethoxyphenyl)-imidazo[1,2-c]pyrimidin-5-ylamino]nicotinamide dihydrochloride (BAY 61-3606) blocks antigen-induced airway inflammation in rodents. *J Pharmacol Exp Ther.* September 2003;306(3):1174–81.
87. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutellingsperger C. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* Juli 1995;184(1):39–51.
88. Németh T, Virtic O, Sitaru C, Mócsai A. The Syk Tyrosine Kinase Is Required for Skin Inflammation in an In Vivo Mouse Model of Epidermolysis Bullosa Acquisita. *J Invest Dermatol.* Oktober 2017;137(10):2131–9.
89. Weinblatt ME, Genovese MC, Ho M, Hollis S, Rosiak-Jedrychowicz K, Kavanaugh A, u. a. Effects of Fostamatinib, an Oral Spleen Tyrosine Kinase Inhibitor, in Rheumatoid Arthritis Patients With an Inadequate Response to Methotrexate: Results From a Phase III, Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Parallel-Group Study. *Arthritis Rheumatol.* 1. Dezember 2014;66(12):3255–64.
90. Weinblatt ME, Kavanaugh A, Genovese MC, Musser TK, Grossbard EB, Magilavy DB. An Oral Spleen Tyrosine Kinase (Syk) Inhibitor for Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med.* 30. September 2010;363(14):1303–12.
91. Friedberg JW, Sharman J, Sweetenham J, Johnston PB, Vose JM, LaCasce A, u. a. Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1. April 2010;115(13):2578–85.
92. Liu D, Mamorska-Dyga A. Syk inhibitors in clinical development for hematological malignancies. *J Hematol Oncol* [Internet]. 28. Juli 2017;10.
93. Hoellenriegel J, Coffey GP, Sinha U, Pandey A, Sivina M, Ferrajoli A, u. a. Selective, novel spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitors suppress chronic lymphocytic leukemia B-cell activation and migration. *Leukemia.* 7. Februar 2012;26(7):1576–83.
94. Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Clinical Effect of GSK2646264 in Cutaneous Lupus Erythematosus Subjects - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [zitiert 8. März 2019]. Verfügbar unter: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02927457>
95. Barker MD, Liddle J, Atkinson FL, Wilson DM, Dickson MC, Ramirez-Molina C, u. a. Discovery of potent and selective Spleen Tyrosine Kinase inhibitors for the topical treatment of inflammatory skin disease. *Bioorg Med Chem Lett.* 15. November 2018;28(21):3458–62.
96. Kocatürk E, Maurer M, Metz M, Grattan C. Looking forward to new targeted treatments for chronic spontaneous urticaria. *Clin Transl Allergy.* 10. Januar 2017;7.

97. Recke A, Trog LM, Pas HH, Vorobyev A, Abadpour A, Jonkman MF, u. a. Recombinant Human IgA1 and IgA2 Autoantibodies to Type VII Collagen Induce Subepidermal Blistering Ex Vivo. *J Immunol*. 15. August 2014;193(4):1600–8.
98. McEver RP. Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. *Cardiovasc Res*. 1. August 2015;107(3):331.
99. Ivetic A. Signals regulating L-selectin-dependent leucocyte adhesion and transmigration. *Int J Biochem Cell Biol*. 1. März 2013;45(3):550–5.
100. Kahn J, Ingraham RH, Shirley F, Migaki GI, Kishimoto TK. Membrane proximal cleavage of L-selectin: identification of the cleavage site and a 6-kD transmembrane peptide fragment of L-selectin. *J Cell Biol*. 15. April 1994;125(2):461–70.
101. Yoon J, Terada A, Kita H. CD66b Regulates Adhesion and Activation of Human Eosinophils. *J Immunol*. 15. Dezember 2007;179(12):8454–62.
102. Kim D, Haynes CL. The Role of p38 MAPK in Neutrophil Functions: Single Cell Chemotaxis and Surface Marker Expression. *The Analyst [Internet]*. 21. November 2013;138(22).
103. Abbal C, Lambelet M, Bertaggia D, Gerbex C, Martinez M, Arcaro A, u. a. Lipid raft adhesion receptors and Syk regulate selectin-dependent rolling under flow conditions. *Blood*. 15. November 2006;108(10):3352–9.
104. Nguyen GT, Green ER, Mecsas J. Neutrophils to the ROScues: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Front Cell Infect Microbiol [Internet]*. 25. August 2017;7.
105. Kepp O, Senovilla L, Vitale I, Vacchelli E, Adjemian S, Agostinis P, u. a. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology*. 10. Dezember 2014;3(9).
106. Doeing DC, Borowicz JL, Crockett ET. Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods. *BMC Clin Pathol*. 12. September 2003;3:3.
107. Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood*. 14. Juni 2012;119(24):5640–9.
108. Borradori L, Caldwell JB, Briggaman RA, Burr CE, Gammon WR, James WD, u. a. Passive transfer of autoantibodies from a patient with mutilating epidermolysis bullosa acquisita induces specific alterations in the skin of neonatal mice. *Arch Dermatol*. Mai 1995;131(5):590–5.
109. Shigemoto T, Nashiro K, Tsuchida T, Seki Y, Tamaki K. Administration of IgG Fraction of Epidermolysis Bullosa Acquisita (EBA) Serum into Mice. *J Dermatol*. 1988;15(2):123–7.
110. Woodley DT, Ram R, Doostan A, Bandyopadhyay P, Huang Y, Remington J, u. a. Induction of Epidermolysis Bullosa Acquisita in Mice by Passive Transfer of Autoantibodies from Patients. *J Invest Dermatol*. 1. Juni 2006;126(6):1323–30.

