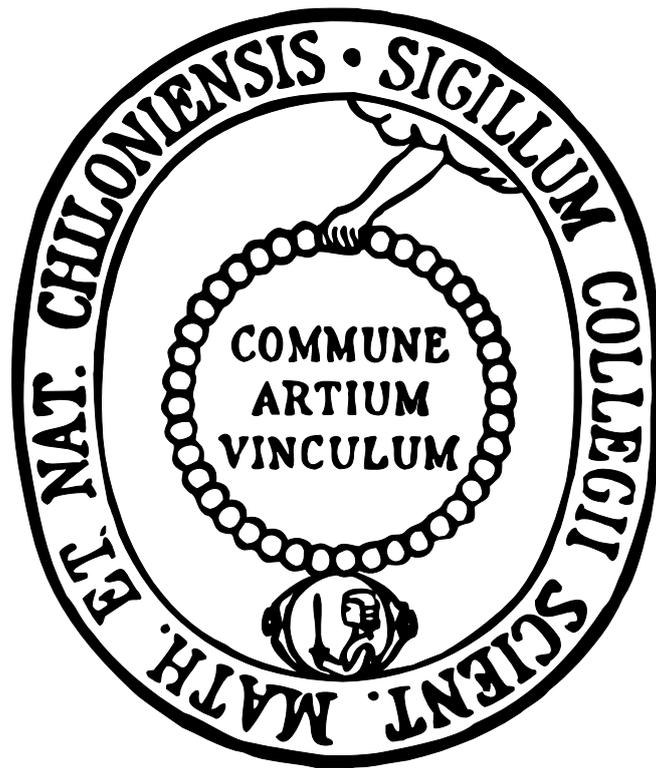


**Charakterisierung und Untersuchung
neuer JAK-Inhibitoren zur Behandlung
chronisch entzündlicher
Darmerkrankungen**



Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Helene Geese

Kiel 2017

Erster Gutachter:

Prof. Dr. Bernd Clement

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Philip Rosentiel

Tag der mündlichen Prüfung:

15. September 2017

Zum Druck genehmigt:

15. September 2017

Prof. Dr. Natascha Oppelt
(Dekanin)

„Indes sie forschten, röntgten, filmten, funkten,
entstand von selbst die köstlichste Erfindung: der
Umweg als die kürzeste Verbindung zwischen zwei
Punkten.“

-Erich Kästner

Meiner Familie

Abkürzungsverzeichnis

AKT	Gene der Proteinkinase B
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser (<i>aqua destilatta</i>)
Ascl	<i>achaete-scute complex homolog</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
CCD	“ <i>coiled-coiled</i> ” domain
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CO	Kohlenstoffmonoxid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CU	Colitis ulcerosa
CXCL	<i>C-X-C motif ligand</i>
CYP	Cytochrom P
DAB	Diaminobenzidin
DBD	<i>DNA binding domain</i>
DLB	<i>denaturing lysis buffer</i>
DMEM	<i>Dulbecco´s Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbecco´s phosphate buffered salt solution</i>
DSS	<i>dextran sulfate sodium</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermale Wachstumsfaktoren (<i>epidermal growth factor</i>)
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell scanning</i>
FBS	Fötales Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FDA	<i>Food and Drug administration</i>
FERM	Band-4.1, ezrin, radixin, moesin

II Abkürzungsverzeichnis

FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FKBP12	<i>FK506 binding protein</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Gramm
GALT	<i>gut-associated lymphatic tissue</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GAS	<i>gamma interferon activating sites</i>
GIT	Gastrointestinal Trakt
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-stimulierender Faktor
gp	Glykoprotein
GWAS	Genomweite Assoziationsstudien
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
hIL-6R	Humaner IL-6-Rezeptor
hLM	humane Lebermikrosomen
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high- performance liquid chromatography</i>)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
<i>IBD1</i>	<i>Inflammatory bowel disease 1</i>
IEC	<i>intestinal epithelial cells</i>
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IUPAC	<i>International Unit of Pure ad Applied Chemsitry</i>
JAK	Januskinase
JH	JAK-homolog
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
K _i	Inhibitor konstante
Ki67	Kiel-67
KO	<i>knock-out</i>
konz.	konzentriert
LC/MS	<i>liquid chromatography/ mass spectroscopy</i>

Abkürzungsverzeichnis III

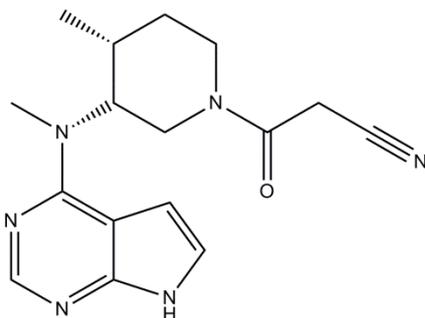
Lyz	<i>lysozyme</i>
MALT	<i>mucosa-associated lymphatic tissue</i>
MAP	<i>mitogen activated protein</i>
mARC	<i>Mitochondrial amidoxime reducing component</i>
MC	Morbus Crohn
MEM	<i>Minimum Essential Media</i>
mg	Milligramm
MGF	<i>Mammary gland factor</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MTS	MTS[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]
Muc	Mucin
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
ng	Nanogramm
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
nM	Nanomolar
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein</i>
Olfm	<i>olfactomedin</i>
p-	phosphoryliert
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PMS	Phenazinmethosulfat

IV Abkürzungsverzeichnis

PPAR	Peroxisome-Proliferator-Rezeptor
PPR	<i>pattern recognition receptor</i>
qPCR	<i>real-time quantitative polymerase chain reaction</i>
Reg	<i>regenerating islet-derived protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institut</i>
RT	Raumtemperatur
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SH	<i>Src-homology</i>
SLM	Schweinelebermikrosomen
SSC	<i>sidewards scatter</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
TAD	Transkriptionsdomäne
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTBS	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
Tyk	Tyrosinkinase
Tyr	Tyrosin
UV	Ultraviolett
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

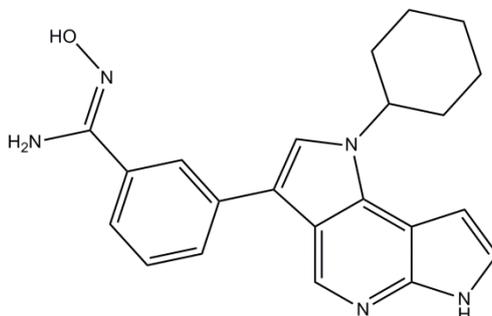
Strukturformelverzeichnis

Tofacitinib



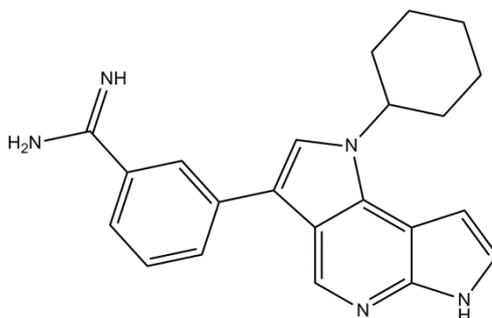
3-((3R,4R)-4-methyl-3-(methyl(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)piperidin-1-yl)-3-oxopropanenitril

PF-183



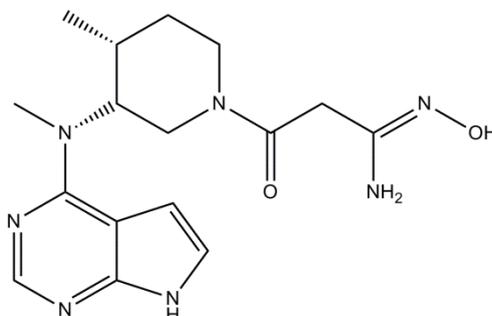
3-(1-cyclohexyl-1,6-dihydrodipyrrolo[2,3-b:2',3'-d]pyridin-3-yl)-N-hydroxybenzimidamid

PF-185



3-(1-cyclohexyl-1,6-dihydrodipyrrolo[2,3-b:2',3'-d]pyridin-3-yl)benzimidamid

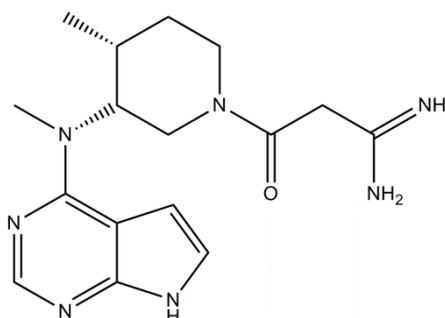
PF-189



(Z)-N'-hydroxy-3-((3R,4R)-4-methyl-3-(methyl(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)piperidin-1-yl)-3-oxopropanimidamid

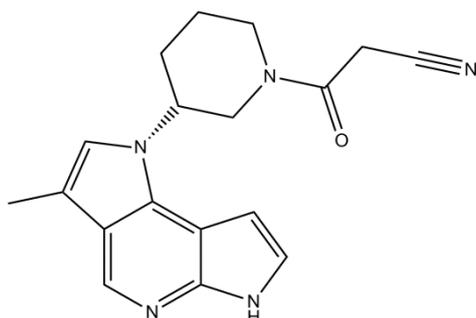
VI Strukturformelverzeichnis

PF-192



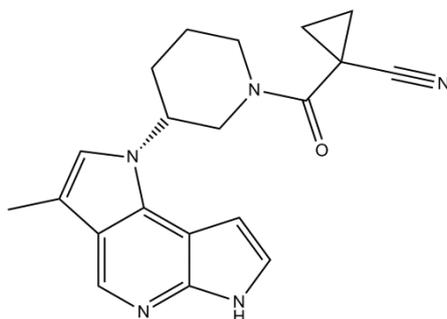
3-((3*R*,4*R*)-4-methyl-3-(methyl(7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)amino)piperidin-1-yl)-3-oxopropanimidamid

PF-068



(±) *cis*-3-[4-Methyl-3-(3-methyldipyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridin-1(6*H*)-yl)piperidin-1-yl]-3-oxopropanenitril

PF-069



(±) *cis*-1-[4-Methyl-3(3-methyldipyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridin-1(6*H*)-yl)piperidin-1-yl]carbonyl)cyclopropanecarbonitril

Abkürzungsverzeichnis	I
Strukturformelverzeichnis	V
Inhaltsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	1
1.1.1 Risikofaktoren chronisch entzündlicher Darmerkrankungen	2
1.1.1.1 Umweltfaktoren	2
1.1.1.2 Genetik	3
1.1.2 Der Gastrointestinaltrakt	3
1.1.2.1 Aufbau	3
1.1.2.2 Barrierefunktion und intestinales Immunsystem	5
1.1.3 Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen	7
1.2 Der Janus-Kinase- <i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>- Signalweg	12
1.2.1 Janus Kinasen	13
1.2.2 STAT-Proteine	14
1.2.3 Biologische Funktion der JAKs und STATs	15
1.2.3.1 JAK-abhängige Funktionen	15
1.2.3.2 STAT-abhängige Funktionen	17
1.2.4 Inhibition des JAK/STAT-Signalweges	20
1.3 Arzneistoffprofil des Tofacitinibs	21
1.3.1 Pharmakodynamik	22
1.3.1.1 Wirkmechanismus	22
1.3.1.2 Nebenwirkungen	23
1.3.2 Pharmakokinetik	23
1.3.2.1 Absorption und Distribution	23
1.3.2.2 Metabolismus und Elimination	23
1.4 Das Prodrug-Prinzip	26
1.4.1 Allgemein	26
1.4.2 Amidoxim-Prodrugs	26
1.4.3 Weitere Methoden zur gezielten Freigabe im Kolon	28
2 Zielsetzung	30
3 Material und Geräte	32
3.1 Enzyme	32
3.2 Zelllinien	32
3.3 Medien, Supplemente und Puffer	33
3.4 Zytokine	34
3.5 Antikörper	34
3.6 Chemikalien	35
3.7 Geräte	37
3.8 Verbrauchsmaterialien	38
4 Methoden	40
4.1 Metabolismusstudien	40
4.1.1 Gewinnung porciner und humaner Lebermikrosomen	40

VIII Inhaltsverzeichnis

4.1.2	Bestimmung des Proteingehaltes der Lebermikrosomen.....	40
4.1.3	Bestimmung des Cytochrom P450-Gehaltes	40
4.1.4	In vitro Biotransformationsansätze	41
4.1.5	Photometrische Quantifizierung von Cyanid	41
4.1.6	Kalibrierung und Wiederfindung	42
4.2	Untersuchungen zur Stabilität	43
4.3	Zellkulturmethoden.....	43
4.3.1	Kultivierung humaner Zelllinien.....	43
4.3.2	Zellviabilitätsmessung mittels MTS-Assay	44
4.3.3	AnnexinV/Propidiumiodid-Markierung und Analyse	45
4.3.4	in vitro Wundheilung	45
4.4	Molekularbiologische Methoden.....	47
4.4.1	Isolierung der Gesamt-RNA.....	47
4.4.2	cDNA-Synthese	48
4.4.3	Quantitative Echt-Zeit Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	48
4.5	Proteinbiochemische Methoden	49
4.5.1	Gewinnung von Proteinlysaten	49
4.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	49
4.5.3	Western Blot Analyse	50
4.5.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	50
4.5.3.2	Western Blot.....	50
4.5.4	Enzyme-linked immunoassay (ELISA)	51
4.6	Organotypische Methoden	52
4.6.1	Gewinnung von Organoiden	52
4.6.2	Passagieren der Organoide.....	53
4.6.3	Einfluss auf Differenzierungs- und Stammzellenmarker.....	53
4.7	In vivo Studien	53
4.7.1	Bioverfügbarkeit von Tofacitinib nach rektaler Gabe.....	53
4.7.1.1	Tierstudiendesign.....	53
4.7.1.2	Gewinnung und Aufarbeitung von Plasmaproben	54
4.7.1.3	Aufarbeitung von Organproben.....	54
4.7.1.4	HPLC-Analytik für Tofacitinib	55
4.7.1.5	Herstellung des Klistiers.....	55
4.7.1.6	Herstellung der wirkstoffhaltigen Lösung zur i.p. Injektion.....	55
4.7.2	in vivo Testungen des Prodrug-Prinzips.....	56
4.7.2.1	Tierstudiendesign.....	56
4.7.2.2	Gewinnung und Aufarbeitung von Plasmaproben	56
4.7.2.3	Aufarbeitung der Organproben	56
4.7.2.4	HPLC-Analytik für PF-189 und PF-192 und Tofacitinib	57
4.7.2.5	HPLC-Analytik für PF-183 und PF-185.....	58
4.8	Behandlung der DSS-Kolitis in der Maus.....	58
4.8.1	Tierstudiendesign.....	58
4.8.2	Induktion einer akuten Kolitis.....	59
4.9	Histologische Färbungen	59
4.9.1	Aufarbeitung des Gewebes	59
4.9.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE).....	59
4.9.3	Bestimmung des histologischen Index	60
4.9.4	Diaminobenzidin (DAB)-Färbung.....	61
4.9.5	Tunel-Methode.....	61
5	Ergebnisse.....	62
5.1	Metabolismusstudien zur Abspaltung von Cyanid.....	62

5.1.1	Charakterisierung der mikrosomalen Fraktionen aus Schweine- und Menschenleber ...	62
5.1.2	Kalibrierung und Wiederfindung	63
5.1.3	<i>in vitro</i> Biotransformation von Tofacitinib	63
5.1.3.1	Bestimmung der Cyanidmenge nach Inkubation	63
5.1.3.2	Einfluss der Substratkonzentration auf die Bildung von Cyanid	65
5.1.3.3	Inhibitionsstudien mit Ketoconazol.....	68
5.1.3.4	Inkubationen mit rekombinanten CYP450-Isoenzymen.....	69
5.1.4	<i>in vitro</i> Biotransformation von Tofacitinib-Derivaten	69
5.2	<i>In vitro</i> Untersuchungen von Tofacitinib, PF-189 und PF-183	71
5.2.1	Charakterisierung von Tofacitinib, PF-189 und PF-183	71
5.2.1.1	Expression von JAK und STAT-Proteinen	71
5.2.1.2	Stabilität der Amidoxim-Prodrugs	71
5.2.1.3	Überprüfung der Toxizität von Tofacitinib, PF-189 und PF-183	73
5.2.1.4	Wirkung von Tofacitinib, PF-189 und PF-183 auf Ba/F3-gp130/hIL6R-Zellen	80
5.2.1.5	Inhibition des JAK/STAT-Signalweges durch Amidoxim-Prodrugs.....	81
5.2.1.6	Überprüfung der Inhibition durch Amidine von PF-189 und PF-183.....	86
5.2.1.7	Wirkung von Tofacitinib, PF-189 und PF-183 auf Immunzellen	88
5.2.1.8	Kinetik der JAK/STAT-Inhibition durch Tofacitinib, PF-189 und PF-183	89
5.2.1.9	Untersuchungen der Selektivität gegen JAK1/JAK2/Tyk2.....	93
5.2.1.10	Untersuchungen der Selektivität gegen JAK1 und JAK3.....	95
5.2.2	Wirkung auf die <i>in vitro</i> Wundheilung	96
5.2.3	Wirkung von Tofacitinib, PF-189 und PF-183 auf den IFN- γ -induzierten Zelltod.....	100
5.3	<i>In vitro</i> Studien mit Organoiden murinen Ursprungs	105
5.3.1	Einfluss von Tofacitinib, PF-189 und PF-183 auf Stammzell- und Differenzierungsmarker der Organoide	105
5.3.2	JAK/STAT-Signalweg in Organoiden.....	107
5.4	<i>In vivo</i> Studien	108
5.4.1	Expressionslevel von JAK- und STAT-Proteinen im murinen Darm	108
5.4.2	Bioverfügbarkeit von Tofacitinib in der Maus nach rektaler oder i.p. Gabe.....	109
5.4.2.1	Kalibrierung und Wiederfindung von Tofacitinib	110
5.4.2.2	Bestimmung von Tofacitinib nach rektaler oder intraperitonealer Gabe.....	111
5.4.3	Überprüfung der Funktion des Amidoxim-Prodrug-Prinzips mit PF-189 und PF-183 ...	112
5.4.3.1	Kalibrierung und Wiederfindung von dem Amidoxim PF-189 und dem korrespondierendem Amidin PF-192	113
5.4.3.2	Kalibrierung und Wiederfindung von dem Amidoxim PF-183 und dem korrespondierendem Amidin PF-185	114
5.4.3.3	Konzentrationen von PF-189/PF-192 und PF-183/PF-185.....	115
5.4.4	Einfluss von Tofacitinib, PF-189 und PF-183 auf gesunde Mäuse	116
5.4.5	Wirkung von Tofacitinib, PF-189 und PF-183 auf eine akute DSS-Kolitis.....	120
5.4.6	Histologie des Kolons	128
5.4.7	HPLC-Analytik zum Nachweis von Tofacitinib, PF-189/PF-192 und PF-183/PF-185 nach einer akuten induzierten DSS-Kolitis	134
5.4.7.1	Kalibrierung und Wiederfindung.....	134
5.4.7.2	Konzentrationen von Tofacitinib, PF-189 und PF-183 in Leber, Niere, Kolon.....	135
6	Diskussion	136
6.1	Beurteilung der Analytik zum Nachweis von Cyanid	136
6.2	Cyanid ist ein Metabolit von Tofacitinib	137
6.3	<i>In vitro</i> Charakterisierung von Tofacitinib, PF-189 und PF-183	139
6.3.1	Physiologische Relevanz der verwendeten Konzentrationen	140
6.3.2	Tofacitinib, PF-189 und PF-183 zeigen keinen Einfluss auf die Zellviabilität von HT-29 Zellen	141
6.3.3	Tofacitinib, PF-189 und PF-183 induzieren keine Apoptose von HT-29 Zellen bei niedrigen Konzentrationen.....	141

X Inhaltsverzeichnis

6.3.4	Tofacitinib, PF-189 und PF-183 als potentielle Inhibitoren von Zytokin-vermittelten JAK/STAT-Signalwegen	142
6.3.4.1	Inhibition des IL-6-vermittelten JAK/STAT-Signalweges	142
6.3.4.2	Inhibition des IFN- γ -vermittelten JAK/STAT-Signalweges.....	144
6.3.4.3	Inhibition des IL-22-vermittelten JAK/STAT-Signalweges	145
6.3.4.4	Inhibition des IL-4-vermittelten JAK/STAT-Signalweges	146
6.3.4.5	Inhibition des JAK/STAT-Signalweges in Organoiden.....	146
6.3.5	PF-183 führt zu einer längeren Inhibition als PF-189.....	148
6.4	Induktion einer akuten dextran sodium sulfate-Kolitis	149
6.4.1	Die Behandlung mit Tofacitinib, PF-189 und PF-183 führte zum Gewichtsverlust	149
6.4.2	PF-189 induzierte die Reduktion von S100a8, S100a9 und IL-6	150
6.4.2.1	Einfluss geringer PF-183 Konzentrationen auf den Verlauf akuten DSS-induzierten Kolitis	151
6.5	Einfluss von Tofacitinib, PF-189 und PF-183 auf die Wundheilung.....	154
6.5.1	PF-189 und PF-183 inhibierten die Wundheilung in vivo aber nicht in vitro.....	154
6.5.2	Tofacitinib führte zu einer erhöhten Anzahl apoptotischer Zellen	157
6.5.3	Bestätigung des Prodrug-Prinzips	158
6.5.4	Amidoxim-Prodrugs zeigen keinen Effekt auf eine akute DSS-Kolitis.....	160
6.5.5	Zusammenfassung der in vitro und in vivo Daten von Tofacitinib, PF-189 und PF-183	162
6.6	Ausblick.....	165
7	Zusammenfassung.....	167
8	Summary	170
9	Literaturverzeichnis	172
Anhang	190

1 Einleitung

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Unter dem Begriff chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) versteht man eine rezidive oder permanente Entzündung des Gastrointestinaltraktes (GIT). Zu den zwei häufigsten Formen von CED zählen Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU). Epidemiologische Studien zeigen, dass die Inzidenz beider Erkrankungen in den letzten Jahrzehnten angestiegen ist [1]. Die Inzidenzraten für MC in Europa schwanken zwischen 0,04 bis 5 Fällen pro 100000 Personenjahre und für CU zwischen 0,3 bis 12,7 Personenjahre. Die Prävalenz beträgt für MC bis zu 322 pro 100000 Personen und für CU liegt sie bei bis zu 505 pro 100000 Personen in Europa [2]. Asien und der mittlere Osten weisen eine Inzidenz von 6,3 pro 100000 Personenjahre für CU und 5 pro 100000 Personenjahre für MC auf [2].

Die Inzidenzraten bei CU unterscheiden sich auch zwischen den Geschlechtern. Dabei erkranken Männer häufiger (18,2 Fälle pro 100000 Personenjahre) als Frauen (11,9 Fälle pro 100000 Personenjahre) an CU [3]. Bei MC unterscheiden sich die Inzidenzraten nach Region, so dass man keine genaue Aussage machen kann, ob mehr Frauen oder Männer betroffen sind [4].