111. Mestas J, Hughes CCW. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J Immunol.* 3. Januar 2004;172(5):2731–8.
112. Macchiarini F, Manz MG, Palucka AK, Shultz LD. Humanized mice. *J Exp Med.* 21. November 2005;202(10):1307–11.
113. Weckmann M, Becker T, Nissen G, Pech M, Kopp MV. SiMA: A simplified migration assay for analyzing neutrophil migration. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol.* 2017;91(7):675–85.
114. Geisberger R, Cramer R, Achatz G. Models of signal transduction through the B-cell antigen receptor. *Immunology.* Dezember 2003;110(4):401–10.
115. Shah HB, Smith K, Wren JD, Webb CF, Ballard JD, Bourn RL, u. a. Insights From Analysis of Human Antigen-Specific Memory B Cell Repertoires. *Front Immunol.* 15. Januar 2019
116. Park J-E, Cullins D, Zalduondo L, Barnett SL, Yi A-K, Kleinau S, u. a. Molecular Basis for T Cell Response Induced by Altered Peptide Ligand of Type II Collagen. *J Biol Chem.* 1. Juni 2012;287(23):19765–74.
117. Gilfillan AM, Rivera J. The tyrosine kinase network regulating mast cell activation. *Immunol Rev.* März 2009;228(1):149–69.
118. Pamuk ON, Tsokos GC. Spleen tyrosine kinase inhibition in the treatment of autoimmune, allergic and autoinflammatory diseases. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(6):222.
119. Siraganian RP, de Castro RO, Barbu EA, Zhang J. Mast Cell Signaling: the Role of Protein Tyrosine Kinase Syk, its Activation and Screening methods for New Pathway Participants. *FEBS Lett.* 15. Dezember 2010;584(24):4933–40.
120. Yi Y-S, Son Y-J, Ryou C, Sung G-H, Kim J-H, Cho JY. Functional Roles of Syk in Macrophage-Mediated Inflammatory Responses. *Mediators Inflamm [Internet].* 2014 [zitiert 7. März 2019];2014.
121. Watson CN, Kerrigan SW, Cox D, Henderson IR, Watson SP, Arman M. Human platelet activation by *Escherichia coli*: roles for Fc γ RIIA and integrin α IIb β 3. *Platelets.* 17. August 2016;27(6):535–40.
122. Yanagi S, Inatome R, Takano T, Yamamura H. Syk expression and novel function in a wide variety of tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 2. November 2001;288(3):495–8.
123. Karsten CM, Pandey MK, Figge J, Kilchenstein R, Taylor PR, Rosas M, u. a. Galactosylated IgG1 links Fc γ RIIB and Dectin-1 to block complement-mediated inflammation. *Nat Med.* September 2012;18(9):1401–6.

7. Danksagung

Großer Dank gebührt zu allererst meinem Doktorvater Prof. Dr. Ralf Ludwig, der mir mein Forschungsprojekt angeboten hat und der mich mit seiner großen Begeisterungsfähigkeit, seiner Motivation und seinem offenem Ohr stets unterstützt hat. Zudem danke ich ihm dafür, dass er mir die Aufnahme in das GRK 1727 ermöglichte.

Ich danke meinem Betreuer Dr. rer. nat. Unni Krishna Samavedam, der immer ein guter Ansprechpartner war, der mir bei den Versuchen und den Auswertungen half und mir so das wissenschaftliche Arbeiten näher brachte.

Zudem danke ich Katja Bieber, Hiroshi Koga und Andreas Recke, die ebenfalls viel Zeit investierten, um mir Versuchsdurchführungen zu zeigen und bei Fragen immer erreichbar waren.

Weiterhin möchte ich allen Kollegen der Forschungsgruppe danken, die für eine gute Arbeitsatmosphäre im Labor gesorgt haben. Ich denke gerne an die dort verbrachte Zeit zurück.

Meinen Eltern Rainer und Sabine danke ich vom ganzen Herzen für die jahrelange Unterstützung. Ihr habt mich immer meinen Weg gehen lassen und mir stets ermöglicht, meine Ziele zu erreichen.

Ein besonderer Dank kommt noch meinem Bruder Jan zu, der mir während der kompletten schulischen und universitären Laufbahn mit seiner Geduld, seiner Hilfsbereitschaft und seinem Wissen half, Aufgaben zu lösen, wenn ich nicht weiter wusste.