Die Erkrankung kann zwar schon im Kindes- und Jugendalter auftreten, jedoch liegt der Gipfel der Manifestation zwischen 16 und 25 Jahren [5].

Die Symptome beider Erkrankungen sind Diarrhö, Fieber, blutiger Stuhl, Gewichtsverlust, Unterleibsschmerzen und starker Appetitverlust. Die wiederkehrende Entzündung kann Bildung von Aphten und Fisteln begünstigen [6]. Zusätzlich zeigen Patienten auch extraintestinale Begleiterkrankungen, wie Osteoporose, Psoriasis, Morbus Bechterew und Cholelithiasis [7]. Zudem ist eine chronische Entzündung mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Darmkrebs assoziiert [8].

MC und CU können durch die Lokalisation, die Verteilung der Entzündung und durch die Anwesenheit unterschiedlicher Immunzellen voneinander unterschieden werden. Bei MC tritt die Entzündung diskontinuierlich im kompletten gastrointestinalen Trakt auf. Die Entzündung ist charakterisiert durch das Auftreten sogenannter „skip“-Bereiche [9]. Dabei handelt es sich um Gewebeabschnitte, die von der

2 Einleitung

Entzündung betroffen sind. Die Entzündung betrifft alle Darmschichten: die *Mukosa*, die Bindegewebsschicht (*Lamina propria mucosae*) und die Muskelschicht (*Lamina muscularis mucosae*). Histologisch kann man Ansammlungen von Immunzellen (Granulome) und eine vermehrte Migration von Makrophagen und Lymphozyten in die Darmschichten beobachten [9, 10].

Dagegen ist die Entzündung bei CU auf das Kolon begrenzt und betrifft nur die Mukosa und Submukosa [9]. Anders als bei MC ist CU durch eine kontinuierliche Entzündung des Gewebes und den Verlust von Gobletzellen charakterisiert [9]. Histologisch ist sowohl die Beteiligung von neutrophilen Granulozyten in der Lamina propria und den Krypten als auch die Bildung von Kryptenabzessen und Ulzerationen zu beobachten [9, 11].

CED wird durch das Zusammenspiel mehrerer Faktoren hervorgerufen. Dabei spielen sowohl genetische als auch Umweltfaktoren und Defekte in der Barrierefunktion der Mukosa eine Rolle [12]. Diese Faktoren werden in den folgenden Kapiteln näher beschrieben.

1.1.1 Risikofaktoren chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

1.1.1.1 Umweltfaktoren

Eines der meist untersuchten Umweltfaktoren stellt das Rauchen dar. Während das Rauchen die Entstehung und Verschlechterung von MC begünstigt, zeigt es bei Patienten mit CU eine protektive Wirkung [13, 14].

Die hohen Inzidenzraten für CU und MC in Industrieländern im Vergleich zu nicht entwickelten Ländern lassen vermuten, dass die westliche Ernährungsweise und der höhere Hygienestandard weitere Risikofaktoren für CED darstellen [15, 16]. Eine gesteigerte Aufnahme von Fetten, wie beispielsweise mehrfach ungesättigten Fettsäuren und Omega-6-Fettsäuren führten zu einem erhöhten Risiko von CU. Dagegen wird das Risiko für MC durch den Genuss von Ballaststoffen und Früchten gesenkt [15]. Auch wurde gezeigt, dass die Einnahme von Gemüse das Risiko für CU senkt [17]. Außerdem wird angenommen, dass eine zu geringe Aufnahme von Antigenen in der frühen Lebensphase aufgrund übermäßiger Hygiene eine mangelhafte Entwicklung oder eine Überreaktion des angeborenen Immunsystems begünstigt [18].

1.1.1.2 Genetik

Genomweite Assoziationsstudien (GWAS) auf Grundlage der Hapmap Datenbank und ImmunoChip konnten insgesamt 163 Loci identifizieren, die mit einem erhöhten Risiko für CED assoziiert sind [19]. 1996 wurde der erste Risikolocus *inflammatory bowel disease 1 (IBD1)* für MC auf Chromosom 16 gefunden [20]. Später wurde dieser Locus als *nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 (NOD2)* identifiziert [21]. NOD2 ist als intrazellulärer Rezeptor für die Erkennung und Bindung von Muramyl-Dipeptid aus der Bakterienmembran und somit für die Auslösung einer Signalkaskade zur bakteriellen Abwehr wichtig [22]. Es hat sich gezeigt, dass eine Vielzahl der beschriebenen Risikogene eine wichtige Rolle bei der Interaktion von Mikroben mit dem Darm spielen. Weitere Risikoloci, wie *STAT3 (signal transducers and activators of transcription)* und *JAK2 (Januskinase 2)* sind mit CU assoziiert [23, 24].

1.1.2 Der Gastrointestinaltrakt

1.1.2.1 Aufbau

Der GIT besteht aus Speiseröhre, Magen, Dünndarm und Dickdarm und hat die Verdauung und Absorption von zugeführter Nahrung als Hauptaufgabe [25]. Nachdem die Nahrungsbestandteile im Magen enzymatisch gespalten und homogenisiert wurden, wandert der Speisebrei in den Dünndarm.

Der Dünndarm wird in drei Abschnitte gegliedert: das *Duodenum* (Zwölffingerdarm), das *Jejunum* (Leerdarm) und das *Ileum* (Krummdarm) [26].

Im Dünndarm erfolgt durch die Motilität die Durchmischung aber auch die Absorption der Nahrung. Die Darmschleimhaut (*Mukosa*) ist speziell für eine effiziente Nährstoffaufnahme aufgebaut. Durch die Bildung von Schleimhautfalten, den sogenannten *Kerckringschen* Falten erfolgt eine Oberflächenvergrößerung. Auf diesen Falten befinden sich Zotten, die aus einschichtigen intestinalen Epithelzellen (IEC: *intestinal epithelial cells*) bestehen, und die zweite Stufe der Oberflächenvergrößerung darstellen. Die intestinale Epithelschicht besteht aus Enterozyten, Gobletzellen, Paneth-Zellen und enterochromaffine Zellen. Am Kryptengrund sind sowohl Paneth-Zellen als auch Stammzellen lokalisiert. Die pluripotenten Stammzellen dienen der ständigen Neubildung und dem Erhalt der

4 Einleitung

intestinalen Epithelschicht [26]. Paneth-Zellen sezernieren Lysozyme und Peptidasen zur Immunabwehr [27]. Becherzellen sezernieren Muzin, ein Glykoprotein zur Bildung der physikalischen Schutzbarriere zwischen Darmepithel und Darmflora [28]. Enterozyten besitzen zur besseren Resorption von Nährstoffen auf ihrer luminalen Seite Mikrovilli, die ebenfalls der Oberflächenvergrößerung dienen. Enterochromaffine Zellen sezernieren den Neurotransmitter Serotonin [28]. Unterhalb des Epithels befindet sich ein dichtes Netz von Kapillaren zur Durchblutung und der Aufnahme der absorbierten Stoffe. Im Zentrum der Zotten sind Lymphgefäße lokalisiert. Charakteristisch für das *Duodenum* sind die Brunner-Drüsen zur Produktion eines muzin- und bikarbonatreichen Sekrets. Das *Ileum* unterscheidet sich durch eine höhere Anzahl von Becherzellen und eine geringere Dichte an Zotten. Zusätzlich befindet sich in den Falten lymphatisches Gewebe, die sogenannten Peyerschen Plaques, die einen Teil des darm-assoziierten lymphatischen Gewebes (*gut-associated lymphatic tissue (GALT)* oder *mucosa-associated lymphatic tissue (MALT)*) darstellen. Darauf befinden sich die sogenannten M-Zellen (*microfold*), die einen Kontakt zwischen IECs und der Bindegewebsschicht (*Lamina propria mucosae*) herstellen. Diese Schicht beinhaltet Immunzellen, wie Makrophagen, B- und T-Lymphozyten, Granulozyten und dendritische Zellen [26].

Darunter liegt die Muskelschicht (*Lamina muscularis mucosae*).

Der Dickdarm wird ebenfalls in drei Abschnitte gegliedert: *Caecum* (Blinddarm) und der *Appendix vermiformis* (Wurmfortsatz), *Kolon* (Grimmdarm) und das *Rektum* (Mastdarm).

Im Dickdarm werden aus dem Speisebrei Elektrolyte und Wasser resorbiert, wodurch der Brei dicker wird. Die Schichten sind wie im Dünndarm aufgebaut, allerdings weist die Schleimhaut des Dickdarms keine Zotten auf. Außerdem sind die Krypten tiefer und dichter als im Dünndarm [26].

Auf der Oberfläche der Muzinschicht des Dickdarmes ist eine Vielfalt von 300-500 verschiedenen Arten von Bakterien angesiedelt [29]. Es befinden sich zehn mal mehr Bakterienzellen (10^{14}) auf der Oberfläche des Darmes als eukaryotische Zellen (10^{13}) im gesamten Organismus [30]. Den Hauptanteil an der Zusammensetzung der Bakterienflora machen obligat anaerobe Bakterien aus. Dazu zählen beispielsweise

Bacteroides, Bifidobakterien, Eubakterien und Clostridien [31]. Fakultativ anaerobe Bakterien, wie *Escherichia coli*, Enterokokken, *Klebsellia* und Lactobakterien sind nur zu einem geringen Teil vertreten. Die Bakterien spalten unverdauliche Bestandteile der Nahrung, wie Zellulose, wodurch kurzkettige Fettsäuren gebildet werden. Als Hauptprodukt der Fermentation dienen sie anschließend der Energiegewinnung [32]. Weitere Abbauprodukte sind Ammoniak, Methan, Wasserstoff, Phenole und Vitamin K [33, 34].

Eine weitere Funktion des Mikrobioms ist der Schutz vor invasiven pathogenen Bakterien. Studien mit keimfreien Mäusen zeigten eine höhere Anfälligkeit für Infektionen [35].

Der Erfolg der Koexistenz zwischen Wirt und Darmflora ist von einer intakten Schutzbarriere durch das intestinale Epithel, einer effektiven Immunantwort auf invasive Bakterien, einer kontrollierten Immunreaktion gegen kommensale Bakterien und der Zusammensetzung der Darmflora, dem sogenannten Mikrobiom, abhängig [36].

1.1.2.2 Barrierefunktion und intestinales Immunsystem

Der erste Schutzmechanismus des GIT ist die Magensäure mit einem pH von 2 [37]. Diese saure Flüssigkeit führt zur Denaturierung pathogener Proteine und zur Zerstörung der Membranen von Pathogenen. Einen weiteren Schutzmechanismus stellt die Sekretion von Defensinen, Lysozymen und Cathelicidinen dar. Defensine und Lysozyme sind antimikrobiell wirksame Peptide, die von den Paneth-Zellen sezerniert werden [27]. Sie dienen der Abwehr von grampositiven und -negativen Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten [38-40]. ist ebenfalls ein antimikrobiell wirkendes Peptid [41]. Es kann Lipopolysaccharide gram-negativer Bakterien binden und neutralisieren [42]. Durch Chemotaxis kann es Monozyten, Neutrophile und T-Lymphozyten anlocken, die anschließend das Antigen abwehren [43, 44].

Becherzellen sezernieren Muzin, ein Glykoprotein zur Bildung der physikalischen Schutzbarriere zwischen Darmepithel und -flora [28]. Diese sogenannte Mukusschicht stellt zwischen kommensalen Bakterien und IECs eine Barriere dar, so dass es zu keiner Invasion und der Aktivierung des intestinalen Immunsystems kommt.

6 Einleitung

Des Weiteren besitzen IECs auf ihrer Oberfläche *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) und intrazellulär *NOD-like* Rezeptoren (NLR) zur Erkennung von bakteriellen und viralen Bestandteilen. [Quelle]. TLR und NLR gehören zu den Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptor* (PRR)). Diese können Strukturen erkennen, die für Krankheitserreger charakteristisch sind [45]. Diese Merkmale werden unter dem Begriff pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns* (PAMP)) zusammengefasst [46].

Die Lamina propria dient ebenfalls der Immunabwehr. In ihr befinden sich diffus verteilt oder als eine organisierte Einheit in den Peyerschen Plaques die Zellen des adaptiven Immunsystems [26]. M-Zellen transportieren Antigene in die Bindegewebsschicht, um sie für die Immunzellen zugänglich zu machen [47]. Immunzellen, wie B- und T-Zellen, Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen und Plasmazellen können anschließend ihre Funktionen ausführen. Einen weiteren Schutzfaktor bietet das Immunglobulin A (IgA), das aus aktivierten B-Plasmazellen sezerniert wird [48]. IgA wird in das Darmlumen sezerniert und kann dort Antigene neutralisieren und opsonieren.

Ist die Barrierefunktion des Mukus gestört, wird das Eindringen von Bakterien oder bakterieller Bestandteile begünstigt. Diese Antigene werden anschließend von Lamina propria residenten Immunzellen erkannt und das adaptive Immunsystem wird aktiviert. Durch die Aktivierung verschiedener Immunzellen kommt es zu einer erhöhten Zytokinausschüttung [49]. Diese unterscheidet sich zwischen MC und UC. Bei Patienten mit MC finden sich vermehrt Zytokine der T-Helfer-Zelle Th1/17-vermittelten Immunreaktion, während UC Patienten eine Th2-gerichtete Immunantwort aufweisen [50-52]. Zytokine aktivieren naive T-Zellen. Je nachdem, welches Zytokin ausgeschüttet wird, differenzieren sich die naiven T-Zellen zu Th1-, Th2, Th17- oder T-regulatorische-Zellen [53]. Ausdifferenzierte T-Zellen sind in der Lage, weitere Zytokine zu sezernieren. Th1-Zellen schütten vermehrt proinflammatorische Zytokine, wie Interferon- γ (IFN- γ), IL-6 oder Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) aus. Th2-Zellen sezernieren die IL-4, -5, -9 und -13. Th-17 Zellen sondern IL-17, -21, -22, -26 und den TNF- α ab [53]. Die T-regulatorischen Zellen sezernieren antiinflammatorische Zytokine und unterdrücken die Aktivierung des Immunsystems [54]. Ein großer Teil dieser Zytokine aktiviert Signalwege, die zur Ausschüttung weiterer Botenstoffe führen.

Außerdem wird der JAK/STAT-Signalweg durch die Zytokine IL-6, -22 und viele andere aktiviert [55].

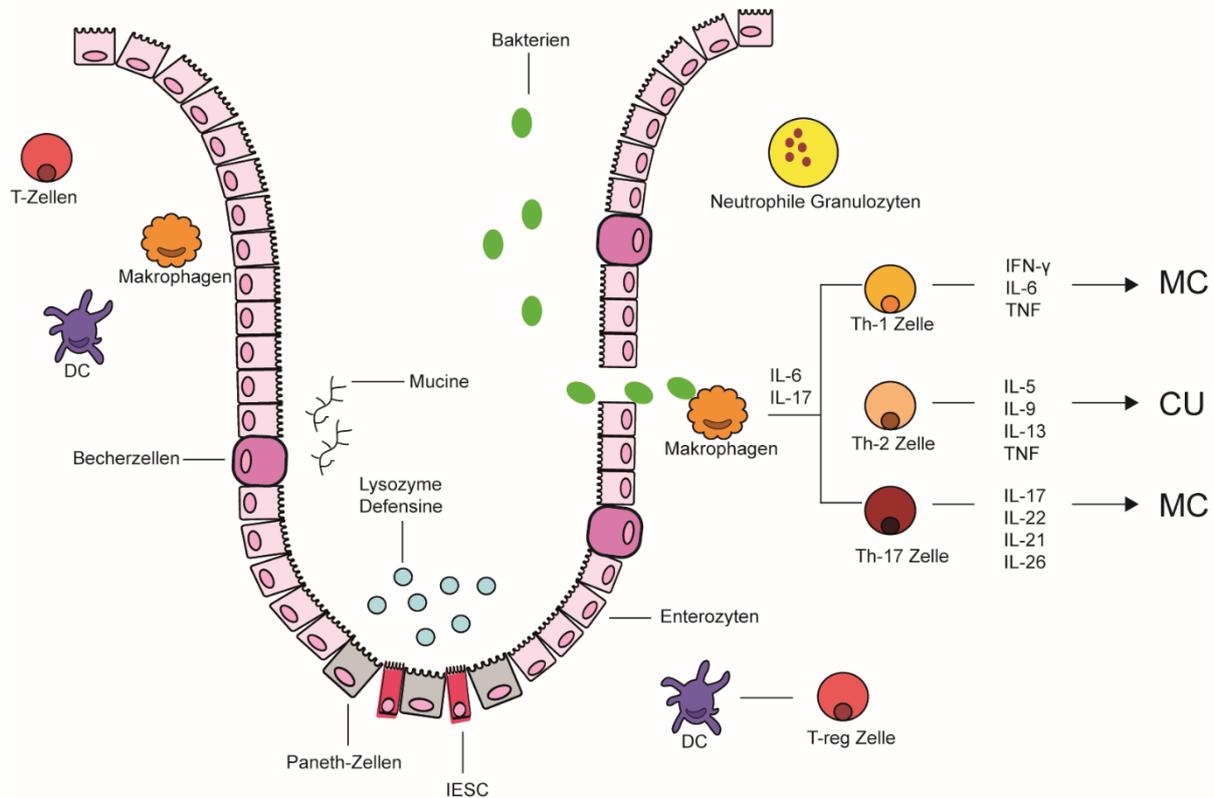


Abbildung 1-1: Aktivierung des intestinalen Immunsystems nach Störung der Barrierefunktion und Invasion von Bakterien (angelehnt an [56]).

Nach Invasion der Bakterien sezernieren Makrophagen Zytokine zur Aktivierung naiver T-Zellen, die sich in der *Lamina propria* befinden. Naive T-Zellen differenzieren anschließend zu T-Helfer 1, 2 oder 17 Zelle und schütten Zytokine zur Aktivierung weiterer Zellen aus. Th1 und Th17-Zellen sind vorwiegend in Patienten mit MC vorhanden, während Th2-Zellen hauptsächlich bei CU Patienten vorzufinden sind. IL: Interleukin, TNF: Tumornekrosefaktor, IFN: Interferon, IESC: *intestinal epithelial stem cells*, DC: dendritische Zellen, MC: Morbus Crohn, CU: Colitis ulcerosa

1.1.3 Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es noch keine Heilung für CED. Die Therapie von CED richtet sich nach der Schwere und dem Ausmaß der Entzündung. Dabei sind die Leitlinien für die Behandlung von MC und CU ähnlich [57]. Arzneistoffe, die dabei zum Einsatz kommen, sind in Tabelle 1-2 aufgelistet [58].

Arzneistoffgruppe der ersten Wahl bei CU Patienten mit leichten bis mittelschweren akuten Schüben sind die Aminosalicylate. Dazu gehören 5-Aminosalicylsäure (Mesalazin), Olsalazin und Sulfasalazin. Die wirksame Komponente ist das Mesalazin, die beiden anderen Verbindungen sind Prodrugs des Mesalazins. Der Einsatz verschiedener galenischer Formulierungen ist abhängig von der Lokalisation der

8 Einleitung

Entzündung. Bei einem Befall des Rektums werden Suppositorien eingesetzt. Ist gleichzeitig der Mastdarm entzündet, können Rektalklysmen- und Schäume angewendet werden. Der Wirkmechanismus der 5-Aminosalicylsäure beinhaltet mehrere Angriffsziele. Der wichtigste ist die Bindung an den Peroxisomen-Proliferator-Rezeptor des γ Subtyps (PPAR γ) [59, 60]. Dieser Rezeptor findet sich vermehrt in den Epithelzellen des Kolons. Nach Aktivierung transloziert dieser Rezeptor in den Zellkern und induziert die Transkription regulatorischer Gene, die den NF κ B-Signalweg inhibieren. Dadurch wird die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL1- β , IL-6 und IL-8, verhindert [61]. Durch die Hemmung der Differenzierung von naiven Th- Zellen wird die Ausschüttung von TNF- α und weiterer Zytokine gehemmt und eine inflammatorische Immunantwort herunterreguliert. Des Weiteren hemmt 5-Aminosalicylsäure die 5-Lipoxygenase, die die Synthese der Leukotriene aus der Arachidonsäuren katalysiert [62]. Leukotriene stammen aus den Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen. Nach Ausschüttung können sie chemotaktisch auf Leukozyten wirken und sie somit zur Immunantwort anregen. Außerdem kann durch Rekrutierung anderer Immunzellen eine Entzündungsreaktion begünstigt werden [26].

Bei einem schweren akuten Schub sind die Glucocorticoide den 5-Aminosalicylaten vorzuziehen. Dabei werden Glucocorticoide oral gegeben und Salicylate können in Kombination lokal verabreicht werden. Verschlimmert sich der Schub durch blutigen Stuhl und Fieber, können Glucocorticoide auch parenteral verabreicht werden [57]. Glucocorticoide sind wirksame antiinflammatorische Arzneistoffe. Sie binden an den Glucocorticoidrezeptor, welcher im Zytoplasma gelöst vorliegt. Dieser Arzneistoff-Rezeptorkomplex transloziert anschließend in den Zellkern und führt zur Suppression von Genen wie NF κ B, Interleukinen und ihren Rezeptoren, was zur Linderung einer Entzündung führt. Weiterhin aktiviert es die Expression von Genen, wie Lipocortin, welches antiphlogistisch wirkt [63, 64]. Eine dauerhafte Therapie mit Glucocorticoiden soll aufgrund der systemischen Nebenwirkungen von Budesonid und Prednisolon vermieden werden. Nach Abklingen des Schubes sollte mit Salicylaten behandelt werden [65].

Wenn sich der Zustand trotz Glucocorticoid-Therapie nicht ändert, spricht man von einer steroidresistenten Colitis [57]. Erst dann kommen Immunsuppressiva zum

Einsatz. Azathioprin ist ein Prodrug des 6-Mercaptopurin. Beide hemmen die Purinbasen- und DNA-Synthese, indem sie als Baustein in die Polymerkette der DNA eingebaut werden [63]. Da keine 2-Desoxyribose an diese Moleküle gebunden ist, kann die Polymerkette nicht mehr wachsen. Dies ist besonders relevant für die Proliferation von T- und B-Lymphozyten, wodurch die Zell- und Zytokin-vermittelte Aktivierung des Immunsystems verhindert wird [66].

Methotrexat hemmt die Dihydrofolat-Reduktase, die die Dihydrofolsäure zur Tetrahydrofolsäure hydriert. Diese ist ein Baustein in der Biosynthese von Thymidin- und Purinbasen [67]. Dadurch wird die Proliferation von Immunzellen gehemmt.

Ciclosporin und Tacrolimus binden an Immunophiline. Ciclosporin bindet das Cyclophilin und Tacrolimus das FKBP 12 (*FK506 binding protein*) [68, 69]. Als Komplex hemmen sie das Calcineurin, das ungehemmt das NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) dephosphoryliert. Dieses kann in den Zellkern translozieren, an die DNA binden und zur Bildung proinflammatorischer Zytokine, wie IFN- γ und IL-3, führen. Wird das Calcineurin durch den Komplex Immunsuppressivum und Immunophilin gehemmt, bleibt NFAT phosphoryliert und die Aktivierung des Immunsystems wird unterdrückt [68, 69].

Bleibt die Therapie mit Glucocorticoiden und Immunsuppressiva wirkungslos, können TNF- α -Inhibitoren eingesetzt werden [57]. Die monoklonalen Antikörper wurden entwickelt, weil TNF- α vermehrt in den entzündlichen Bereichen von CED-Patienten vorhanden ist [70, 71]. TNF- α , ein proinflammatorisches Zytokin, bindet an TNF- α -Rezeptoren und führt zur Aktivierung von B- und T-Zellen, Makrophagen und Monozyten und dadurch zur Ausschüttung von Zytokinen. Es rekrutiert neutrophile Granulozyten zum Ort der Entzündung und induziert Fieber [72]. Die therapeutisch angewendeten Antikörper binden TNF- α stabil. Dieser Komplex kann dann von zytotoxischen Zellen oder Makrophagen neutralisiert werden [72]. Bei längerer Anwendung kann es zur Antikörperbildung gegen die TNF- α -Inhibitoren kommen, wodurch die Dosis erhöht oder eine Alternative, wie der Integrinantagonist Vedolizumab, angewendet werden muss [73].

10 Einleitung

Integrine sind Transmembranproteine, die sich in der Zellmembran aller Zellen außer Erythrozyten befinden [74]. Sie ermöglichen eine lockere Bindung der Zelle an die extrazelluläre Matrix. In Blutzellen fungieren sie als Zell/Zell-Adhäsionsmoleküle. Diese Funktion ist relevant für die Entwicklung von Vedolizumab. In der Zellmembran von Leukozyten sorgen die Integrine für die Bindung an Endothelzellen und anschließend zu einem parazellulären Transport dieser Leukozyten. Diese können dann zur Bildung von Zytokinen und der Entwicklung oder Verschlimmerung einer Entzündung führen [74]. Vedolizumab bindet an die Integrine der Leukozyten und verhindert somit das Einwandern ins Gewebe [75].

Lassen die Krankheitssymptome nach, werden 5-Aminosalicylate zum Remissionserhalt angewendet [57]. Führen die einzelnen Therapien zu keiner Besserung, können operative Schritte eingeleitet werden [57].

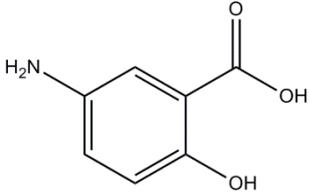
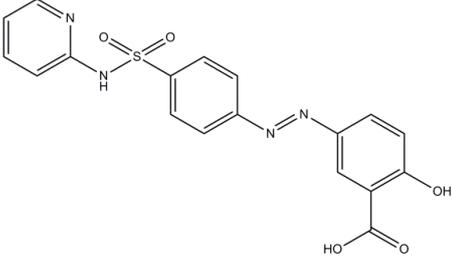
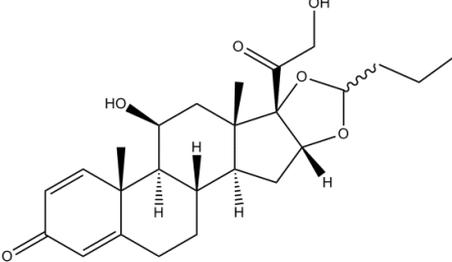
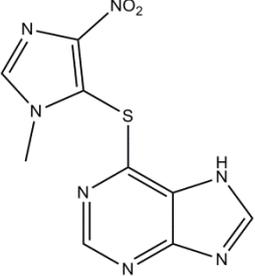
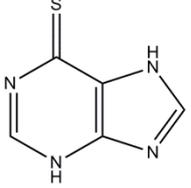
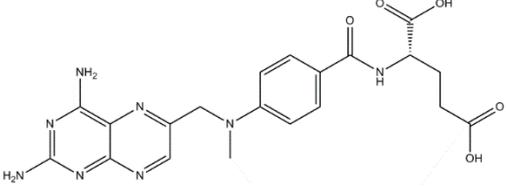
Bei leichten bis mittelschweren Schüben bei MC Patienten wird oral mit Glucocorticoiden behandelt. Falls das Kolon ebenfalls befallen ist, können zusätzlich Salicylate topisch angewendet werden [57].

Schwere Schübe bei MC werden ebenfalls mit systemischer Glucocorticoidgabe behandelt. Erst wenn der Patient nicht auf die Therapie anspricht, werden Immunsuppressiva, TNF- α -Antikörper oder der Integrinantagonist gegeben [76].

Zur Erhaltung der Remission wird Azathioprin angewandt. Wirkt dieses nur unzureichend oder treten Unverträglichkeiten auf, wird Infliximab angewendet [57].

Bleibt die Remission stabil und es ist keine Entzündung nachweisbar, kann die remissionserhaltende Therapie abgesetzt werden [57].

Tabelle 1-1: Darstellung der jetzigen Therapien von CED

Arzneistoffgruppe	Substanz	Strukturformel
5-Aminosalicylate	5-Aminosalicylsäure (Mesalazin)	
	Olsalazin	
	Sulfasalazin	
Glucocorticoide	Budesonid	
	Prednisolon	
Immunsuppressiva	Azathioprin	
	6-Mercaptopurin	
Immunsuppressiva	Methotrexat	

12 Einleitung

Arzneistoffgruppe	Substanz	Strukturformel
Immunsuppressiva	Ciclosporin	
	Tacrolimus	
TNF- α -Inhibitoren	Infliximab	monoklonaler Antikörper
	Adalimumab	monoklonaler Antikörper
	Golimumab	monoklonaler Antikörper
Integrinantagonisten	Vedolizumab	monoklonaler Antikörper

1.2 Der Janus-Kinase- *Signal Transducers and Activators of Transcription*-Signalweg

Entdeckt wurde der Signalweg durch James E. Darnell, Jr. während seiner Arbeit am IFN- γ –induzierten Signalweg im Jahre 1982 [77]. In Säugetieren wurden bisher vier Janus Kinase (JAK)-Proteine (JAK1, 2, 3 und Tyk2) und sieben *signal transducers and activators of transcription* (STAT)-Proteine (STAT 1, 2, 3, 4, 5A, 5B, 6) identifiziert [78-80]. Jedoch besitzen auch andere Modellorganismen, wie *Drosophila melanogaster* (Taufliege), *Xenopus laevis* (glatter Krallenfrosch), *Caenorhabditis elegans* (Fadenwurm) und *Danio rerio* (Zebrafisch) JAK-Proteine [81].

1.2.1 Janus Kinasen

Die Janus Kinasen (JAK) gehören zu den intrazellulären Nicht-Rezeptor Tyrosin Kinasen und sind an Zytokinrezeptoren (Abbildung 1-4:) kovalent gebunden [82]. Im Gegensatz zu Rezeptortyrosinkinase besitzen die Rezeptoren des JAK/STAT-Signalweges keine eigene Tyrosinkinaseaktivität und sind demnach auf die katalytische Aktivität der JAKs angewiesen.

Während JAK1 und 2 ubiquitär verteilt sind, werden JAK3-Proteine nur von hämatopoetischen Zellen, wie natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und T-Lymphozyten synthetisiert [83-85]. JAKs sind aus über 1000 Aminosäuren bestehende Proteine. Die Struktur der Proteine wurde aufgrund von Homologien in der Aminosäuresequenz in sieben JAK-Homologe Regionen (JH1-7) eingeteilt (Abbildung 1-2). Am N-Terminus befinden sich fünf konservierte Bereiche (JH 7-3). Diese Bereiche sind für die kovalente Bindung der JAKs an die Rezeptoren notwendig [86, 87]. Am C-Terminus der Polypeptidkette ist die Kinase-Domäne JH1 lokalisiert, die eine enzymatische Aktivität aufweist [82]. N-Terminal davon befindet sich die pseudo-Kinase Domäne (JH2). Studien an der *D. melanogaster*, aber auch Studien an Fibroblasten-Zelllinien, in denen die JH2-Domäne deletiert wurden, zeigten, dass diese Domäne eine regulatorische Funktion auf die Aktivität der einzelnen JAK-Proteine ausübt [88, 89]. Fehlt diese Domäne kommt es zu einer erhöhten Kinase-Aktivität und verstärkten Phosphorylierung der STAT-Proteine [89].

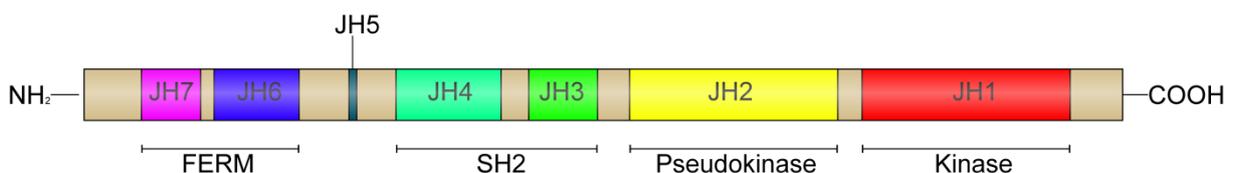


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des Aufbaus der JAK-Domänen (angelehnt an [90])

JAK-Proteine besitzen 7 JAK-homologe Regionen (JH1-JH7) und vier funktionelle Domänen FERM (Band 4.1 ezrin, radixin, moesin), SH2 (*Src-homology 2*), die Pseudokinase und die Kinase.

Die Aktivierung des Signalweges erfolgt durch die Bindung eines Zytokins (Abbildung 1-4) an einen Zytokinrezeptor, was die Dimerisierung des Rezeptors zur Folge hat. Die JAKs sind am intrazellulären Teil des Rezeptors homo- oder heteromer verteilt und aktivieren sich selbst aufgrund der entstehenden räumlichen Nähe und/oder der Konformationsänderung des Rezeptors. Dabei wird die Phosphatgruppe des

14 Einleitung

Adenosintriphosphat (ATP) auf die Hydroxylgruppe des Tyrosins, welches sich in der Kinase-Domäne befindet, übertragen [91]. Es kommt ebenfalls zur Phosphorylierung des Rezeptors am Tyrosinrest. Dies führt zur Rekrutierung und Bindung von Homo- oder Heterodimeren von STAT-Proteinen über deren SH-2 Domänen. Die Bindung an den Rezeptor oder die Dimerisierung hängt von dem Status des STAT-Monomers ab. Unphosphorylierte STAT-Proteine zeigen eine höhere Affinität zum Rezeptor, während phosphorylierte Monomere verstärkt eine Dimerisierung eingehen [92]. Die Dimere translozieren schließlich in den Zellkern, binden spezifische DNA-Erkennungssequenzen und initiieren die Transkription STAT-abhängiger Gene [93, 94].

1.2.2 STAT-Proteine

STAT-Proteine fungieren als Transkriptionsfaktoren und befinden sich anders als die rezeptorgebundenen JAKs frei im Zytoplasma [95]. Am N-Terminus befindet sich die „coiled-coiled“ domain (CCD) mit zahlreichen hydrophilen Aminosäuren, die durch Wasserstoffbrückenbindungen Interaktionen mit anderen Proteinen ausbilden (Abbildung 1-3) [96]. Über die DNA-Bindedomäne (DBD: *DNA binding domain*) erfolgt die Bindung der STATs an die DNA mit einer bestimmten Abfolge von Nukleotidbasenpaaren, die von dieser Domäne erkannt wird. Das GAS (*gamma interferon activating sites*) Motiv wurde für die STAT-Proteine als eine solche Abfolge identifiziert [97]. Die Bindung aktiviert nachgeschaltete Gene. Die darauffolgende SH2-Domäne ermöglicht die Dimerisierung der STAT-Proteine, die Bindung des STAT-Monomers an den Rezeptor und die Assoziation mit den JAKs [98]. Am C-terminalen Ende befindet sich die Transaktivierungsdomäne (TAD) [99]. Sie ist verantwortlich für die Transkription der Zielgene.

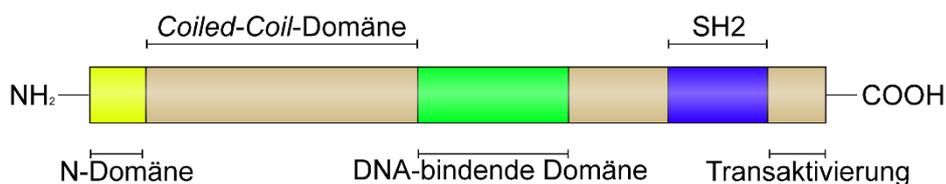


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung des Aufbaus der STAT-Domänen (angelehnt an [100])

Alle sieben STAT-Proteine besitzen fünf konservierte Domänen. Zur Dimerisierung wird die SH2-Domäne phosphoryliert, wodurch ein weiteres STAT-Protein binden kann. SH2 (*Src-homology 2*).

1.2.3 Biologische Funktion der JAKs und STATs

Die Funktionen der Proteine im JAK/STAT-Signalweg wurden durch spezifische Deletion der jeweiligen Gene in Modellorganismen oder durch krankheitsassoziierte Mutationen im Menschen charakterisiert.

1.2.3.1 JAK-abhängige Funktionen

JAK1 *knock-out* (KO) Mäuse zeigen eine perinatale Lethalität. Phänotypisch zeigen *Jak1^{-/-}* Mäuse keine Veränderungen. Es konnten weder in Herz, Niere, Leber und Gehirn, noch in der Anzahl der Blut- und Immunzellen Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden. Jedoch führt die Deletion zu einer gestörten Bildung der Thymozyten, den Vorläuferzellen der T-Lymphozyten. Die Tiere weisen einen verkleinerten Thymus und eine reduzierte Anzahl von Thymozyten auf. Als Ursache hierfür gilt die Beteiligung von JAK1 an Signalwegen, die zur Reifung von T-Lymphozyten zählen [101].

JAK1 spielt im Signalweg vieler Zytokine eine wichtige Rolle [90]. Es ist zusammen mit JAK3 mit der Untereinheit des IL-2-Rezeptors assoziiert und wird durch Zytokine der IL2-R-Familie aktiviert [102]. Nach Aktivierung der JAKs führen diese hauptsächlich zur Rekrutierung von STAT5-Proteinen, wobei manche Mitglieder der Familie, wie IL-4 oder IL-13 auch STAT1, 3 und 6 aktivieren können [102, 103]. Diese Familie ist vor allem am Wachstum und der Reifung von T-Lymphozyten und NK-Zellen beteiligt [104-106]. JAK1 kann aber auch mit JAK2 und Tyk2 assoziiert sein. Diese Kombination findet man an Rezeptoren der IL6-Familie [107]. Ihr gemeinsames Merkmal ist die Untereinheit gp130 (Glykoprotein 130) [93]. Die Zytokine dieser Familie aktivieren STAT1, 3 und 5 und zu einer anschließenden Differenzierung naiver T-Zellen zu Th17 und T-zytotoxischer Zellen, wobei die Differenzierung T-regulativer Zellen gehemmt wird [107]. Zusätzlich wird die Bildung von Antikörpern durch B-Zellen erhöht und die Akute-Phase-Reaktion aktiviert [108]. Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis, CED und Krebs, entstehen durch eine unkontrollierte Immunantwort und weisen einen hohen IL-6-Spiegel an auf [109-111]. Des Weiteren zeigen *in vitro* Studien mit aus JAK1-defizienten Mäusen isolierte Makrophagen, dass eine Deletion des Proteins zwar zu einer geringeren Signalübertragung führt, jedoch keine komplette Einschränkung nachweisbar war [101]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die beiden anderen JAKs das Fehlen von JAK1 kompensieren. Jedoch ist die

16 Einleitung

Signalkaskade, die durch IFN aktiviert wird, von der Deletion betroffen: *JAK1*^{-/-} Zellen zeigen keine Aktivierung des Signalweges nach Stimulation mit IFN- α / β und - γ [112]. IFN- α und - β gehören zu den Typ I IFN und aktivieren den gleichen Rezeptor [113]. Die Aktivierung führt zur Dimerisierung von STAT1 und STAT2 [95]. Sie werden von virusinfizierten Leukozyten und Fibroblasten gebildet und sind vor allem für die virale Immunabwehr notwendig [114]. Während IFN- γ an einen anderen Rezeptor bindet und nur von NK-Zellen und T-Lymphozyten gebildet wird [115]. Dieser Signalweg ist für die bakterielle Immunabwehr von Bedeutung; er reguliert die Bildung von MHC I und II (*major histo compatibility complex*: Haupthistokompatibilitätskomplex), die Proliferation und die Apoptose von Zellen [116, 117]. Die Aktivierung der JAKs durch IFN- γ sorgt für die Dimerisierung von STAT1-Proteinen [95].

Jak2^{-/-} Mäuse weisen einen embryonal letalen Phänotyp auf. Neben einer verkleinerten Leber haben die Embryos eine reduzierte Erythrozytenzahl und eine verringerte Anzahl zellkernhaltiger Zellen [118]. Die Embryos erscheinen weiß, dieser Phänotyp lässt sich dadurch erklären, dass nur JAK2 mit dem Rezeptor des Erythropoetins assoziiert ist [90]. Weitere Zytokinrezeptoren, die nur mit JAK2 kovalent gebunden sind, sind Rezeptoren der IL-3R-Familie, der Rezeptor für den Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender-Faktor (GM-CSF) und Thrombopoetin [90, 119]. In manchen Patienten mit myeloproliferativen Neoplasien, wie Polycythaemia vera, essentieller Thrombocythämie und primärer Myelofibrose, wurde eine Punktmutation im Exon 14 von JAK2 gefunden. Bei dieser Mutation ist ein Guanin gegen ein Thymin ausgetauscht, was zur Translation von Phenylalanin statt Valin führen kann [120]. Dadurch ist die Aktivität der Kinase erhöht und der JAK/STAT-Signalweg aktiviert [121]. Es kommt zu einer übermäßigen Bildung an Erythrozyten und Thrombozyten [122]. *In vitro* Studien zeigten, dass JAK2 bedeutend für die Aktivierung des Signalweges durch IFN- γ , aber nicht durch IFN- α / β , ist [120].

Jak3-defiziente Mäuse zeigen keinen letalen Phänotyp. Jedoch weisen diese Mäuse Defekte in der Entwicklung und Bildung von Lymphozyten auf. Die Größe der lymphatischen Organe Thymus und Milz ist im Vergleich zum Wildtyp geringer [123]. *Jak3*^{-/-} Mäuse entwickeln einen SCID (*severe combined immunodeficiency*) Phänotyp [123]. Dieser humane Immundefekt wird durch Mutationen in der γ -Untereinheit, des Rezeptors der IL-2R-Familie, Mutationen im *JAK3*-Gen, durch eine komplette Deletion

von *JAK3* oder einen Mangel an der Aminodesaminase hervorgerufen [124]. Es entstehen dadurch Defekte in der Entwicklung und Reifung der T-Zellen und der NK-Zellen. Die häufigste Form ist die X-chromosomal vererbte T-B⁺-Variante. Hier sind zusätzlich die B-Zellen betroffen [125]. Dieser Defekt begünstigt das Auftreten von opportunistischen Infektionen [126]. *In vitro* Studien mit T-Lymphozyten der *Jak3*^{-/-}-Mäuse zeigten, dass die Signaltransduktion durch die IL-2R-Familie bei einer JAK3-Defizienz nicht funktioniert [123]. Weiterhin zeigten *Jak3*-defiziente Mäuse einen schlechteren Verlauf der Entzündung als die Wildtypen in einer akuten DSS-induzierten Kolitis (DSS:*dextran sulfate sodium*) [127]. Neben einer stärkeren Gewichtsabnahme wiesen *Jak3*^{-/-} Mäuse ein verkürztes Kolon und eine zerstörte Epithelschicht auf. Sie zeigten ein stärkeres Ansprechen auf die Entzündung. Es wurde gezeigt, dass JAK3, aktiviert durch IL-2, eine wichtige Rolle in der Differenzierung der IECs und der Wundheilung spielt [128].

Tyk2^{-/-} Mäuse weisen keinen letalen Phänotyp auf [129]. Des Weiteren zeigten *in vitro* Experimente mit embryonalen Fibroblasten, Makrophagen und Splenozyten, isoliert aus *Tyk2*-defizienten Mäusen, dass *Tyk2* für die Signaltransduktion durch IFN- α und IL-12 relevant ist [129, 130]. Die Aktivierung anderer Rezeptoren, die mit *Tyk2* und einem anderen JAK assoziiert sind, wird jedoch nicht durch eine Deletion beeinflusst [131].

1.2.3.2 STAT-abhängige Funktionen

Stat1^{-/-} Mäuse besitzen einen Defekt in der Antwort auf IFN- α / β und IFN- γ . Hierfür wurden T-Lymphozyten für 72 h mit IFN- α oder IFN- γ stimuliert. Eine Stimulation durch diese Botenstoffe führt zu einer verstärkten Expression von MHC I auf der Oberfläche der T-Zellen. Die T-Zellen *Stat1*-defizienter Mäuse zeigen keine Zunahme des Komplexes [132]. Signalwege anderer Rezeptorfamilien, wie IL-6R oder IL-2R, sind nicht von der Deletion betroffen [132]. Außerdem zeigen die Mäuse eine höhere Anfälligkeit für virale und bakterielle Infektionen [131]. STAT1 wurde auch eine Rolle in der Pathophysiologie von CED zugesprochen [133]. Biopsien von 14 Patienten mit MC und von 28 Patienten mit UC wurden auf die Expression und Aktivierung von STAT1 untersucht. Die Expression und Aktivität von STAT1 war in beiden Erkrankungen deutlich erhöht, jedoch mehr in UC Patienten. Des Weiteren ist STAT1 wichtig als Tumorsuppressor und für die Induktion von Apoptose [116]. *Stat1*^{-/-} oder

18 Einleitung

Ifn-γR-defiziente Mäuse entwickelten, spontan oder chemisch induziert, mehr Tumore als Wildtypen [134].

Stat2^{-/-} Mäuse besitzen einen Defekt in der Antwort auf IFN-α/-β. Sie zeigen eine höhere Anfälligkeit für virale Infektionen. [135].