Zu allerletzt danke ich meinen Freunden für all die unvergessliche Zeit in und außerhalb der Universität und möchte dabei insbesondere Line, Rieke, Gyde, Karola, Thomas und Michi nennen, die mich von Anfang an begleitet haben.

8. Lebenslauf

Name: Nina Mitschker
Geburtsdatum: 13.02.1989
Geburtsort: Delmenhorst, Deutschland



Ausbildung

seit 01.05.2019 **Weiterbildungsassistentin in der Orthopädie und Unfallchirurgie**
Agaplesion Diakonieklinikum Hamburg (Dr. Sagnak)

12/2016 - 03/2019 **Weiterbildungsassistentin in der Allgemein- und Viszeralchirurgie „common trunk“**
Agaplesion Diakonieklinikum Hamburg (PD Dr. Dr. Roblick)

10/2009 - 7/2016 **Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck**

08/2013 - 09/2014 **Experimenteller Teil der Dissertation** (PI: Prof. Dr. Ralf Ludwig, Dermatologie)

2001 - 2008 **Max-Planck-Gymnasium Delmenhorst**
Musikzweig bis 2005

Auslandsstudium

08/2012 - 03/2013 Auslandssemester an der Universität *Universita degli studi di Bari*, Italien

Praktisches Jahr

05/2015 - 09/2015 1. Terial: Plastische Chirurgie, UKSH Lübeck

09/2015 - 12/2015 2. Terial: Chirurgie, Spital Uster (Schweiz)

12/2015 - 04/2016 3. Terial: Innere Medizin, Sana Kliniken Lübeck

Famulaturen/Nebentätigkeiten

12/2014 - 11/2016	Aushilfskraft Pflege in der Praxis Dr.Bräutigam, Lübeck
29.09.2014 - 12.10.2014	Unfallchirurgie, Krankenhaus Wermelskirchen GmbH
25.08.2014 - 09.09.2014	Praxis für plastische Chirurgie, Dr. Bräutigam, Lübeck
31.07.2014 - 14.08.2014	Praxis für Orthopädie, Dres.Jablonski & Koschnitzki, Lübeck
03.03.2014 - 02.04.2014	Wahlfach Immunologie, UKSH Lübeck
03/2014 - 02/2015	Studentische Hilfskraft experimentelle Dermatologie
04.03.2013 - 19.03.2013	Urologie, Policlinico di Bari, Italien
12.03.2012 - 26.03.2012	Rheumatologie, Ev.Krankenhaus Oldenburg
22.02.2012 - 08.03.2012	Neurologie, UKSH Hamburg
11/2010 - 07/2011	Studentische Hilfskraft in der Anatomie

Publikationen

U. Samavedam, N. Mitschker, A. Kasprick, K. Bieber, E.Schmidt, T. Laskay, A. Recke, S. Goletz, G. Vidarsson, F.S. Schulze, M. Armbrust, K. Schulze Dieckhoff, H. H. Pas, M. Jonkman, K. Kalies, D. Zilikens, Y. Gupta, S. M. Ibrahim, R. J. Ludwig *Whole-Genome Expression Profiling in Skin Reveals SYK as a Key Regulator of Inflammation in Experimental Epidermolysis bullosa acquisita*; *Frontiers in Immunology*, 2018, Bd.9

A. Kemmer, K. Bieber, A. Abadpour, X. Yu, N. Mitschker, S. Roth, C. Kauderer, R. J. Ludwig, K. Seeger, J. Köhl, D. Zillikens, A. Recke; *A recombinant fusion protein derived from dog hookworm inhibits autoantibody-induced dermal-epidermal separation ex vivo*; *Experimental Dermatology*, 2015, Bd. 11

Wissenschaftliche Präsentationen

Fallpräsentation auf dem Norddeutschen Chirurgenkongress 12/2017
Lymphangioliomyomatose: Extrapulmonale Manifestation einer Lungenerkrankung

Vortrag auf der Tagung der ADF (Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung) 3/2015

BAY61-3606, a novel spleen tyrosine kinase inhibitor, attenuates organ-specific, autoantibody-induced tissue injury

Posterpräsentation beim On-site visit der Reviewer des GRK1727, Universität zu Lübeck 01/15

Syk inhibitor in EBA: a new therapeutic target?

Sprachkenntnisse

Deutsch
Englisch
Italienisch (B1-Level)

Besondere Qualifikationen

Stipendium des Graduiertenkollegs 1727 (finanziert durch die DFG)
Versuchstierkunde FELASA-B 12/2013

Tätigkeiten im freien Jahr 2008/09

Praktikum im Rettungsdienst DRK Hude
Beginn der Ausbildung zur Rettungsanwältin

Pflegepraktika:

Innere Medizin: Klinikum Leer

Orthopädie: Fachklinik für Orthopädie Stenum

Kardiologie: UKSH Lübeck

Außerberufliche Interessen

Handball (3. Liga)