STAT3-Defizienz ist embryonal letal. Zwischen Tag E5-E7 kommt es zum Stillstand der Embryogenese. STAT3 ist für die Ausbildung des viszeralen Endoderms, welches zum Beispiel für die Entwicklung des Magen-Darm-Traktes verantwortlich ist [136]. Des Weiteren zeigt STAT3 eine protektive Wirkung auf Zellen und hemmt die Apoptose [137]. Eine Überexpression von STAT3 führt zu einer verringerten Apoptoserate. *In vivo* wurde die Rolle von STAT3 als ein Onkogen beobachtet. Hierfür wurden STAT3 überexprimierende Zellen in Mäuse injiziert. An der Injektionsstelle entwickelten sich innerhalb von 2 bis 4 Wochen Tumore. STAT3 wird auch eine Rolle in der Pathogenese der CED zugesprochen [138]. In Biopsien von Patienten mit MC wurde eine höhere Expression und Aktivität des STAT3-Proteins in T-Zellen gefunden [139]. Zusätzlich wurde sowohl in UC als auch in MC Patienten eine erhöhte Aktivität von STAT3 in den Monozyten und Leukozyten der Lamina propria nachgewiesen [140]. Dabei ist die Rolle von STAT3 nicht komplett geklärt. Während es im adaptiven Immunsystem für eine Verstärkung der Entzündung sorgt, wirkt es im angeborenen antiinflammatorisch [141, 142]. In einem Mausmodell, in dem nur die T-Zellen eine Defizienz an STAT3 aufwiesen, konnte keine Verminderung in der Entwicklung der Lymphozyten beobachtet werden, aber eine verstärkte Proliferation der T-Zellen nach Stimulation mit IL-6, einem wichtigen Aktivator von STAT3 [143]. Eine erhöhte Anzahl an T-Zellen kann die Entwicklung von CED begünstigen und den Krankheitsverlauf verschlimmern [144, 145]. Konditionale *Stat3*^{-/-} Mäuse (MX+;STAT3^{fl/fl}), in der die Deletion nur in Makrophagen und den Epithelzellen des Kolons zu finden ist, zeigen eine spontane Entwicklung einer Kolitis [142]. Die Mäuse wiesen eine schnellere Entwicklung und Progression der Entzündung auf als die Kontrollgruppe und starben nach 2 bis 3 Wochen. Solch eine starke Entzündung konnte nicht in *LysMcre/Stat3*^{flox/flox} beobachtet werden, in denen das Gen nur in den Makrophagen und neutrophilen Granulozyten deletiert wurde [143]. STAT3 ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor vieler Zytokine, wie die der IL-6R-Familie, einige der IL-2R-Familie, der IL-10R-Familie und IFN-α/-β [146].

STAT4 ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor der IL-12 Signalkaskade. *Stat4*-defiziente Mäuse zeigen eine gestörte Signaltransduktion nach IL-12 Stimulation [147]. IL-12 ist für die Differenzierung naiver T-Helfer-Zellen (Th0) in Th1-Zellen, die Produktion von IFN- γ , die Zellproliferation und die Steigerung der Zytotoxizität von Natürlichen Killerzellen zuständig [148, 149]. Eine funktionierende Signalkaskade ist relevant, da sich sonst ein Ungleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Zellen ergibt [150].

STAT5 wurde zuerst in der Brustdrüse als *mammary gland factor* (MGF) identifiziert und ist Teil der Signalwege von IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-9, IL-15, GM-CSF, Erythropoietin, Thrombopoietin und Wachstumshormonen [151]. Es existieren die zwei Isoformen STAT5a und STAT5b, die zu ca. 96% in ihrer Aminosäuresequenz identisch sind [152]. STAT5a ist hauptsächlich für die Entwicklung der Brustdrüsen und die Milchproduktion verantwortlich, während STAT5b für den Sexualdimorphismus notwendig ist [153, 154]. STAT5 ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor im Signalweg von IL-2 [155]. Bei *Stat5*^{-/-} Mäusen ist somit die Entwicklung der T-Lymphozyten beeinflusst. Bei Patienten mit CED wurde eine verringerte Aktivität von STAT5b beobachtet [156]. Im Mausmodell mit Trinitrobenzolsulfonsäure zur Induktion einer Kolitis konnte gezeigt werden, dass *Stat5b*^{-/-} Mäuse eine höhere Anfälligkeit für eine Darmentzündung und eine verminderte Proliferation der IECs im Vergleich zu den Kontrolltieren aufweisen [157].

Stat6^{-/-} Mäuse weisen einen Defekt in der Signaltransduktion von IL-4 und IL-13 auf [158, 159]. Diese Interleukine zählen zur Familie der IL-2R und werden von Th2-Zellen sezerniert. Beide Interleukine erhöhen die Expression von MHCII auf antigenpräsentierenden Zellen. IL-4 spielt zusätzliche eine Rolle in der Entwicklung von Th2-Zellen und in der Proliferation von T- und B-Zellen [93, 160, 161]. Es induziert den Antikörperklassenwechsel zu IgE (Immunglobulin) [162, 163]. Des Weiteren bewiesen Studien an *Stat6*-defizienten Mäusen, dass *Stat6* in der Pathogenese von allergischen Atemwegserkrankungen eine wichtige Rolle einnimmt [164]. Die Mäuse erhielten eine nasale Applikation von Ovalalbumin. Wildtyp-Mäuse entwickelten daraufhin eine allergische Reaktion und der IgE-Spiegel war deutlich höher als bei *Stat6*^{-/-} Mäusen. Biopsien aus dem Darm von Patienten mit CED zeigten außerdem eine erhöhte Aktivierung des STAT6-Proteins [165].

20 Einleitung

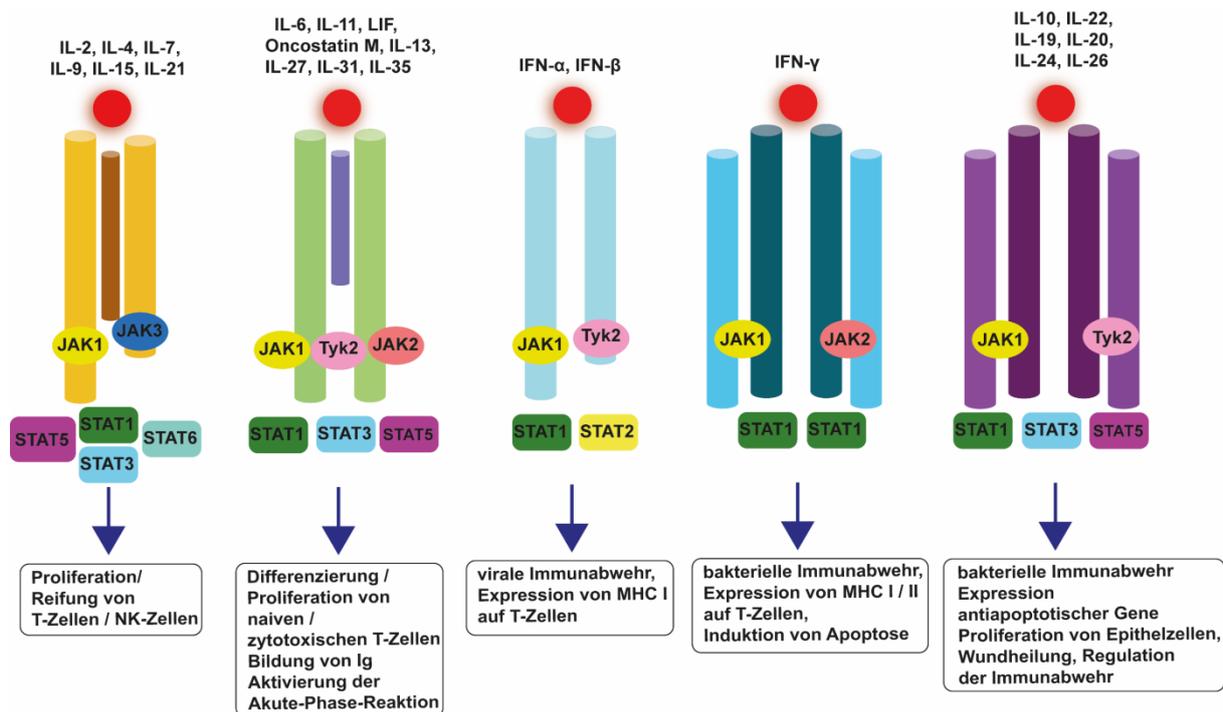


Abbildung 1-4: Darstellung der Zytokinrezeptoren mit den assoziierten JAKs und die zugehörigen STATs (angelehnt an [166])

Zusammenfassung der wichtigen Zytokinrezeptoren und der heterogenen Assoziation der JAK-Proteine. Nach Phosphorylierung des Rezeptors werden die jeweiligen STATs aktiviert und translozieren als Dimer in den Zellkern. Als Transkriptionsfaktoren initiieren sie die Transkription von Genen. Jeder einzelne Rezeptor weist eine eigene Funktion auf. JAK: Januskinase; STAT: signal transducer and activator of transcription; IL: Interleukin; IFN: Interferon; NK-Zellen: Natürliche Killerzellen; MHC: major histo compatibility complex.

1.2.4 Inhibition des JAK/STAT-Signalweges

Aufgrund der zunehmenden Bedeutung der Zytokine und ihrer Signalwege in der Pathogenese von CED, Psoriasis, rheumatoide Arthritis oder maligner Tumore, konzentrieren sich neue Therapien auf die Inhibition Zytokin-vermittelter Signaltransduktion oder Neutralisierung von Zytokinen durch monoklonale Antikörper [167, 168]. Ein Durchbruch in der Entwicklung neuer Inhibitoren war der erste Tyrosin-Kinase-Inhibitor Imatinib im Jahre 2001. Es wird vor allem zur Therapie der chronischen myeloischen Leukämie und gastrointestinaler Stromatumoren angewendet [169, 170]. Mittlerweile wurden 28 der sogenannten „small molecule kinase inhibitors“ von der *Food and Drug Administration* (FDA) in den USA zugelassen [171]. Darunter befinden sich auch die ersten JAK-Inhibitoren Ruxolitinib und Tofacitinib.

Ruxolitinib (Jakafi®), 2011 von der FDA zugelassen, wird bei myeloproliferativen Neoplasien, wie der primären Myelofibrose angewendet. Es hemmt sowohl JAK1 als auch JAK2 [172].

Tofacitinib wurde unter dem Handelsnamen Xeljanz® im November 2012 in den USA als erster oral verfügbarer JAK-Inhibitor zugelassen. Es ist als Filmtablette erhältlich und wird bei moderater bis schwerer rheumatoider Arthritis als Mono- oder Kombinationstherapie mit Methotrexat angewendet. Mittlerweile ist es auch in Japan, der Schweiz, Russland, Argentinien, Kuwait und den arabischen Emiraten erhältlich. Seit 2017 ist es auch in Europa zugänglich.

1.3 Arzneistoffprofil des Tofacitinibs

Nach der Zulassung zeigten Studien, dass Tofacitinib nicht nur in der rheumatoiden Arthritis, sondern auch bei der Behandlung von CU positiv auf den Krankheitsverlauf auswirkt [173, 174]. In einer placebokontrollierten Phase 3 Doppelblindstudie erhielten Patienten 10 mg Tofacitinib zweimal täglich acht Wochen lang. Es wurde eine Remission, eine Wundheilung des Darmepithels und ein klinisches Ansprechen auf die Therapie beobachtet. Eine Wirkung von Tofacitinib bei MC konnte bei einer randomisierten, placebokontrollierten Studie dagegen nicht gezeigt werden [175]. Tofacitinib konnte auch eine hohe Effektivität bei Psoriasis zeigen [176]. Studien an Patienten mit Psoriasis und zusätzlich einer Psoriasis-Arthritis wurden durchgeführt, jedoch ist das Ergebnis noch nicht veröffentlicht [177]. Studien an Patienten mit Alopecia universalis (Haarausfall), atopischen Ekzemen wurden ebenfalls durchgeführt [178-180]. Die orale Behandlung des Haarausfalles mittels Tofacitinib führte zu einem Wachstum des Haares sowohl im Kopf- als auch Gesichtsbereich [181]. Eine Milderung des atopischen Ekzems traf bei allen Studienteilnehmern ein.

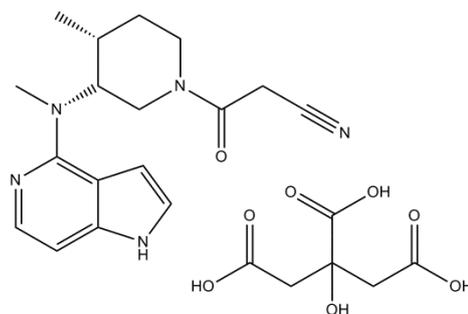


Abbildung 1-5: Strukturformel des Tofacitinibcitrat

Zur Erhöhung der Löslichkeit des lipophilen Tofacitinibs, liegt es als Citrat vor.

22 Einleitung

1.3.1 Pharmakodynamik

1.3.1.1 Wirkmechanismus

Tofacitinib ist ein kompetitiver Inhibitor und bindet in der ATP-Bindetasche der JAKs. In Untersuchungen mit über 300 Kinasen, zeigte Tofacitinib eine hohe Selektivität gegen JAKs [182]. Es inhibiert JAK3 mit einer Aktivität von $K_i = 0,2$ nM und ist somit selektiver. Es inhibiert jedoch auch JAK1 ($K_i = 0,7$ nM), JAK2 ($K_i = 1,0$ nM) und Tyk2 ($K_i = 4,4$ nM) [183]. Kristallisationsstudien mit Tofacitinib und den einzelnen Kinasen konnten zeigen, dass das Pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-Grundgerüst essentiell für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit der Hinge-Region der Kinase ist [184]. Eine Veränderung des Grundgerüsts führt zum Verlust der Bindung. Das N-19 des Grundgerüsts bildet Wasserstoffbrückenbindungen mit einem Wassermolekül aus, das in der Kristallstruktur konserviert ist. Das Piperidin ragt in die hydrophobe Tasche des Proteins und bildet hydrophobe Wechselwirkungen aus. Vermutlich ist die hydrophobe Tasche für die Selektivität von Tofacitinib gegen JAKs verantwortlich. Die Nitril-Gruppe bildet im glycinreichen P-Loop polare Wechselwirkungen [182]. JAKs werden am Tyrosin (Tyr) an verschiedenen Positionen phosphoryliert [185]. Die Phosphorylierung eines Tyrosins an bestimmten Positionen, z.B. Tyr¹⁰⁰⁷ von JAK2 bzw. Tyr⁹⁸⁰ von JAK3, führen zu einer Steigerung der Kinaseaktivität [186, 187]. Während die Phosphorylierung von Tyr¹⁰⁰⁸ (JAK2) bzw. von Tyr⁹⁸¹ (JAK3) zu einer Abnahme der Aktivität führt.

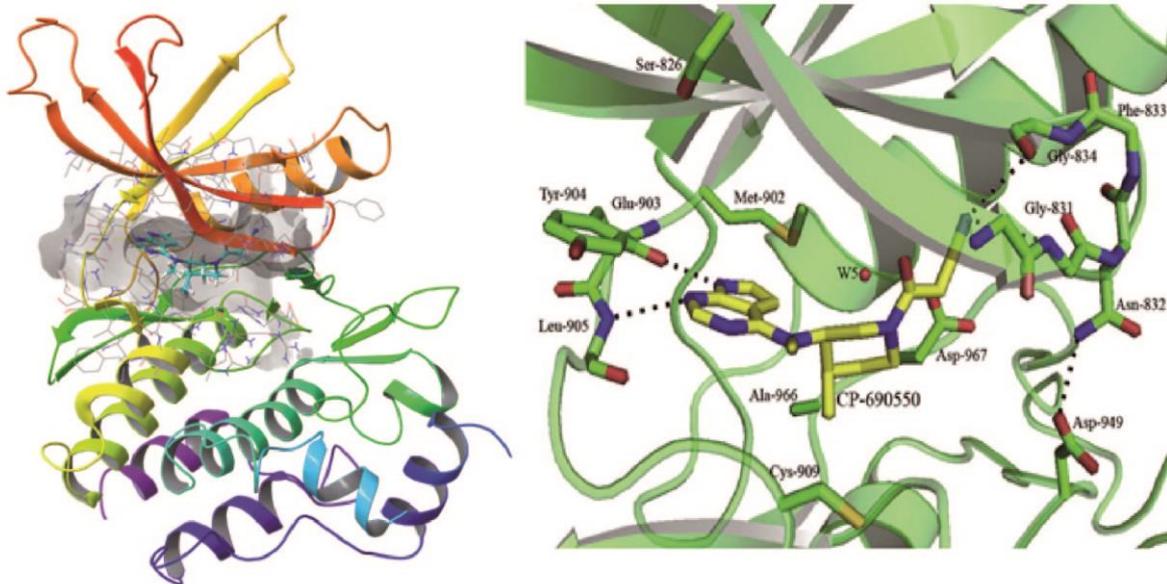


Abbildung 1-6: Bindung von Tofacitinib in der Kinasedomäne (pdb3LXK, [184])
Tofacitinib bindet in der ATP-Tasche der JAKs und verdrängt kompetitiv das ATP.

1.3.1.2 Nebenwirkungen

Die Zulassung von Tofacitinib in Europa wurde durch die *European Medicines Agency* (EMA) bis 2017 aufgrund der schweren Nebenwirkungen abgelehnt [188]. Erst seit diesem Jahr ist es bei der Therapie rheumatoider Arthritis zugelassen. Die Konsequenzen der Deletionen von JAKs wurden in Kap. 1.2.3 bereits geschildert. Tofacitinib inhibiert alle JAKs und seine immunsuppressive Wirkung führt zu einer verminderten Immunreaktion, wodurch Infektionen auftreten können [186]. In klinischen Studien konnten bei ca. 59 % der Patienten vor allem Infektionen des Respirationstraktes, aber auch Anämien und Neutropenien beobachtet werden [189-191]. Darüber hinaus kam es bei manchen Patienten zum Ausbruch von Herpes Zoster und Erysipel [176]. Eine Entwicklung von malignen Melanomen und der Ausbruch von Tuberkulose konnte ebenfalls in klinischen Studien beobachtet werden [192]. Im Jahre 2011 starb ein Patient während einer laufenden Studie mit Tofacitinib an Lungenversagen [193]. Dieser Vorfall konnte auf Tofacitinib zurückgeführt werden.

1.3.2 Pharmakokinetik

1.3.2.1 Absorption und Distribution

Tofacitinib ist sehr gut oral verfügbar, da es ein lipophiles Molekül mit basischen Eigenschaften ist und als Salz eine gewisse Löslichkeit aufweist. Es konnte eine orale Bioverfügbarkeit von ca. 74 % ermittelt werden. Das Tofacitinib liegt zum Teil als freie Base vor und kann nun als lipophiles Molekül die Phospholipidmembran der intestinalen Epithelzellen im Dünndarm passieren. Es wird sehr schnell resorbiert, so dass die maximale Plasmakonzentration bereits nach 20-60 min erreicht ist [194]. Die Halbwertszeit beträgt ca. 3,2 h. Tofacitinib weist eine Plasmaproteinbindung von etwa 40 % auf, dabei bindet es an Albumin und nicht an das α 1-saure Glykoprotein [195]. Die Verteilung erfolgt in fast alle Organe, jedoch wurde die höchste Konzentration in Leber, Niere und im Ziliarkörper des Auges gefunden.

1.3.2.2 Metabolismus und Elimination

Metabolismusstudien, die am Menschen durchgeführt wurden, ergaben eine Beteiligung von CYP450-Enzymen am Metabolismus von Tofacitinib [195]. Durch *in vitro* Biotransformationsstudien mit CYP450 Isoenzymen wurde CYP3A4/5 als Hauptenzym der Metabolisierung identifiziert, jedoch ist auch CYP2C19 am Metabolismus beteiligt [195]. Zur Verifizierung der beteiligten Enzyme wurden

24 Einleitung

Inhibitoren des CYP-Enzymsystems eingesetzt. Die Bildung einzelner Metabolite, aber vor allem die Bildung von Metaboliten durch CYP3A4/5, war stark beeinträchtigt. Die Wirkung von Tofacitinib auf das CYP450-System wurde ebenfalls untersucht [196]. Dabei wurde kein induktiver oder inhibitorischer Effekt durch Tofacitinib festgestellt.

In der Phase-II-Biotransformation unterliegt Tofacitinib der Konjugation an die Glucuronsäure [197]. So wird ca. 30 % nach der glomerulären Filtration renal ausgeschieden. Die restlichen 70 % werden in der Leber verstoffwechselt und anschließend über die Galle und den Darm ausgeschieden.

26 Einleitung

1.4 Das Prodrug-Prinzip

1.4.1 Allgemein

Der Begriff des Prodrugs wurde 1958 von Adrien Albert eingeführt [198]. Er definierte ein Prodrug als eine biologisch inaktive Substanz. Heute werden Prodrugs laut IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) als Verbindungen, die zuerst einer Biotransformation unterliegen, bevor sie einen pharmakologischen Effekt ausüben, definiert [199]. Es sind inaktive oder nur wenig aktive Verbindungen, die erst nach der Aufnahme aktiviert werden. Damals wurde dieses Prinzip nur selten angewendet. Heutzutage gewinnen Prodrugs einen immer höheren Stellenwert in der Arzneimittelentwicklung. Etwa 5-7 % der zugelassenen Arzneimittel werden als Prodrugs klassifiziert [200].

Das Prodrug-Prinzip wird genutzt, um pharmakokinetische, physikochemische oder pharmakodynamische Eigenschaften des Arzneistoffes zu verbessern. Konkret bedeutet dies, eine Erhöhung der chemischen Stabilität, Verbesserung der Löslichkeit, Maskierung von schlechtem Geschmack und/oder Geruch, Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit oder Erniedrigung der Toxizität [201]. Sie können in zwei Klassen eingeteilt werden: Einerseits nach der chemischen Stoffklasse und andererseits nach dem Mechanismus der Aktivierung, d.h. enzymatische oder nicht-enzymatische Aktivierung. Die bekanntesten Prodrugs sind Omeprazol, Simvastatin, Lovastatin, Enalapril und Aciclovir [202].

Für die vorliegende Arbeit ist insbesondere die intestinale Bioverfügbarkeit von Bedeutung. Eine der effektivsten Strategien verfolgt das Prinzip der gezielten Freigabe des Arzneistoffes im Kolon.

1.4.2 Amidoxim-Prodrugs

Die Entwicklung des Konzeptes der Amidoxim-Prodrugs erfolgte nachdem Clement *et al.* zeigen konnten, dass die enzymatische *N*-Reduktion von Amidoximen der *N*-Oxidation von Amidinen überwiegt [203, 204]. Das verantwortliche Enzym wurde 2006 als mitochondriale Amidoxim-reduzierende Komponente (mARC: *mitochondrial amidoxime reducing component*) identifiziert [205]. Es ist ein Dreikomponenten-Enzymsystem mit den Elektronentransportproteinen Cytochrom b_5 und NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase [206]. Nachdem das Amidoxim (pK_s ca. 4) die

Membran passiert, wird es durch das mARC-System zum Amidin reduziert. Das Amidin kann aufgrund seiner hohen Basizität (pK_s ca. 11) und der positiven Ladung nicht mehr die Zelle verlassen, denn es liegt unter physiologischen Bedingungen protoniert vor [207]. Nichtsdestotrotz ist die Amidin-Funktion sehr wichtig für die Interaktion mit dem Zielprotein [208]. Es imitiert die Struktur des Arginins, wodurch es nach Ausbildung ionischer Wechselwirkungen eine hohe Affinität zum Zielprotein aufweist. Daher gibt es trotz geringer Bioverfügbarkeit Arzneistoffe, die eine Amidin-Funktion aufweisen und erhältlich sind, wie zum Beispiel Pentamidin und Dabigatran [209, 210].

In vivo wurde die Erhöhung der Bioverfügbarkeit unter anderem auch am Amidoxim-Prodrug Ximelagatran gezeigt [211]. Aufgrund der doppelten Prodrug-Strategie konnte Ximelagatran 2004 als erstes orales Antikoagulanz eingeführt werden und die Bioverfügbarkeit im Menschen von 3-7 % auf 20 % erhöht werden. Es weist neben dem Amidoxim-Konzept zusätzlich noch eine veresterte Säuregruppe auf. Leider wurde Ximelagatran 2006 aufgrund seiner hohen Lebertoxizität vom Markt genommen. Es konnte aber kein Zusammenhang zwischen der Lebertoxizität und dem Prodrug-Prinzip festgestellt werden [212, 213].

Das Amidoxim-Prodrug Konzept könnte eine Möglichkeit darstellen, den Wirkstoff gezielt in das Kolon zu applizieren. Eine Kombination aus rektaler Gabe und die Applikation eines Amidoxim-Prodrugs könnte die Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffes erhöhen und gewährleisten, dass der Arzneistoff gezielt im Kolon wirkt. Bei einer CED kommt es aufgrund der Entzündung zur Störung des intestinalen Zellverbandes, wodurch das Amidoxim auch in Immunzellen der *Lamina propria* gelangen könnte. Durch das Konzept wird aber eine systemische Verteilung verhindert, da das Amidin in den Immunzellen verbleibt. Dieses Konzept könnte eine vielversprechende Strategie in der Therapie von CED darstellen.

28 Einleitung

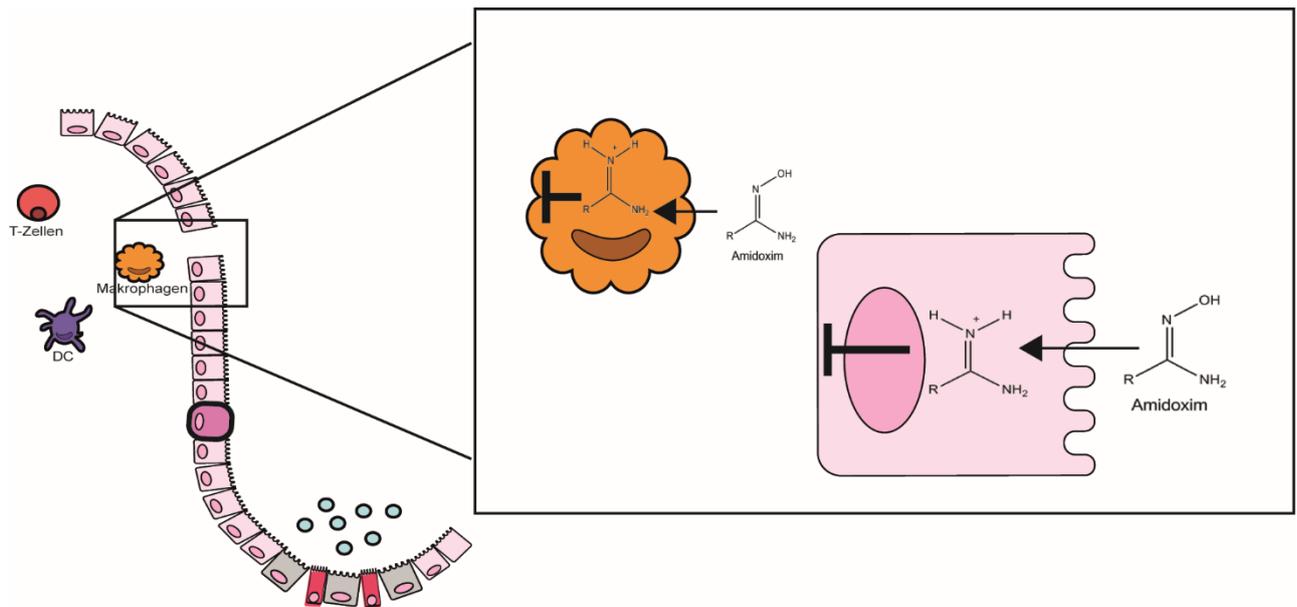


Abbildung 1-8: N-Reduktion des Amidoxims durch mARC in IEC und Immunzellen

Das Amidoxim kann aufgrund seiner Lipophilie die Membran der Zelle passieren. In der Zelle wird es durch das Dreikomponentensystem reduziert und liegt als protoniertes Amidin vor. Dieses ist wegen der Ladung nicht mehr in der Lage die Zelle zu verlassen. Bei CED Patienten kommt es zu einer Zerstörung des intestinalen Zellverbandes, wodurch das Amidoxim auch in Immunzellen gelangen kann.

1.4.3 Weitere Methoden zur gezielten Freigabe im Kolon

Eine weitere Prodrug-Strategie ist die Nutzung der Mikroflora des Kolons. Ein Beispiel hierfür sind die Salazine, welche in der Therapie der CED angewendet werden (s. Kap. 1.1.3). Die Prodrugs sind Azoverbindungen bestehend aus 5-Aminosalicylsäure und einem aminhaltigen Molekül, die durch eine Azokopplung miteinander verbunden sind. Die Mikroflora ist in der Lage diese Azoverbindungen zu spalten, wodurch Mesalazin frei wird und gezielt seine Wirkung im Kolon entfalten kann [214]. Diese Spaltung war eine Zufallsentdeckung und führte zur Entwicklung des Sulfonamides. Diese Strategie kann auf andere Moleküle übertragen werden. Eine Substitution mit Glykosiden, Cyclodextrinen, Glukuronaten oder Dextranen ermöglicht ebenfalls eine Kolon-spezifische Freigabe des Wirkstoffes, da hauptsächlich die Bakterien im Kolon diese glykosidischen Bindungen spalten können [215]. Nicht nur chemische Veränderungen des Moleküls, sondern auch Veränderungen der Arzneiform durch säurestabile Ummantelung oder Überzüge mit Polysacchariden können den Arzneistoff gezielt in den Kolon transportieren [216].

2 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit waren die neuen Substanzen PF-189 und PF-183, als mögliche JAK-Inhibitoren zu charakterisieren. Als Vergleichssubstanz diente dabei der zugelassene Wirkstoff Tofacitinib. PF-189 und PF-183 sind Amidoxim-Prodrugs und wurden von Ellen Pfaffenrot im Arbeitskreis von Prof. Dr. Laufer in Tübingen synthetisiert. PF-189 weist dieselbe Molekülstruktur wie das Tofacitinib auf, jedoch wurde bei PF-189 die Nitril-Gruppe gegen eine Amidoximgruppe ersetzt. PF-183 weist ein 1,6-Dihydropyrrolo-pyridin-Grundgerüst auf und wirkt, nach der enzymatischen Katalyse, aufgrund der Amidin-Funktion selektiver gegen JAK3.

Die Untersuchungen sollten im Hinblick auf Toxizität und Wirksamkeit sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* erfolgen. Hauptteil war es dabei, das Amidoxim-Prodrug-Prinzip zur Behandlung von entzündlichen Darmerkrankungen zu testen. Hierfür sollte der Einfluss der einzelnen Substanzen auf eine Karzinomzelllinie mit intestinalem Ursprung mit molekularbiologischen Methoden bestimmt werden und die Selektivität und Kinetik untersucht werden.

Für das DSS-Kolitis-Modell in der Maus sollte vorher *in vitro* geprüft werden, ob die Substanzen relevante Entzündungs- oder Heilungsprozesse beeinträchtigen können. Mit der „Scratch-Assay“-Methode sollte die Wundheilung bestimmt werden und durch Einsatz proinflammatorischer Zytokine, die auch Zelltod hervorrufen können, sollte die inhibitorische Kapazität ermittelt werden. Zusätzlich konnte geprüft werden, ob eine Selektivität gegen JAK3 im DSS-Kolitis-Modell von Vorteil ist.

Mittels der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) sollte das Amidoxim-Prodrug *in vivo* auf Funktionalität getestet werden. Zur Bestimmung der einzelnen Substanzen in Leber, Niere und Kolon musste eine HPLC-Methode entwickelt und validiert werden.

Die Wirksamkeit des Prodrug-Prinzips und der neuen Substanzen sollte zum Schluss in einem Darmentzündungsmodell in der Maus überprüft und bestimmt werden. Insgesamt wird erhofft, bessere Verbindungen als Tofacitinib hinsichtlich des Nebenwirkungsprofils zu finden.

Zusätzlich sollte der Metabolismus von Tofacitinib auf die Bildung von Cyanid untersucht werden, um ausreichende Klarheit über die Toxizität von Tofacitinib zu schaffen.

3 Material und Geräte

3.1 Enzyme

Tabelle 3-1: Liste der verwendeten Enzyme

Isoenzym	spezifische Aktivität ($\text{pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{pmol p450}^{-1}$)	Hersteller
CYP1A2	30	BD Bioscience (Bedford, MA, USA)
CYP2A6	11,1	BD Bioscience (Bedford, MA, USA)
CYP2B6	4,9	BD Bioscience (Bedford, MA, USA)
CYP2C8	5,4	BD Bioscience (Bedford, MA, USA)
CYP2C9	40,0	BD Bioscience (Bedford, MA, USA)
CYP2C19	3,4	BD Bioscience (Bedford, MA, USA)
CYP2D6	46	BD Bioscience (Bedford, MA, USA)
CYP3A4	170	BD Bioscience (Bedford, MA, USA)

3.2 Zelllinien

Tabelle 3-2: Liste der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Katalog-Nr.	Spezies	Zelltyp	Hersteller
HT-29	ACC-299	human	kolorektale Adenokarzinomzellen	DSMZ
Caco-2		human	kolorektale Adenokarzinomzellen	DSMZ
SW480	ACC-313	human	kolorektale Adenokarzinomzellen	DSMZ
Ba/F3-gp130/hIL-6R		murin	Prä-B-Zellen	freundliche Gabe von Prof. Dr. Rose-John
THP-1	ACC-16	human	Monozyten	DSMZ
Jurkat	ACC-282	human	T-Zellen	DSMZ

3.3 Medien, Supplemente und Puffer

Tabelle 3-3: Liste der verwendeten Medien und Supplemente

Medien/Supplemente	Hersteller
DMEM	Life Technologies GmbH (Carlsbad, CA, USA)
FBS	Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)
RPMI Medium 1640	Life Technologies GmbH (Carlsbad, CA, USA)
MEM	Life Technologies GmbH (Carlsbad, CA, USA)
Trypsin/EDTA	Life Technologies GmbH (Carlsbad, CA, USA)
IntestiCult™ Organoid Growth Medium Mouse Basal Medium	Stemcell™ Technologies (Vancouver, Kanada)
IntestiCult™ Organoid Growth Medium Mouse Supplement 1	Stemcell™ Technologies (Vancouver, Kanada)
IntestiCult™ Organoid Growth Medium Mouse Supplement 2	Stemcell™ Technologies (Vancouver, Kanada)
BD Matrigel Growth factor reduced, Phenol red free 10ml	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)

Tabelle 3-4: Liste der verwendeten Puffer

Puffer	Zusammensetzung	Hersteller
DLB-Lysis-Puffer	2 % (m/v) SDS, 2 mM Natriumvanadat, 20 mM Tris (pH 7,4), 1:2 Verdünnung mit Aqua bidest, Protease-Inhibitor 1x, Phosphatase Inhibitor Cocktail 1x	-
5x SDS Ladepuffer	250 mM Tris (pH 6.8), 10 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) Glycerol, 500 mM DTT	-
4x Trenngelpuffer	1.5 M Tris (pH 8.8), 0.4 % (w/v) SDS	-
Sammelgelpuffer	0.5 M Tris (pH 6.8), 0.4 % (w/v) SDS	-
Elektrophoresebuffer (10x)	25 mM Tris (pH 8.3), 192 mM Glycin, 0.1 % SDS	BioRad (Kalifornien, USA)
Anodenpuffer 1	30 mM Tris, 20 % (v/v) Methanol	-
Anodenpuffer 2	300 mM Tris, 20 % (v/v) Methanol	-
Kathodenpuffer	25 mM Tris, 40 mM 6-Aminocaproinsäure, 20 % (v/v) Methanol	-
10x TBS	200 mM Tris (pH 7.6), 1,37 M NaCl	-
TTBS	1 x TBS, 0.1 % (v/v) Tween20	-
DPBS	1 mM KH ₂ PO ₄ , 155 mM NaCl, 3 mM Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	Life Technologies GmbH (Carlsbad, CA, USA)
FACS Waschpuffer	0.5 % (w/v) BSA in PBS	-
Stripping-Puffer	2 % (w/v) SDS, 62.5 mM Tris (pH 6.8)	-

34 Material und Geräte

3.4 Zytokine

Tabelle 3-5: Liste der verwendeten Zytokine zur Stimulation

Stimulantien	Konzentration	Hersteller
rekombinant human IL-6	100 ng/ml	PeptoTech GmbH (Hamburg, Deutschland)
rekombinant hyperIL-6	100 ng/ml	freundliche Gabe von Prof. Dr. Rose-John
rekombinant human IL-4	50 ng/ml	PeptoTech GmbH (Hamburg, Deutschland)
rekombinant human IL-22	100 ng/ml	PeptoTech GmbH (Hamburg, Deutschland)
rekombinant human EGF	10 ng/ml	R&D systems Inc. (Minneapolis, MN USA)
rekombinant human IFN- γ	100 ng/ml	Immunotools (Friesoythe, Deutschland)
rekombinant murin IL-22	100 ng/ml	PeptoTech GmbH (Hamburg, Deutschland)

3.5 Antikörper

Tabelle 3-6: Liste der verwendeten Antikörper

Antikörper	Spezies	angewendete Verdünnung	Hersteller
Anti-JAK1	Hase, polyklonal	1:1000	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
Anti-JAK2 (D2E12) XP®	Hase, monoklonal	1:1000	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Anti-JAK3	Hase, polyklonal	1:500	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
Anti-Tyk2	Maus, monoklonal	1:1000	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Anti-p-STAT 3	Hase, monoklonal	1:1000	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Anti-STAT3	Hase, monoklonal	1:1000	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Anti-pSTAT1	Hase, monoklonal	1:1000	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)

Antikörper	Spezies	angewendete Verdünnung	Hersteller
Anti-STAT1	Hase, monoklonal	1:1000	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Anti-pSTAT6	Hase, polyklonal	1:1000	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Anti-STAT6	Hase, monoklonal	1:1000	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Anti-PARP	Hase, polyklonal	1:1000	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Anti-Caspase 3	Hase, polyklonal	1:1000	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Anti- β -Aktin	Maus, monoklonal	1:10000	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Anti-Ki67	Maus, monoklonal	1:500	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Anti-BrdU	Maus, monoklona		BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Anti-Hase-HRP		1:3000	Amersham Biosciences (Glattbrugg, Schweiz)
Anti-Maus-HRP		1:3000	Amersham Biosciences (Glattbrugg, Schweiz)

3.6 Chemikalien

Tabelle 3-7: Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
1,3-Dimethylbarbitursäure	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
6-Aminocaprinsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Acetonitril (HPLC grade)	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Acrylamid	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
APS	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
BSA	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Hamburg, Deutschland)

36 Material und Geräte

Chemikalien	Hersteller
Chloramin-T	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
DTT	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Glycerol	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
HALT™ Protease und Phosphatase Inhibitor Cocktail	Thermo Fischer Scientific, Bremen, Deutschland
Kaliumcyanid	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Ketoconazol	Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Methanol (HPLC grade)	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
NADPH	Roche Diagnostics AG (Mannheim, Deutschland)
Natrium-1-octylsulfonat	TCI Deutschland GmbH (Eschborn, Deutschland)
Natriumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Natriumdithionit	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Natriumoctylsulfonat	TCI Deutschland GmbH (Eschborn, Deutschland)
Natriumvanadat	
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	Life Technologies GmbH (Carlsbad, CA, USA)
Plasdone™ Povidon K 90	Ashland Inc. (Covington, KY, USA)
Pyridin	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Salzsäure	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
SDS	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
TEMED	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Tetramethylammoniumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Tetramethylammoniumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)

Chemikalien	Hersteller
Tofacitinibcitrat	Acorn Pharmatech (Redwood City, CA, USA)
Trifluoressigsäure	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Tris-Base	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Tween 20	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)

3.7 Geräte

Tabelle 3-8: Liste der verwendeten Geräte

Geräte	Hersteller
Bandelin Sonorex Super RK 106 Ultraschallbad	Bandelin electronic GmbH & Co. KG (Berlin, Deutschland)
Brutschrank	
Cary 50 Scan UV-Visible Microplate Reader	Varian GmbH (München, Deutschland)
Cary 50 Scan/ 50 MPR	Varian GmbH (München, Deutschland)
Cary Win UV-Software 2.0	
Cellometer Auto T4 Plus	Heraeus (Hanua, Deutschland)
Eppendorf <i>Multipette plus</i>	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Eppendorf <i>Referenz</i> Pipetten 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 2500 µl	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Gefriertrockner Alpha 2-4	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH (Osterode am Harz, Deutschland)
GFL 1033 Schüttelwasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel, Deutschland)
Hettich Mikroliter Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen, Deutschland)
Hettich Mikrozentrifuge 200	Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen, Deutschland)
HPLC	
Kleinschüttler IKA-VF2	IKA® Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Deutschland)
Laminar Air Flow Werkbank	Thermo Scientific (Bremen, Deutschland)
pH-Messgerät inoLab® pH level 1	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH (Weilheim, Deutschland)
Tecan Infinite F200 pro plate reader	Tecan Group AG (Männedorf, Schweiz)
Tissue lyser II	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Vibrationsmischer IKA Vibrax-VXR	IKA® Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Deutschland)
Waage Sartorius CP225D	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Waage Sartorius L2200P	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)

38 Material und Geräte

3.8 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3-9: Liste der Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
96-well Microtiterplatten, Polystyrol, U-Bottom	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Einmalskalpelle	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
FACS- Rörhchen	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Filterpipettenspitzen	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Halb-Mikro-Küvetten 10x4 mm	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Kanülen, 18G, 20G, 26G	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Microvette® 200 Kapillarblutentnahmesystem, Na-EDTA	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Pasteurpipetten aus Glas	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
Petrischale	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Serologische Pipetten, steril	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Spritzen 1 ml, 10 ml, 100 ml	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
<i>Stainless steel beads</i> , 5mm	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Vasofix Safety Venenverweilkanüle 22G	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Zellkultur-Platten mit Deckel, 6-well, 12-well, 24-well, 96-well, flat bottom	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Zellschaber	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Zellsieb, 100 µm	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Zentrifugen-Tubes, konisch	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)

4 Methoden

4.1 Metabolismusstudien

4.1.1 Gewinnung porciner und humaner Lebermikrosomen

Die Schweinelebermikrosomen wurden von Carmen Krischkowski nach einer etablierten Methode gewonnen [218]. Die Leber wurde dabei vom Schlachthof in Bordesholm geholt und in eisgekühltem 20 mM Kaliumphosphatpuffer mit 1 mM Na₂-EDTA bei pH 7.4 gelagert. Weitere Arbeitsschritte erfolgten bei einer Temperatur von 0-4°C. Die Leberlappen wurden nun mit einem 50 mM Phosphatpuffer (1 mM Na₂-EDTA, pH 7.4) perfundiert, in Stücke zerkleinert und solange gewaschen, bis das Waschwasser klar wurde. Die Organstücke wurden im handelsüblichen Fleischwolf zerkleinert und der entstandene Brei wurde in den Durchflusshomogenisator gegeben. Das Homogenat wurde durch ein Sieb von groben Stücken getrennt und die Mikrosomen mittels Ultrazentrifugation gewonnen [219].

Die Gewinnung von humanen Lebermikrosomen erfolgte ebenfalls mithilfe der Ultrazentrifugation durch Carmen Krischkowksi.

4.1.2 Bestimmung des Proteingehaltes der Lebermikrosomen

Der Proteingehalt der Lebermikrosomen wurde mithilfe der BCA-Methode bestimmt. Hierfür wurde das BCA Protein Assay Kit des Herstellers Pierce (Rockford, USA) gemäß Herstellerangaben verwendet. Die Bestimmung basiert auf der Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺ durch Proteine im alkalischen Medium. Anschließend reagiert das Kupferion mit Bicinchoninsäure (BCA) zu einem violettem Komplex, das bei 562 nm photometrisch vermessen werden kann. Die Quantifizierung erfolgte mit einer Kalibriergeraden, zu deren Erstellung man eine Rinderserumalbuminlösung mit bekannter Konzentration verwendete [220].

4.1.3 Bestimmung des Cytochrom P450-Gehaltes

Der Gehalt an Cytochrom P450 in den Schweinelebermikrosomen wurde in Anlehnung an die Vorschrift von Omura *et al.* photometrisch bestimmt [221]. Dabei wurden die Mikrosomen 1:3 in Tris-HCl-Puffer pH 7,4 verdünnt und anschließend wurde eine Spatelspitze Natriumdithionit hinzugegeben und in der Küvette gerührt. Nun wurde das erste Spektrum bei 400-500 nm aufgenommen. Nach 20-sekündiger

Einleitung von Kohlenstoffmonooxid (CO) wurde die Küvette weitere 5 min stehen gelassen. Anschließend wurde ein zweites Spektrum bei 400-500nm aufgenommen.

Bei dieser Bestimmung wird das zentrale Eisen(III)-Ion des Porphyrin-Grundgerüsts mit Hilfe von Natriumdithionit zu Eisen(II) reduziert. Die reduzierte Form des Eisens kann nun CO binden. Der gesamte Komplex weist ein Absorptionsmaximum von 450 nm auf. Durch die beiden Spektren kann ein Differenzspektrum erstellt werden um die Absorptionsdifferenz ΔA zu ermitteln. Durch Einsetzen der bekannten Parameter in das Lambert-beersche Gesetz kann die Konzentration berechnet werden. Der empirisch ermittelte Absorptionskoeffizient ϵ beträgt $91 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

4.1.4 *In vitro* Biotransformationsansätze

Die Bildung von Blausäure bzw. Cyanid-Ionen wurde unter aeroben Bedingungen im Schüttelwasserbad bei 37 °C bestimmt. Die Inkubation fand in 1,5 ml Reaktionsgefäßen mit einem Ansatz von 150 µl statt. Der Inkubationsansatz beinhaltete 100 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1,5 mM Tofacitinibcitrat und das Protein. Nach 3-minütiger Vorinkubation wurde anschließend 1 mM NADPH als Cofaktor des Enzymsystems hinzugegeben, um die Inkubation zu starten.

Nach Ablauf der verschiedenen Inkubationszeiten wurde die enzymatische Reaktion mit 150 µl Methanol abgestoppt, der komplette Ansatz 5 min geschüttelt und nachfolgend bei 10000 rpm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und für die Bestimmung verwendet.

Inkubationsansätze mit Isoenzymen enthielten das jeweilige Isoenzym, 1,5 mM Tofacitinibcitrat und 100 mM Tris-HCl pH 7.4.

Für die Inkubationen mit Ketoconazol wurde das Volumen des Puffers verringert und eine gleiche Menge an verschiedenen Konzentrationen des Ketoconazols hinzugegeben, so dass am Ende jeder Inkubationsansatz 150 µl enthielt. Ketoconazol wurde in DMSO gelöst und so verdünnt, dass der Inkubationsansatz nur 5 % DMSO enthielt.

4.1.5 Photometrische Quantifizierung von Cyanid

Die Bestimmung von Cyanid basiert auf der König-Reaktion. Es wird eine Methode mit mehreren Reaktionsschritten beschrieben. Sie basiert auf der Reaktion von Cyanid mit

42 Methoden

einem Halogen. Anschließend reagiert dieses mit Pyridin und einem primären Amin zu einem Farbstoff der mittels UV-Spektroskopie vermessen werden kann [222]. Diese Methode wurde durch Asmus *et. al.* modifiziert, um die Sensitivität des Verfahrens zu erhöhen. Sie benutzen statt eines primären Amins eine Mischung aus Pyridin und Barbitursäure [223]. Es wird ein Polymethinfarbstoff gebildet. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass der gebildete Farbstoff innerhalb von 8-15 min vermessen wird, da er instabil ist [224]. Die Methode wurde jedoch statt mit Barbitursäure mit 1,3-Dimethylbarbitursäure.

Der Überstand von 100 µl wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 5 µl einer 1 %-igen Chloramin T-Lösung versetzt, gevortext und exakt 5 Minuten bei RT stehen gelassen. Nach Ablauf der Zeit wurden 15 µl des Mischreagenzes (s.u.) hinzugegeben, gevortext und exakt 8 min bei RT stehen gelassen. Anschließend wurde die Lösung erneut gevortext und photometrisch bei 590 nm vermessen.

Mischreagenz

6 %	1,3-Dimethylbarbitursäure
30 %	Pyridin
6 %	konz. Salzsäure
	Aqua bidest

4.1.6 Kalibrierung und Wiederfindung

Eine Kalibrierung wurde vor jeder *in vitro* Biotransformation durchgeführt. Dafür wurde Kaliumcyanid in 100 mM Tris-HCl Puffer pH 7,4 gelöst und verdünnt. Zu den jeweiligen Verdünnungen wurden wie in Kapitel 4.1.5 beschrieben die Lösungen hinzugegeben und vermessen.

Die Wiederfindung wurde mit den Verdünnungen im gleichen Konzentrationsbereich durchgeführt. Es wurde genauso verfahren, wie in Kapitel 4.1.4 beschrieben. Die Reaktion wurde jedoch sofort nach Zugabe von NADPH mit eiskaltem Methanol gestoppt.

4.2 Untersuchungen zur Stabilität

Für Untersuchungen zur Stabilität von Tofacitinib, PF-189 und PF-183 wurden 50 µM der Substanzen in Kaliumhydrogenphosphat-Puffer pH 2, 7, und 9 bei 37 °C im Thermoblock erwärmt. Nach 0, 10 und 30 min und 1, 2, 3, 24, 48 und 72 h wurden die Proben mit eiskaltem Kaliumhydrogenphosphat-Puffer pH 7,4 auf 25 µM verdünnt und bei -80 °C eingefroren. Die Proben wurden anschließend mittels der Methoden, beschrieben in Kap. 4.7.2.4 und 4.7.2.5 vermessen.

4.3 Zellkulturmethoden

4.3.1 Kultivierung humaner Zelllinien

Für *in vitro* Untersuchungen wurden die folgenden Zelllinien verwendet. Die Zellen wurden jeweils als adhärenter Rasen bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ in Kulturflaschen kultiviert. Dabei wurde folgendes Nährmedium verwendet:

HT-29	DMEM supplementiert mit 10 % (v/v) FBS, 4,5 g/l D-Glucose, 4 mM L-Glutamin, 110 mg/l Natriumpyruvat
Ba/F3-gp130-hIL-6R	DMEM supplementiert mit 10 % (v/v) FBS, 4,5 g/l D-Glucose, 4 mM L-Glutamin, 110 mg/l Natriumpyruvat, 10ng/ml IL-6
Jurkat	RPMI 1640 supplementiert mit 10 % (v/v) FBS, 2 mM L-Glutamin, 25 mM HEPES
THP-1	RPMI 1640 supplementiert mit 10 % (v/v) FBS, 2 mM L-Glutamin, 25 mM HEPES
SW480	RPMI 1640 supplementiert mit 10 % (v/v) FBS, 2 mM L-Glutamin, 25 mM HEPES
Caco-2	MEM supplementiert mit 20 % (v/v) FBS, 2 mM L-Glutamin

Die Zelllinien wurden 2x pro Woche passagiert. Hierfür wurde zuerst das entsprechende Nährmedium entfernt und die Zellen mit DPBS-Puffer gewaschen. Adhärenente Zellen wurden anschließend mit einer Trypsin/EDTA-Lösung für 5 min bei 37 °C behandelt, wodurch sie sich von der Unterlage lösten und als Suspension vorlagen. Die Suspension wurde in Zentrifugen-Tubes überführt und 5 min bei 300 g zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde, nach Verwerfen der Lösung, in 5 ml

44 Methoden

frischem Nährmedium resuspendiert und im gewünschten Splitverhältnis auf die neuen Zellkulturflaschen verteilt oder für Experimente mit definierter Zellzahl ausplattiert. Die Zellzahl wurde in einer Einmalzählkammer bestimmt. Alle Schritte an offenen Zellkulturen wurden unter aseptischen Bedingungen unter einer *Laminar Air Flow* Werkbank (Thermo Scientific, Bremen, Deutschland) durchgeführt.

Für jegliche Untersuchungen in Zellen wurde Tofacitinib in DPBS und PF-189/PF183 in DMSO gelöst. Die Prodrug-Lösungen wurden dann soweit verdünnt, dass nicht mehr als 5 % DMSO zur Behandlung verwendet wurde.

Tabelle 4-1: Überblick über die eingesetzten Zellzahlen für verschiedene Experimente

Experiment	Zellkulturplatte	Zellzahl/well	Volumen des Mediums (ml)
Stimulation	12-well Platte	3×10^5	1
Proteinlysate	12-well Platte	3×10^5	1
RNA-Isolierung	12-well Platte	3×10^5	1
FACS-Messung	6-well Platte	4×10^5	2
MTS-Assay	96-well Platte	2×10^4	0,1
Scratch-Assay	12-well Platte	3×10^5	1

4.3.2 Zellviabilitätsmessung mittels MTS-Assay

Zu Untersuchungen der Beeinflussung der Zellviabilität durch die einzelnen Substanzen wurde ein MTS-Assay durchgeführt. Durch eine Inhibierung der Proliferation können sich die Zellen nicht mehr oder nur im geringen Maße vermehren. Für diesen Test wurde das CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay der Firma Promega verwendet. Dabei werden die Reagenzien MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) und Phenazinmethosulfat (PMS) eingesetzt. MTS wird über die Membran der Zellen aufgenommen und dort durch Dehydrogenasen zu Formazan umgewandelt. PMS dient dabei dem Elektronentransport.

Zellen wurden in 96-well Platten ausplattiert und für 24 h in Medium mit 1 % FBS kultiviert. Nach Ablauf der Zeit wurde das Medium entnommen und durch verschiedene Konzentrationen an Tofacitinibcitrat, PF-189 und PF-183 im Medium mit

1 % FBS ersetzt. Nach 24 h, 48 h oder 72 h wurde 19 µl MTS und 1 µl PMS pro *well* hinzugefügt und 4 h bei 37 °C inkubiert. Die Absorption wurde dann bei 490 nm vermessen.

4.3.3 AnnexinV/Propidiumiodid-Markierung und Analyse

Die Bestimmung des programmierten Zelltodes erfolgte mit einer AnnexinV/Propidiumiodid Markierung unter Verwendung des BD Pharmingen™ FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Bioscience, Heidelberg). Die Vermessung erfolgte durch ein Durchflusszytometer (FACSCalibur™, BD Biosciences, Heidelberg). Die Daten wurden mithilfe des Programmes CellQuest™ Pro (Version 5.2, BD Biosciences, Heidelberg) ausgewertet.

Für jede Messung wurden 10.000 Zellen analysiert. Zunächst wurden die Zellen mit einem Zellschaber auf Gummi von der 6-*well* Platte gelöst und mit Zellkulturmedium in 2 ml Reaktionsgefäßen gesammelt. Nun wurden die Zellen 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet mit 200 µl Waschpuffer resuspendiert und in 96-*well* Platten verteilt. Die Platte wurde wieder bei 1000 rpm 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Daraufhin wurden die Zellen in 50 µl der Färbelösung resuspendiert und nach 10 min vermessen.

Färbelösung

10x Annexin Binding Buffer (1:10 in H₂O)

1:20 FITC Annexin V

1:20 Propidiumiodid

4.3.4 *in vitro* Wundheilung

Für die Experimente zur *in vitro* Wundheilung war es wichtig, dass die Zellen einen konfluenten, einschichtigen Zellverband bildeten. Deshalb wurde eine gleiche Anzahl an Zellen in 12-*well*-Platten drei Tage in DMEM + 10 % FCS bei 37 °C kultiviert. Das Medium wurde gewechselt und die Zellen wurden einen weiteren Tag bei gleichen Bedingungen kultiviert. Am Tag vor dem Versuch wurde das Medium der Zellen gewechselt (DMEM + 1% FCS), so dass sie sich alle gleich verhalten. Bevor die Risse zugefügt wurden, wurden die Zellen 2 h mit Tofacitinib, PF-189 und PF-183 behandelt. Anschließend wurde das Medium entfernt, einmal mit DPBS gewaschen und Risse

46 Methoden

zugefügt. Diese wurden 2x mit DPBS gespült. Die Aufnahme der Risse unter dem Axio Imager Z1 Mikroskops (ZEISS, Oberkochen, Deutschland) erfolgte nach 0 und 24 h. Nach 24 h wurden die Proteine gewonnen, das Meridium entfernt und die Zellen mit DPBS gewaschen. Nachdem das DPBS verworfen wurde, wurde die Platte umgedreht und auf dem Boden mit einem Skalpell eine gerade Linie gezogen, so dass ein *well* in eine obere und untere Hälfte geteilt wurde. Anschließend wurden mittels einer 200 µl Pipettenspitze 3 dünne Risse in den Zellverband gefügt. Die „Wunden“ wurden 2x mit DPBS gewaschen, um die zerstörten Zellen zu entfernen. Anschließend wurde das Medium mit den zu untersuchenden Substanzen auf die Zellen gegeben. Die Risse wurden sofort und nach Ablauf von 24 h unterm Axio Imager Z1 Mikroskops fotografiert. Die Auswertung erfolgte mittels der Software AxioVision SE64 Rel.4.9 (ZEISS, Oberkochen, Deutschland). Die Berechnung des relativen Wachstums wurde mittels folgender Gleichung durchgeführt:

$$\frac{\text{absolutes Wachstum (24 h- 0 h)}}{\text{Größe (0 h)}} * 100$$

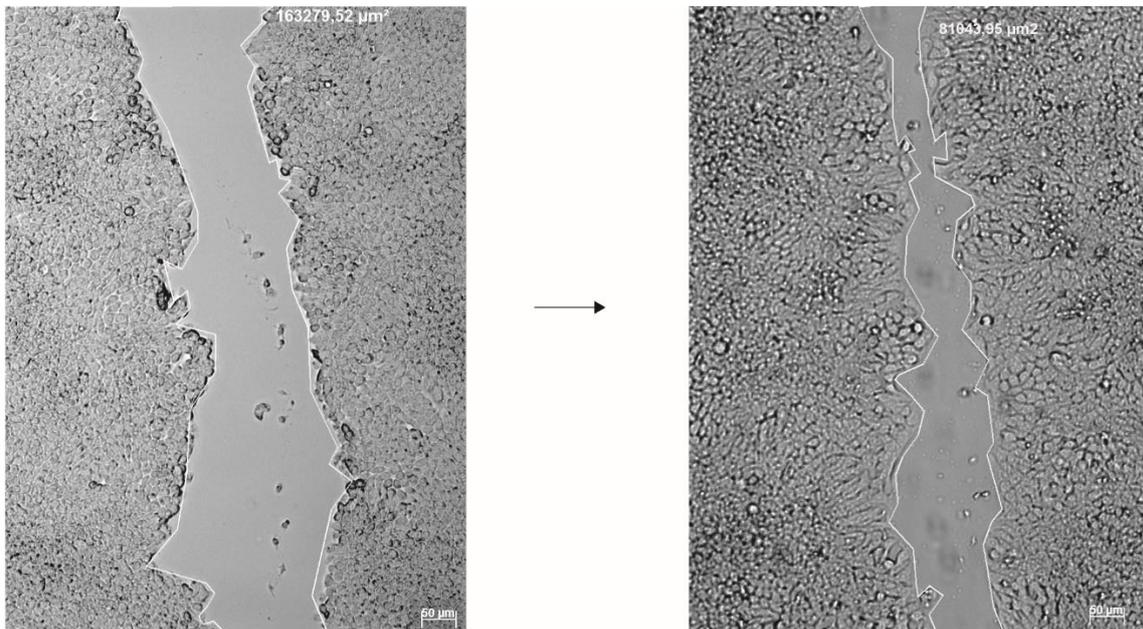


Abbildung 4-1: Bestimmung der Migration von HT-29-Zellen nach 24 h

Die Größe der „Wunde“ wurde direkt nach Beginn des Experimentes (Tag 0) und 24 h danach mittels der Software AxioVision SE64 Rel.4.9 bestimmt.

4.4 Molekularbiologische Methoden

4.4.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA (*ribonucleic acid*) aus Zellen erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland). Die Zellen wurden mit DPBS gewaschen, in 350 µl RLT-Puffer, supplementiert mit 10 µl/ml 2-Mercaptoethanol, lysiert und über eine QiaShredder®-Säule und anschließender Zentrifugation bei 13.000 rpm für 2 min aufgeschlossen. Kolonstücke wurden zuerst in 350 µl RLT-Puffer (10 µl/ml 2-Mercaptoethanol) aufgenommen und die Zellen mittels des Tissuelyser II (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgeschlossen, so dass die RNA frei wird. Anschließend wurde die Suspension in eine QiaShredder®-Säule gegeben und zentrifugiert. Der Durchfluß wurde mit einem gleichen Anteil an 70 %-igem Ethanol versetzt und auf eine RNeasy Spin-Säule überführt. Durch das Zentrifugieren bei 10.000 rpm für 30 sec wurde die RNA nun an die Säule gebunden. Nach einem weiteren Waschschrift mit RW1-Puffer wurde die RNA mit 80 µl DNase-Lösung 30 min bei RT inkubiert. Nun wurde die Säule erneut mit RW1-Puffer gewaschen und anschließend 2x mit 500 µl RPE-Puffer 30 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt zur Trocknung wurde RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben und 5min bei RT inkubiert. Das Wasser löst die RNA von der Säule und durch die Zentrifugation konnte die Gesamt-RNA eluiert werden. Die isolierte RNA wurde bei -80 °C aufbewahrt und jeder weitere Schritt auf Eis durchgeführt.

Die Konzentration der gewonnen RNA wurde mit dem NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) ermittelt.

48 Methoden

4.4.2 cDNA-Synthese

Für weitere Analysen wurde nun die komplette RNA in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dies erfolgte mittels des Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland). Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

Tabelle 4-2: Komponenten des Kits und die Inkubationsbedingungen

Schritt	verwendete Komponente	Menge	Inkubation
1.	RNA	500- 1000 ng	
	Oligo(dt) ₁₈ Oligonucleotide	0,125 µl	
	dNTP mix (10mM each)	0,5 µl	5 min, 65 °C
	Nuklease-freies Wasser	ad 7,5 µl	
2.	5x RT-Puffer	2 µl	10 min, 25 °C
	Maxima H Minus RT	0,5 µl	15 min, 50 °C
			5 min, 85 °C

4.4.3 Quantitative Echt-Zeit Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die quantitative Echt-Zeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren. Sie beruht auf dem Prinzip der PCR, ermöglicht aber zusätzlich die Quantifizierung der replizierten DNA. Zur Quantifizierung wurde der DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green verwendet. Es wurden Oligonucleotide konzipiert, basierend auf dem Abschnitt der Original-DNA, das von Interesse ist. Diese Oligonucleotide wurden so entwickelt, dass sie sich bei 60 °C anlagern und ein Amplikon von 150-350 Basenpaaren bilden. Sie wurden von Microsynth (Balgach, Schweiz) synthetisiert. Für die qPCR wurde der SYBR[®] Select Master Mix (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) verwendet und die qPCR wurde anhand des Herstellerprotokolls durchgeführt. Es wurden 5 µl der hergestellten cDNA mit 5 µM der einzelnen Oligonucleotide und 4,5 µl SYBR[®] Select Master Mix gemischt. Auf 384-well Platten fand die Reaktion mithilfe des 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) statt. Die Ergebnisse wurden auf das Referenz-Gen *GAPDH* bezogen um mögliche Pipettierfehler zu vermeiden.

4.5 Proteinbiochemische Methoden

4.5.1 Gewinnung von Proteinlysaten

Adhärente Zellen wurden vor der Lysierung einmal mit eiskaltem DPBS-Puffer gewaschen und anschließend mit 1-fachem DLB-Puffer lysiert. Daraufhin wurde der Zellrasen mittels Zellschaber auf Gummi abgelöst und direkt im *well* lysiert.

Zur Gewinnung von Proteinlysaten aus Organoiden wurde das Medium entfernt und mit DPBS-Puffer gewaschen. Hierfür wurde das Matrigel mittels Pipettenspitze vom Plattenboden entfernt und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Organoidsuspension wurde anschließend bei 300 g bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Nun wurde das Pellet in Corning™ Cell Recovery Solution (Thermo Scientific, Bremen, Deutschland) resuspendiert und 10 min auf Eis stehen gelassen. Danach erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt. Nach Ablauf der 10 min wurde der Überstand wieder verworfen und das Pellet in DLB-Puffer resuspendiert.

Zur Gewinnung der Proteine aus Gewebe wurde dieses mit DLB-Puffer versetzt und anschließend im Tissuelyser II aufgeschlossen.

Die Zellsuspension im DLB-Puffer wurde 5 min bei 95 °C aufgeköcht, 2x jeweils 5 sec im Ultraschall homogenisiert und bei 16.000 g und 4 °C, 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und bei -80 °C eingefroren.

4.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Proteingehalt wurde nach dem Test von Lowry durchgeführt [225]. Es wurde hierfür das *DC* Protein Assay Kit der Firma BioRad (Kalifornien, USA) gemäß Herstellerangaben verwendet. Die Bestimmung beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch Proteine im alkalischen Medium. Die gebildeten Cu^+ -Ionen wiederum reduzieren das gelbe Folin-Ciocalteau Reagenz (Molybdän(VI)- und Wolfram(VI)-Heteropolysäuren) zu Molybdänblau, welches bei 750 nm vermessen wurde. Die Quantifizierung erfolgt mittels Kalibriergerade, zu deren Erstellung eine Rinderserumalbuminlösung mit bekannter Konzentration verwendet wird.

50 Methoden

4.5.3 Western Blot Analyse

4.5.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur weiteren Charakterisierung der Zellysate wurde eine diskontinuierliche denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach der Methode von Laemmli durchgeführt [226]. Dabei wurden die Proteine nach Größe aufgetrennt und anschließend mittels Westernblot untersucht. Nach Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurden die Proben auf 15 µg/10 µl mit DPBS und Ladepuffer verdünnt und bei 95 °C für 5 min vollständig denaturiert. Je nach Größe des gesuchten Proteins, wird der Anteil an Acrylamid variiert. Für die hier genannten Untersuchungen wurden 7,5 %ige, 10 %ige und 15%-ige Acrylamid-Gele verwendet. Nachdem die Protein-Lösungen geladen wurden, fand eine Fokussierung bei 300 V und 15 mA im Sammelgel statt. Anschließend wurden die Proteine im Trenngel bei 300 V und 30 mA getrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden nachfolgend mittels Western Blot Analyse zur Immunodetektion auf eine Trägermembran übertragen.

Trenngel:

% Acrylamid	7,5 %	10%	15 %
Aqua bid.	5 ml	4,15 ml	2,5 ml
Trenngelpuffer (4x)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
(Bis)Acrylamid	2,5 ml	3,35 ml	5 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl
APS	100 µl	100 µl	100 µl

Sammelgel (3% Acrylamid):

Aqua bid.	1,95 ml
Sammelgelpuffer (4x)	0,75 ml
(Bis)Acrylamid	300 µl
TEMED	3 µl
APS	30 µl

4.5.3.2 Western Blot

Für eine Immunodetektion der nach Größe getrennten Proteine wurden die Proteine vom Polyacrylamid-Gel im Halbtrockenenverfahren auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) übertragen. Der Transfer erfolgte in einem Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) bei 25 V für eine Stunde. Dabei wurden mehrere Filterpapiere in Kathodenpuffer,

Anodepuffer 1 und Anodenpuffer 2 getränkt. Die Membran wurde in Methanol aktiviert und für mindestens 5 min in Aqua dest. equilibriert. Die Membran wurde als Sandwich zwischen die Filterpapiere und das Gel wie folgt eingebaut: Kathodenpufferfilter, Gel, Membran, Anodenpufferfilter 1 und zuletzt Anodenpufferfilter 2. Nun wurde das Sandwich zwischen die Graphitplatten der Blottingapparatur gelegt.

Nach dem Transfer wurden die freien Bindestellen der Membran mit 5 % BSA in TTBS-Puffer blockiert. Zur Immunodetektion wurden die, in Kapitel 2.4 angegebenen, Antikörper verwendet. Die Membran wurde mit Primärantikörpern, verdünnt in 5 % BSA, über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran mit TTBS gewaschen und mit Sekundärantikörpern, wie *anti-rabbit*- und *anti-mouse*-Antikörpern in den beschriebenen Konzentrationen für 30 min bei RT inkubiert. Die Sekundärantikörper sind an eine Meerrettich-Peroxidase (*horse radish peroxidase*, HRP) gekoppelt, welche der Detektion dient. Zur Detektion wurde entweder ECL (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) oder ECL plus (Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) verwendet. Es kommt durch die HRP zu einer Chemilumineszenz, die mittels geeigneter Röntgenfilme (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) detektiert werden kann.

Wenn andere Zielproteine mit der gleichen Größe oder β -Aktin zur Ladekontrolle immunologisch erfasst werden sollten, wurde die Membran einem sogenannten *strippen* unterzogen. Dabei wurden die Proteine durch alkalische Denaturierung für 20 min bei 56 °C in *stripping*-Puffer von der Membran entfernt und die Zielproteine durch wiederholte immunologische Detektion, wie oben beschrieben, nachgewiesen.

4.5.4 Enzyme-linked immunoassay (ELISA)

Der ELISA wurde zur Quantifizierung von CXCL1 im Plasma der Maus durchgeführt. Dabei wurde das Mouse CXCL1/KC Duo Set Development kit von R&D Systems (Abingdon, United Kingdom) verwendet und der ELISA nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Proben wurden 1:10 verdünnt. Die Absorption wurde mittels des Mikroplatten-Readers Infinite M200 Pro (Tecan, Männedorf, Switzerland) gemessen.

52 Methoden

4.6 Organotypische Methoden

4.6.1 Gewinnung von Organoiden

Die Isolierung von Krypten zur anschließenden Kultivierung von Organoiden erfolgte nach Protokoll von Sato *et. al.*, welches zusätzlich modifiziert wurde [227]. Hierfür wurde das *Ileum* von C57Bl/6J Mäusen in Stücke (< 5 mm) geschnitten und in 20 ml eiskaltes EDTA-Puffer (10 mM) gegeben. Die Darmstücke wurden 10 min auf Eis stehen gelassen und währenddessen leicht geschüttelt. Dies wurde 3-mal wiederholt. Anschließend wurden die Darmstücke in eiskaltem DPBS-Puffer überführt und 2-mal 30 sec stark geschüttelt. Zwischen dem Schütteln wurden die Stücke 5 min auf Eis gestellt. Danach wurde die Suspension durch ein Zellsieb (100 µm) gegeben. Der Siebdurchgang wurde für weitere Schritte verwendet. Es wurden 5 µl aus dem Siebdurchgang entnommen und die Kryptenzahl unterm Mikroskop bestimmt. Zur Bestimmung des Volumens (x), welches entnommen werden muss um eine ausreichende Anzahl an Krypten für ein optimales Wachstum zu haben, wurde folgende Formel verwendet:

$$x = \frac{w \cdot d \cdot v \cdot 5}{n}$$

n: Anzahl der Krypten in 5 µl

d: gewünschte Dichte der Krypten (10 Krypten/µl Matrigel)

v: Volumen an Matrigel pro well

w: Anzahl an wells

Das errechnete Volumen wurde entnommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 1200 rpm, 4 °C 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Krypten wurden nun in DPBS und Matrigel (1:2) aufgenommen und 100 µl wurden in eine 24-well Platte überführt. Damit sich das Matrigel verfestigt wurde die Platte für 20-25 min in den Brutschrank gestellt. Anschließend wurden 500 µl des IntestiCult™ Organoid Growth Medium Mouse Basal Medium in jedes well gegeben. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt und die Organoide wurden nach sieben Tagen passagiert.

4.6.2 Passagieren der Organoide

Zur Passage der Organoide wurde das Medium entnommen und die Organoide mit DPBS-Puffer gewaschen. Hierfür wurde das Matrigel mittels Pipettenspitze vom Plattenboden entfernt und in 15 ml Zentrifugen-Tubes überführt. Die Tubes wurden bei 300 g 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Organoide mit der doppelten Menge an DPBS-Matrigel-Mischung versetzt, um die doppelte Anzahl an *wells* füllen zu können. Es wurde weiterfahren wie in Kap. 4.6.1 beschrieben.

4.6.3 Einfluss auf Differenzierungs- und Stammzellenmarker

Nach der Passage wurden die Organoide in 24 *well*-Platten überführt. Die zu untersuchenden Substanzen wurden im Medium verdünnt und auf die Organoide, eingebettet in Matrigel, gegeben. Nach 4 Tagen wurde das Medium gewechselt. Das Experiment wurde insgesamt 10 Tag durchgeführt. Danach wurde das Medium entfernt und die Organoide mit 350 µl RTL + 2-Mercaptoethanol versetzt. Dies diente der Isolation der Gesamt-RNA. Weiterhin wurde, wie in Kap. 4.4.1 und 4.4.2 beschrieben, verfahren.

4.7 *In vivo* Studien

4.7.1 Bioverfügbarkeit von Tofacitinib nach rektaler Gabe

4.7.1.1 Tierstudiendesign

Der Versuch wurde mit 15 7-10 Wochen alten Mäusen des Stammes C57BL/6J durchgeführt. Die Mäuse erhielten ein Klistier aus Povidon K90, DPBS und Tofacitinibcitrat oder intraperitoneal eine sterile Lösung aus DPBS und Tofacitinibcitrat. In Vorversuchen wurde ermittelt, dass durch die Applikation von 100 µl des Klistiers das Verbleiben der viskosen Lösung im Kolon gewährleistet ist.

Tabelle 4-3: Einteilung der Gruppen für die Bioverfügbarkeitsstudie mit Tofacitinib

Gruppe	Tiere	Art der Applikation	Dosis
1	5	rektal	30 mg/kg KG
2	5	rektal	30 mg/kg KG
3	5	intraperitoneal	30 mg/kg KG

Nach Applikation des Wirkstoffes wurden die Mäuse, aufgrund der pharmakokinetischen Daten von Tofacitinibcitrat, nach 90 min getötet. Gruppe 2 wurde

54 Methoden

sofort nach der rektalen Gabe getötet. Diese Gruppe diente als Kontrolle des Spülschrittes. Es sollte damit überprüft werden, ob trotz Waschvorgangs keine Reste von Tofacitinibcitrat im Kolon verbleiben um bei der quantitativen Bestimmung keine falschen Ergebnisse zu erhalten. Nach Tötung wurden die Organe und das Blut entnommen. Die Organe wurden gewogen und sofort bei -80 °C eingefroren.

4.7.1.2 Gewinnung und Aufarbeitung von Plasmaproben

Die Gewinnung der Plasmaproben erfolgte durch das Überführen des Blutes in Microvetten, die mit Natrium-EDTA beschichtet sind. Anschließend wurden die Microvetten 5 min bei 2000 g zentrifugiert und der Überstand bei -80 °C eingefroren.

4.7.1.3 Aufarbeitung von Organproben

Die Aufarbeitung erfolgte ausgehend von der Methode von Kotthaus *et al.*, optimiert durch Gudd beschrieben in der Dissertation [228, 229]. Da nur das aufgenommene und nicht gulucuronidierte Tofacitinib nachgewiesen werden sollte, wurde keine Natriumchloridlösung verwendet.

Es wurden Leber, Niere, und Dickdarm bei Raumtemperatur aufgetaut. Je nach Organ wurden 300-400 mg Gewebeproben mit 400 µl *Aqua bidest.* in einem POTTER-ELVEHJEM Homogenisator mit Glaspistill homogenisiert. Anschließend wurde das Glaspistill mit 400 µl *Aqua bidest.* gespült. Nach Zugabe von 1000 µl eiskaltem Acetonitril, zur Präzipitation der Proteine, wurden die Ansätze 10 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend 30 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde 1,5 Tage gefriergetrocknet. Nach vollständigem Einengen der Probe wurde diese in 100 µl eines Gemisches aus Acetonitril mit 0,01 % Trifluoressigsäure in *Aqua bid.* (13/87) gelöst. Die Vermessung der Proben erfolgte mittels der in Kapitel 3.5.4 beschriebenen Methode. Jede Probe wurde einfach aufgearbeitet und zweifach vermessen.

Zur Ermittlung der Wiederfindung wurden Niere, Leber, Dünndarm und Dickdarm aus der Maus verwendet. Etwa 50 mg Gewebeproben wurden jeweils mit 6 verschiedenen Tofacitinibkonzentrationen im Bereich von 0,5-100 µM versetzt. Jede Konzentration wurde doppelt aufgearbeitet und zweimal vermessen. Die erhaltene Menge an Tofacitinib wurde in ng/g angegeben.

4.7.1.4 HPLC-Analytik für Tofacitinib

Methode A

HPLC-Pumpe	Waters 1525 Binary HPLC Pump
Entgaser	Postnova PN 7505
Detektor	Waters W2487 Dual λ Absorbance Detector
Autosampler	Waters W717 plus
Stationäre Phase	VDS Optilab LiChrospher60 RP-select B, 125x4 mm, 5 μ m, (Berlin, Deutschland), Vorsäule Phenomenex Gemini C8 (Torrance, CA, USA)
Mobile Phase	A 0,01% Trifluoressigsäure in Aqua bid. B 0,01% Trifluoressigsäure in Acetonitril
Detektion	UV, 290 nm
Flussrate	1,2 ml/min
Laufzeit	10 min
Temperatur	20 °C
Injektionsvolumen	20 μ l
Retentionszeit	5,2 \pm 0,1 min

4.7.1.5 Herstellung des Klistiers

Zur Herstellung des Klistiers wurde eine abgewogene Menge an Tofacitinibcitrat in DPBS unter ständigem Rühren gelöst. Für die Gewährleistung der Sterilität wurde die Lösung unter der *Laminar air flow* Sicherheitswerkbank steril filtriert. Anschließend wurde die Lösung mit einer 1 ml Spritze, in der das Povidon K90 enthalten war, aufgezogen.

Bei dem Hilfsstoff Povidon K90 handelt es sich um ein Polymer des Vinylpyrrolidons. Der K-Wert gibt die durchschnittliche Molekülmasse des Polymers an. In Lösungen dient es der Viskositätserhöhung, in Tabletten als Bindemittel. Hier wurde zur Viskositätserhöhung 40 % Povidon K 90 verwendet.

4.7.1.6 Herstellung der wirkstoffhaltigen Lösung zur i.p. Injektion

Für die Herstellung einer wirkstoffhaltigen Lösung zur intraperitonealen (i.p.) Injektion in die Maus wurde Tofacitinibcitrat abgewogen und in DPBS unter ständigem Rühren

56 Methoden

gelöst. Die Lösung wurde unter der *Laminar air flow* Sicherheitswerkbank steril filtriert und in Spritzen gefüllt.

4.7.2 *in vivo* Testungen des Prodrug-Prinzips

4.7.2.1 Tierstudiendesign

Der Versuch wurde mit 15 11 Wochen alten Mäusen des Stammes C57BL/6J durchgeführt. Die Mäuse erhielten ein Klistier aus Povidon K90, DPBS und PF-189 oder PF-183 suspendiert in DPBS (s. Kap. 4.7.1.5).

Tabelle 4-4: Tierstudiendesign zur Überprüfung des Prodrug-Prinzips

Gruppe	Tiere	Art der Applikation	Substanz	Konzentration
1	5	rektal	PF-189	30 mg/kg KG
2	5	rektal	PF-183	30 mg/kg KG
3	5	rektal	PBS	-

Nach Applikation des Wirkstoffes wurden die Mäuse nach 90 min getötet. Nach Tötung wurden die Organe und das Blut entnommen. Die Organe wurden gewogen und sofort bei -80 °C eingefroren.

4.7.2.2 Gewinnung und Aufarbeitung von Plasmaproben

Die Gewinnung und Lagerung erfolgte wie in Kap. 4.7.1.2 beschrieben.

4.7.2.3 Aufarbeitung der Organproben

Die Aufarbeitung und Lagerung erfolgte wie in Kap. 4.7.1.3 beschrieben.

Zur Ermittlung der Wiederfindung wurde die Leber aus der Maus verwendet. Etwa 50 mg Gewebeproben wurden jeweils mit 6 verschiedenen Konzentrationen an PF-189/PF-192 und PF-183/PF-185 im Bereich von 0,5-100 µM versetzt. Jede Konzentration wurde doppelt aufgearbeitet und zweimal vermessen. Die erhaltene Menge an PF-189/PF-192 oder PF-183/PF-185 wurde in ng/g angegeben.

4.7.2.4 HPLC-Analytik für PF-189 und PF-192 und Tofacitinib

HPLC-Pumpe	Waters 1525 Binary HPLC Pump
Entgaser	Postnova PN 7505
Detektor	Waters W2487 Dual λ Absorbance Detector
Autosampler	Waters W717 plus
Stationäre Phase	VDS Optilab LiChrospher60 RP-select B, 125x4 mm, 5 μ m, (Berlin, Deutschland), Vorsäule Phenomenex Gemini C8 (Torrance, CA, USA)
Mobile Phase	A 10mM Natriumoctylsulfonat, 20mM Tetramethylammoniumchlorid, pH 3,5 55% (v/v) B Methanol 45 % (v/v)
Detektion	UV, 290 nm
Flussrate	1,0 ml/min
Laufzeit	20 min
Temperatur	20 °C
Injektionsvolumen	10 μ l
Retentionszeit	PF-189: 8,9 \pm 0,03 min PF-192: 10,9 \pm 0,2 min Tofacitinib: 4,5 \pm 0,2 min

58 Methoden

4.7.2.5 HPLC-Analytik für PF-183 und PF-185

HPLC-Pumpe	Waters 1525 Binary HPLC Pump
Entgaser	Postnova PN 7505
Detektor	Waters W2487 Dual λ Absorbance Detector
Autosampler	Waters W717 plus
Stationäre Phase	VDS Optilab LiChrospher60 RP-select B, 125x4 mm, 5 μ m, (Berlin, Deutschland), Vorsäule Phenomenex Gemini C8 (Torrance, CA, USA)
Mobile Phase	A 20 mM Tetramethylammoniumchlorid pH 3,5 70% (v/v) B Acetonitril 30 % (v/v)
Detektion	UV, 250 nm
Flussrate	1,0 ml/min
Laufzeit	15 min
Temperatur	20 °C
Injektionsvolumen	10 μ l
Retentionszeit	PF-183: 6,3 \pm 0,08 min PF-185: 4 \pm 0,07 min

4.8 Behandlung der DSS-Kolitis in der Maus

4.8.1 Tierstudiendesign

Der Versuch wurde mit 57 11 Wochen alten Mäusen des Stammes C57BL/6J durchgeführt. Die Mäuse erhielten jeden Tag über 10 Tage ein Klistier aus Povidon K90, DPBS und Tofacitinib, PF-189 oder PF-183 suspendiert in DPBS (s. Kap. 4.7.1.5). Die Kontrollgruppen 1 und 6 erhielten nur Povidon K90 mit DPBS.

Tabelle 4-5: Einteilung der Gruppen zur Durchführung der DSS-Kolitis in der Maus

Gruppe	Tiere	Tag 0-4	Tag 5-10	Substanz	Konzentration
1	3	Wasser	Wasser	-	-
2	3	Wasser	Wasser	Tofacitinib	30 mg/kg KG
3	4	Wasser	Wasser	PF-189	30 mg/kg KG
4	4	Wasser	Wasser	PF-183	30 mg/kg KG
5	3	Wasser	Wasser	PF-183	0,1 mg/kg KG
6	8	DSS	Wasser	-	-
7	8	DSS	Wasser	Tofacitinib	30 mg/kg KG
8	8	DSS	Wasser	PF-189	30 mg/kg KG
9	8	DSS	Wasser	PF-183	30 mg/kg KG
10	8	DSS	Wasser	PF-183	0,1 mg/kg KG

4.8.2 Induktion einer akuten Kolitis

Zur Induktion einer akuten Kolitis wurde autoklaviertes Leitungswasser mit 2 % DSS als Trinkwasser 5 Tage an Gruppe 6-10 verabreicht. Dann wurde nur noch autoklaviertes Wasser für 5 Tage gegeben. Gruppe 1-5 erhielten über 10 Tage nur autoklaviertes Leitungswasser. Die Mäuse wurden jeden Tag gewogen und beobachtet. Am Ende des Experimentes wurden die Mäuse getötet und die Organe für weitere Untersuchungen entnommen.

4.9 Histologische Färbungen

4.9.1 Aufarbeitung des Gewebes

Murines Gewebe wurde in 10 % (w/v) Formalin für 24h bei 4 °C fixiert. Die Dehydratation des Gewebes erfolgte durch Bäder in Ethanol und Xylol. Das Gewebe wurde in Paraffin eingebettet und 3,5-4,5 µm dicke Stücke mit dem RM2255 Mikrotom (Leica, Wetzlar, Deutschland) zerteilt.

4.9.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Hämatoxylin färbt saure Strukturen, wie den Zellkern mit der DNA oder das raue endoplasmatische Retikulum blau. Eosin dagegen färbt alle acidophilen Strukturen, wie Proteine des Zytoplasmas oder das glatte endoplasmatische Retikulum rot. Somit dient diese Färbung der Unterscheidung von Zellbestandteilen. Die in Paraffin

60 Methoden

eingebetteten, zerteilten Stücke wurden 5 min mit Hämalaun gefärbt und anschließend mit Leitungswasser gespült. Danach wurden die Stücke 2 min mit Eosin G eingefärbt, gespült, durch Veränderung der Ethanolkonzentrationen dehydratisiert und in Roti-Histokitt mounting medium (Roth, Karlsruhe, Germany) gelegt. Die Schnitte wurden mittels des Axio Imager Z1 Mikroskops (ZEISS, Oberkochen, Deutschland) analysiert und mithilfe der Software AxioVision Rel 4.9 (ZEISS, Oberkochen, Deutschland) ausgewertet.

4.9.3 Bestimmung des histologischen Index

Laroui *et al.* beschrieben eine Methode zur Bestimmung der Schwere der DSS-Kolitis mit HE gefärbten Kolonstücken [230]. Die Kolonstücke werden blind auf das Eindringen von Immunzellen, die Zerstörung der Kryptenstruktur und Ulzerationen bewertet (Tabelle 4-6: Histologische Klassifizierung der Schwere einer DSS-Kolitis

Tabelle 4-6: Histologische Klassifizierung der Schwere einer DSS-Kolitis

Punkte	Schweregrad der Entzündung	Kryptenstruktur	Ulzeration
0	geringe Anzahl an Immunzellen in der <i>Lamina propria</i>	intakt	keine
1	erhöhte Anzahl an Granulozyten in der <i>Lamina propria</i>	1/3 der Kryptenstruktur zerstört	1-2 Ulzerationen
2	Erweitertes Eindringen von Immunzellen in die Submukosa	2/3 der Kryptenstruktur zerstört	3-4 Ulzerationen
3	Transmurale Ausbreitung der Immunzellen	komplett zerstört	zusammenwachsende Ulzerationen
4		Veränderung der epithelialen Oberfläche mit Erosionen	
5		komplette Erosion	

4.9.4 Diaminobenzidin (DAB)-Färbung

Diaminobenzidin (DAB) dient als Substrat der Meerrettichperoxidase zur Verstärkung einer antikörpermarkierten Zielstruktur. Diese erscheint dann braun. Hierfür wurden die Stücke rehydratisiert und das Antigen wurde durch 20-minütiges Kochen im Citratpuffer (pH 6,0) freigelegt. Das Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen und die Inaktivierung natürlicher Peroxidasen erfolgte durch die Zugabe von 5 % (v/v) Ziegen-Serum in DPBS und der Behandlung mit einer 3 %-igen Lösung von Wasserstoffperoxid. Die Stücke wurden dann mit einem primären Antikörper inkubiert, dabei richtete sich die Zeit je nach Antikörper. Die DAB-Färbung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers mit dem Vectastain Elite ABC Kit (Vector Labs, Peterborough, United Kingdom).

4.9.5 Tunel-Methode

Die *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* (Tunel)-Methode dient zum Nachweis apoptotischer Zellen. Die Färbung wurde mit dem ApopTag® Plus Peroxidase *in situ* Apoptosis Detection Kit (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Hierfür wird ausgenutzt, dass bei einer Apoptose DNA-Stränge fragmentiert werden und die an den Enden freiwerdenden Hydroxylgruppen mit dem Enzym *terminal deoxynucleotidyl transferase* markiert und mittels der DAB-Färbung sichtbar gemacht werden.

5 Ergebnisse

5.1 Metabolismusstudien zur Abspaltung von Cyanid

In dem vorangegangenen Kap. 1.3.2.2 wurde der Metabolismus von Tofacitinib detailliert beschrieben. Die Abspaltung von Cyanid wurde experimentell bis jetzt jedoch nicht gezeigt. Abbildung 5-1 zeigt einen hypothetischen Mechanismus der Cyanidbildung. Dabei könnte es am α -Kohlenstoff an der Cyanidgruppe zu einer enzymatischen Hydroxylierung durch das CYP450-System kommen und damit zur Bildung eines instabilen Zwischenprodukts in Form eines Cyanhydrins **2**, welches zum stabilen Aldehyd **3** und Cyanid zerfällt. Der Aldehyd wird durch die Aldehyd-Dehydrogenase zur Carbonsäure **4** oxidiert. Bei Metabolismusstudien konnte die Carbonsäure mittels LC/MS (*liquid chromatography-mass spectroscopy*) identifiziert werden, jedoch wird die Bildung von Cyanid dabei nicht diskutiert [195]. Im folgenden Kapitel soll nun überprüft werden, ob eine Bildung von Cyanid-Ionen durch das CYP450-Enzymsystem erfolgt und wenn ja, ob die gebildete Menge ausreichend ist, um für Nebenwirkungen verantwortlich zu sein oder sogar eine Cyanidvergiftung hervorzurufen.

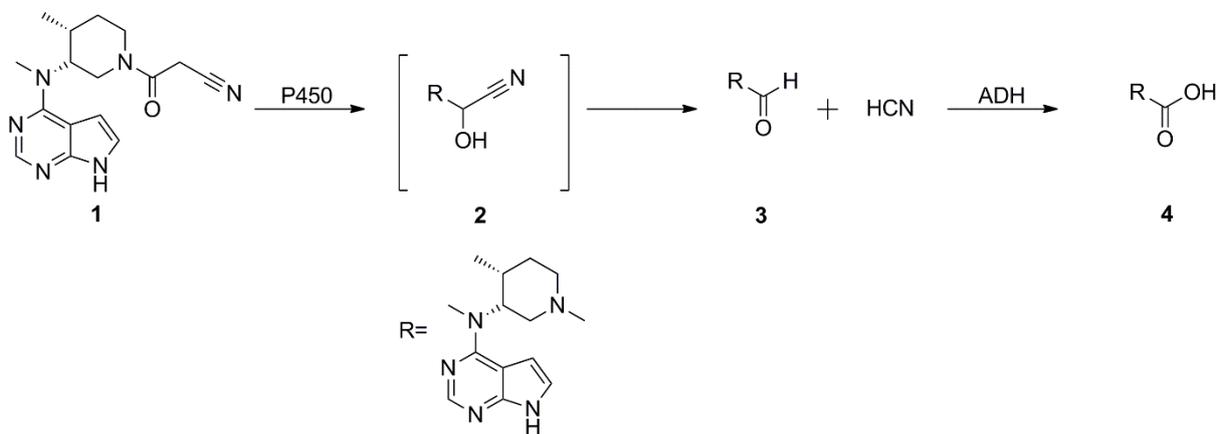


Abbildung 5-1: Potentieller Mechanismus der Bildung von Cyanid aus Tofacitinib

Das α -Kohlenstoffatom des Tofacitinibs **1** wird durch CYP450 hydroxyliert und es bildet sich das instabile Cyanhydrin **2**, welches zum Aldehyd **3** und Cyanid zerfällt. Der Aldehyd wird anschließend durch die Aldehyd-Dehydrogenase zur Carbonsäure **4** oxidiert.

5.1.1 Charakterisierung der mikrosomalen Fraktionen aus Schweine- und Menschenleber

Für den Beleg des hypothetischen Reaktionsmechanismus und einer Beteiligung von CYP450-Enzymen wurden Lebermikrosomen mit porcinem und humanen Ursprung

gewählt, worin die Enzyme lokalisiert sind. Um die Aktivitäten zu berechnen, musste vorher der Gehalt an CYP450 in den Proben bestimmt werden. Dies erfolgte wie in Kap. 4.1.3 beschrieben. Der Cytochrom P450-Gehalt der verwendeten porcinen Lebermikrosomen betrug 20767,8 pmol/ml während der Gehalt der humanen Lebermikrosomen bei 15162 pmol/ml lag. In jedem Inkubationsansatz betrug der Gehalt nur noch 2076,8 pmol/ml und 1516,2 pmol/ml.

5.1.2 Kalibrierung und Wiederfindung

Die Kalibriergerade wurde in einem Konzentrationsbereich von 2-20 μM erstellt (Abbildung 5-2). Dabei war sie linear ($R^2=0,9908$) und die Richtigkeit in diesem Bereich betrug $93 \pm 10,4 \%$. Die Richtigkeit an der Bestimmungsgrenze von 2 μM betrug 96 %. Mithilfe der Kalibriergerade wurde eine Wiederfindung in Inkubationsansätzen mit porcinen sowie humanen Lebermikrosomen ermittelt. Die Wiederfindung wurde bei beiden Proben in demselben Konzentrationsbereich bestimmt. Dabei betrug die Wiederfindung der porcinen Lebermikrosomen $78 \pm 17,8 \%$ mit einer Linearität von $R^2=0,9729$. Die Wiederfindung der humanen Lebermikrosomen wies eine Linearität von $R^2=0,9925$ auf und lag bei $53 \pm 11,0 \%$.

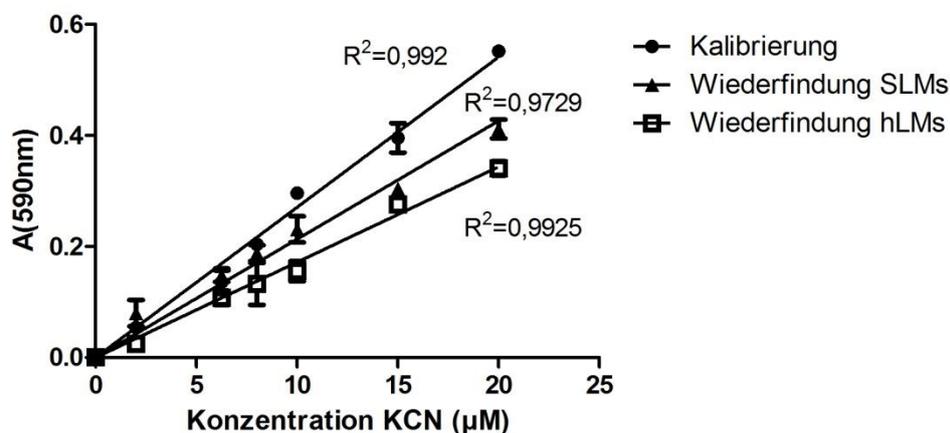


Abbildung 5-2: Kalibrierung und Wiederfindung von Kaliumcyanid

Die Kalibrierung und Wiederfindung erfolgte mit Kaliumcyanid als Standardsubstanz in einem Bereich von 2-20 μM . Als Proteinquelle dienten porcine (SLM) und humane (hLM) Lebermikrosomen. Die angegebenen Konzentrationen sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen zweier Inkubationsansätze mit $n=3$ pro Konzentration.

5.1.3 *in vitro* Biotransformation von Tofacitinib

5.1.3.1 Bestimmung der Cyanidmenge nach Inkubation

Zu Beginn sollte zunächst die Frage geklärt werden, ob Cyanid nach der Inkubation mit Tofacitinibcitrat freigesetzt wird. Hierfür wurde die Inkubation mit einem Ansatz, wie

64 Ergebnisse

in Kap. 4.1.4 beschrieben, durchgeführt. Als Enzymquellen dienten humane und porcine Lebermikrosomen. Die Inkubationen wurden nach 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 und 30 min abgestoppt und die entstandene Menge an Cyanid bestimmt. Kontrollen wurden bei allen Inkubationsansätzen durchgeführt. Als Kontrolle der Reaktion wurden folgende Inkubationsansätze gewählt:

- ohne Tofacitinibcitrat, um eine basale Konzentration von Cyanid zu bestimmen
- ohne NADPH, um der Reaktion den Cofaktor zu entziehen und zu bestimmen, ob die Bildung NADPH abhängig ist.
- ohne Protein, um zu verifizieren, dass die Bildung enzymabhängig abläuft.

Sowohl bei der Inkubation mit porcinen, als auch humanen Lebermikrosomen war die Umsetzung gering, mit humanen Lebermikrosomen lag sie sogar an der Bestimmungsgrenze (Abbildung 5-3 B). Je länger die Inkubationen durchgeführt wurden, desto mehr Cyanid konnte bestimmt werden. Um die gebildete Menge durch porcine und humane Proben vergleichen zu können, wurde die quantifizierte Menge an Cyanid auf den CYP450-Gehalt normalisiert. Die Umsetzungsrate von Cyanid war nach 10 min mit porcinen Mikrosomen am höchsten (Abbildung 5-3). Die Konzentration an Cyanid betrug $40 \pm 5,3$ pmol CN / pmol CYP bei einer Bestimmungsgrenze von 0,96 pmol / pmol CYP. Die Bildung von Cyanid mit humanen Mikrosomen erreichte nach 8 min das Maximum (Abbildung 5-3 B). Hier lag die Konzentration bei $23 \pm 2,4$ pmol CN / pmol CYP bei einer Bestimmungsgrenze von 1,3 pmol / pmol CYP. Die Aktivität der Umsetzung an Cyanid nahm bei beiden Reaktionen nach 10 min ab und erreichte kein Plateau, was die Sättigung des Enzymsystems darstellen würde. Um diesen Sachverhalt zu erklären, wurde Cyanid unter den gewählten Inkubationsbedingungen in Tris-HCl-Puffer und in Wasser inkubiert (Abbildung 5-3 C). Hier nahm die Konzentration an eingesetztem Cyanid nach 15 min ab. Somit verdampft im Gleichgewicht gebildete Blausäure bei längerer Erwärmung, weshalb auch die Konzentrationen an Cyanid nach Inkubationen mit Lebermikrosomen abgenommen hatten. Bei den Kontrollen ohne Tofacitinib, ohne Proteine oder ohne NADPH konnte kein Cyanid bestimmt werden. Somit können P450-Enzyme für die Bildung von Cyanid verantwortlich sein. Eine deutlich niedrige Menge an Cyanid

wurde nach Inkubation mit den humanen Lebermikrosomen beobachtet. Ein Grund hierfür könnte der Ursprung der humanen Leberprobe sein. Diese stammt aus einer Biopsie eines Patienten mit eingeschränkter Leberfunktion und Enzymaktivität.

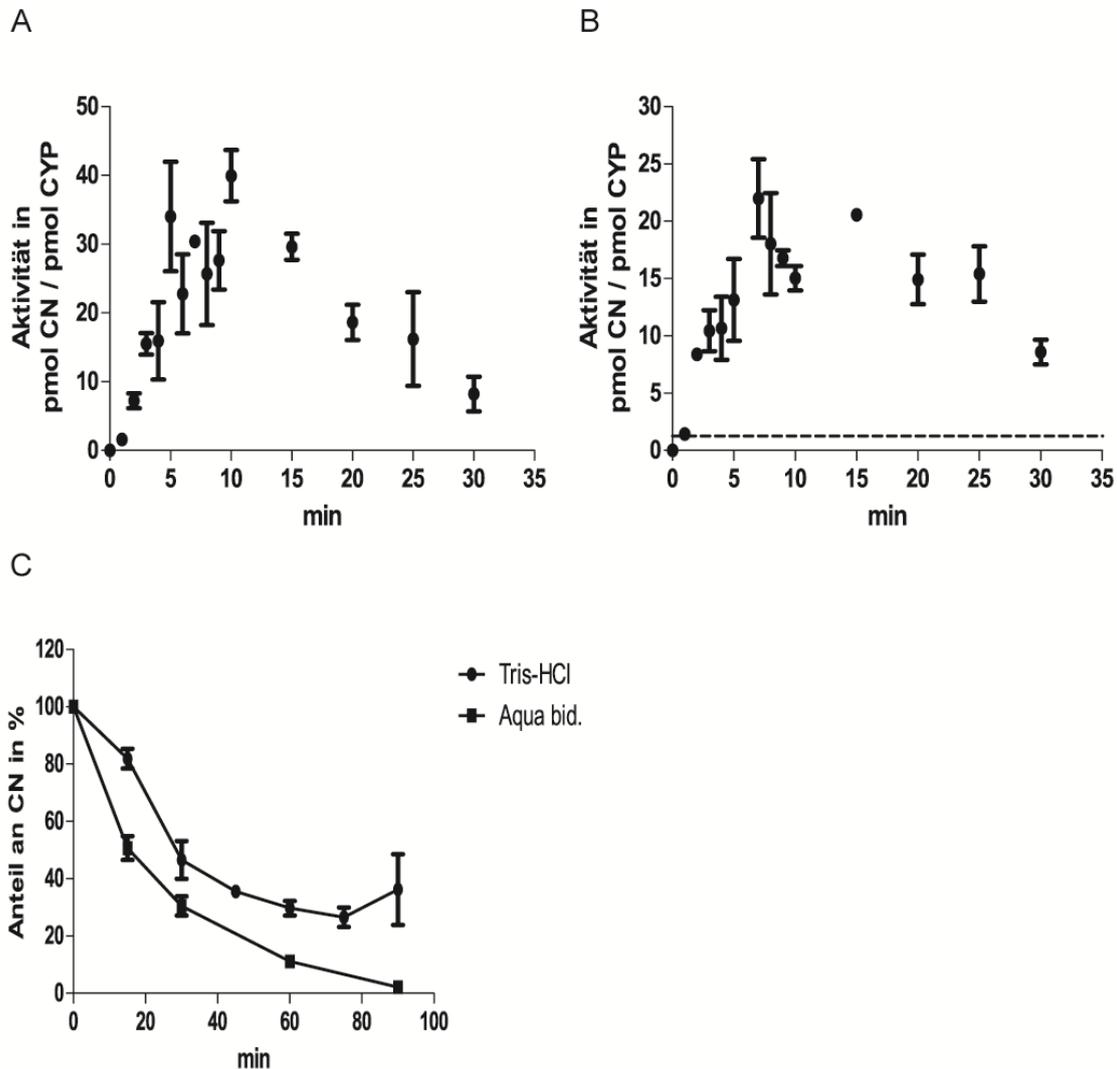


Abbildung 5-3: Bildung von Cyanid nach Inkubation mit Tofacitinib

A, B: Ein Inkubationsansatz enthielt 1,5 mM Tofacitinibcitrat, 1 mM NADPH in 10 mM Tris-HCl pH 7.4. A: Der spezifische Gehalt von CYP450 betrug bei Inkubationsansätzen mit porcinen Lebermikrosomen 2076,78 pmol/ml B: Der spezifische Gehalt von CYP450 betrug bei Inkubationsansätzen mit humanen Lebermikrosomen 1516,2 pmol/ml. C: Die Inkubation mit 20 µM Kaliumcyanid als Standardsubstanz wurde bei 37 °C für 15, 30, 45, 60, 75 und 90 min durchgeführt. Nach Abstoppen der Reaktion mit 150 µl eiskaltem Methanol wurden 100 µl des Überstandes entnommen und zur Bestimmung von Cyanid verwendet. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichungen zweier unabhängig voneinander durchgeführten Inkubationsansätze mit n= 3 pro Zeitpunkt.

5.1.3.2 Einfluss der Substratkonzentration auf die Bildung von Cyanid

Um den Einfluss der Substratkonzentration bei der Bildung von Cyanid zu bestimmen, wurde zunächst ein linearer Bereich der Umsetzung ermittelt. Der Einfluss der

66 Ergebnisse

unterschiedlichen Substratkonzentration ist für die Arzneimitteltherapie relevant, da bei höherer Gabe von Tofacitinib mehr Cyanid gebildet werden könnte.

Eine Linearität der Umsetzung aus Kap. 5.1.3.1 konnte in einem Zeitbereich von 1-7 min festgestellt werden (Abbildung 5-4 A: porcine, B: human). Somit wurden die Inkubationen nach 7 min abgestoppt. Eine Verlängerung der Inkubationszeit durch Verringerung der Enzymkonzentration war nicht möglich, da wie schon in Kap. 5.1.3.1 beschrieben, die Umsetzung zu Cyanid nach längerer Inkubation abnahm. Somit wurden die Inkubationsansätze mit unterschiedlichen Konzentrationen an Tofacitinibcitrat durchgeführt. Die Konzentrationen betragen 0, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 und 1500 μM (Abbildung 5-4 C).

Bei der Umsetzung mit porcinen Lebermikrosomen war eine Bildung von Cyanid ab einer Substratkonzentration von 50 μM zu beobachten. Die Umsetzungsraten erhöhen sich bei höheren Substratkonzentrationen.

Die Umsetzungsrate humaner Lebermikrosomen war signifikant geringer als die der porcinen. Erst ab einer Substratkonzentration von 500 μM wurde ein deutlicher Anstieg der Umsetzungsrate beobachtet. Die Umsetzungsrate war zwischen den drei höchsten Konzentrationen (500, 1000, 1500 μM) sowohl nach Inkubation mit porcinen als auch humanen Enzymen jedoch nicht signifikant unterschiedlich.

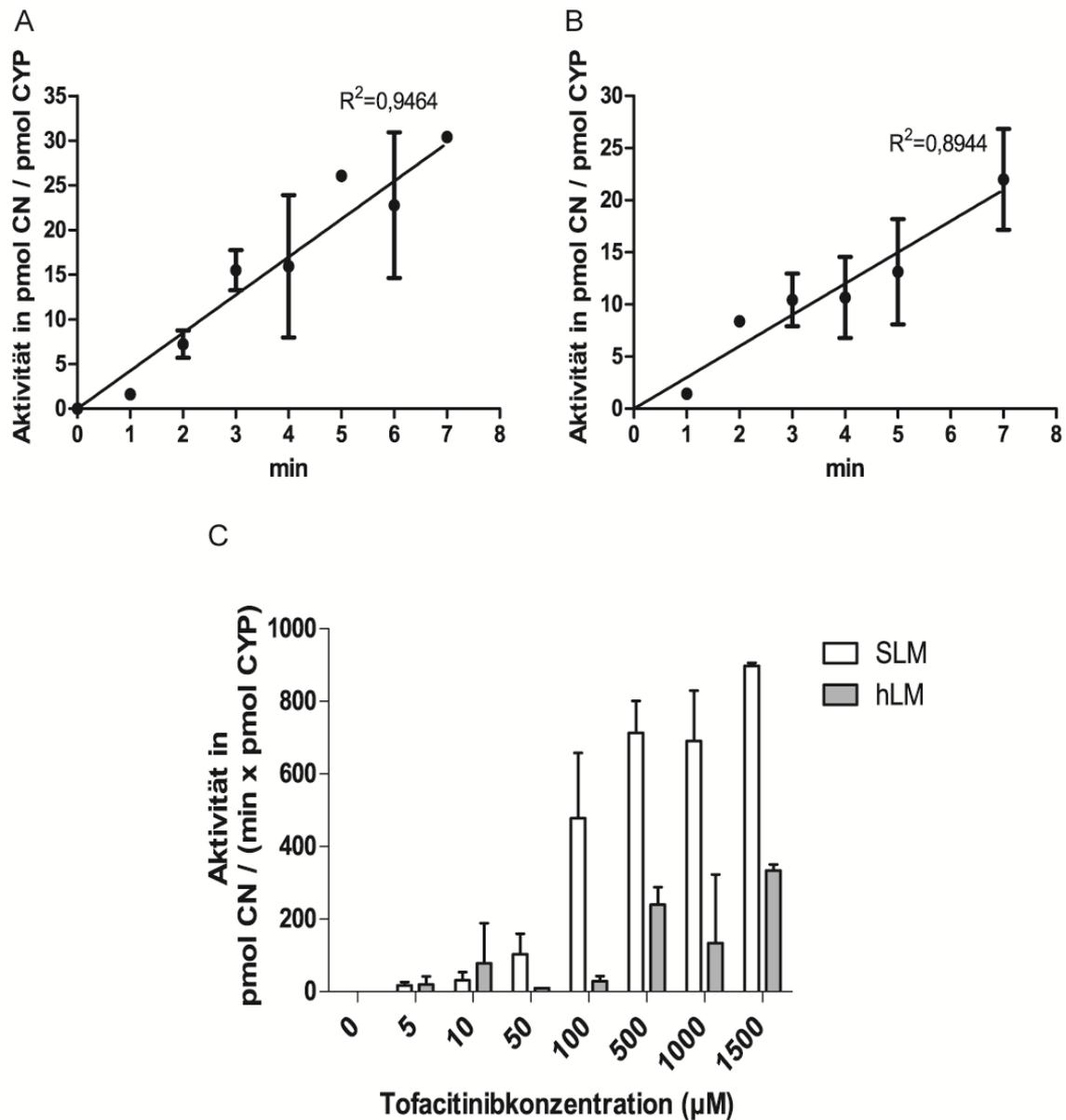


Abbildung 5-4: Einfluss der Substratkonzentration von Tofacitinib auf die Umsetzungsrate zu Cyanid

Die Linearität wurde aus den vorherigen Inkubationen mit Tofacitinib abhängig von der Zeit ermittelt (A: porcine, B: human). Zur Bestimmung der Substratabhängigkeit enthielt ein Inkubationsansatz 0, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 oder 1500 μM Tofacitinibcitrat, 1 mM NADPH in 10 mM Tris-HCl pH 7.4 (C). Der spezifische Gehalt von CYP450 betrug bei Inkubationsansätzen mit porcinen Lebermikrosomen 2076,78 pmol/ml und bei Ansätzen mit humanen Lebermikrosomen 1516,2 pmol/ml. Nach 7 min wurde die Reaktion mit 150 μl eiskaltem Methanol abgestoppt und 100 μl des Überstandes wurden zur Bestimmung von Cyanid verwendet. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen zweier unabhängig voneinander durchgeführten Inkubationsansätze mit $n=3$ pro Konzentration.

68 Ergebnisse

5.1.3.3 Inhibitionsstudien mit Ketoconazol

Im folgenden Experiment sollte zusätzlich bestätigt werden, dass die Abspaltung von Cyanid abhängig vom CYP450-Enzymsystem ist und dass diese Abspaltung durch Einsatz eines Inhibitors gehemmt werden kann. Hierfür wurde Ketoconazol als unspezifischer Inhibitor des CYP450-Systems verwendet. Dabei wurden Konzentrationen von 5-1500 μM des Inhibitors eingesetzt. Bei der Inkubation mit Schweinelebermikrosomen kam es bei einer Konzentration von 100 μM Ketoconazol zu einer signifikanten Inhibition der Cyanidbildung (Abbildung 5-5 A). Ab einer Konzentration von 1 mM Ketoconazol war die Bildung von Cyanid vollständig gehemmt. Im Inkubationsansatz mit humanen Lebermikrosomen war erst ab einer Konzentration von 500 μM eine signifikante Hemmung der Abspaltung von Cyanid nachzuweisen (Abbildung 5-5 B). Geringere Konzentrationen an Ketoconazol inhibierten das CYP450-Enzymsystem nicht ausreichend, da die gebildete Menge an Cyanid der Konzentration ohne Inhibitor entsprach.. Erst bei hohen Konzentrationen kam es zur vollständigen Inhibition. Die Bildung von Cyanid verläuft somit enzymatisch und bei den verantwortlichen Enzymen handelt es sich um P450.

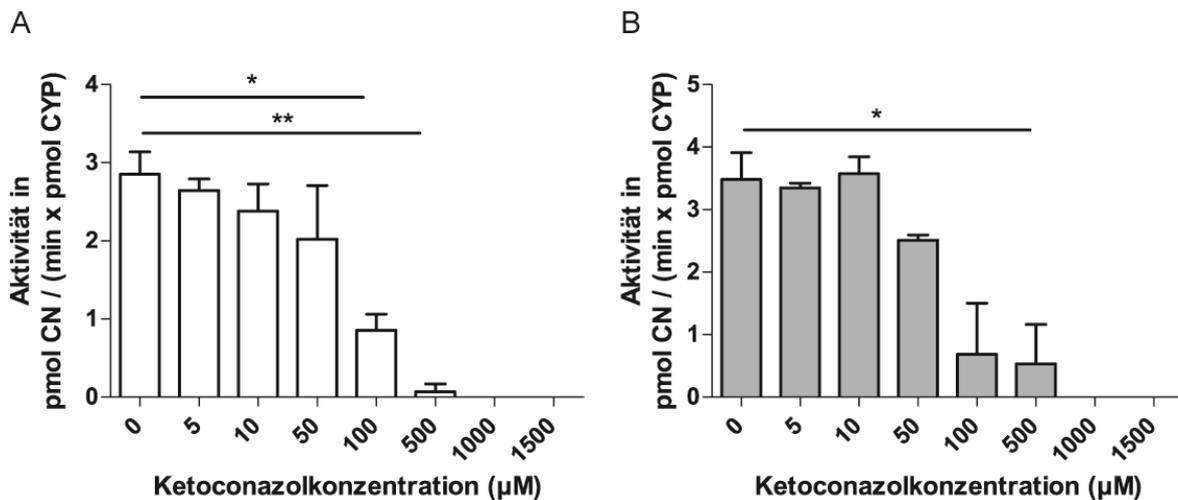


Abbildung 5-5: Inhibition der Cyanidabspaltung durch Ketoconazol

Ein Inkubationsansatz enthielt 1,5 mM Tofacitinibcitrat, 1 mM NADPH in 10 mM Tris-HCl pH 7.4 und 0, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 oder 1500 μM an Ketoconazol gelöst in DMSO. A: Der spezifische Gehalt von CYP450 betrug bei Inkubationsansätzen mit porcinen Lebermikrosomen 2076,78 pmol/ml B: Bei Ansätzen mit humanen Lebermikrosomen betrug der spezifische Gehalt an CYP450 1516,2 pmol. Nach 7 min wurde die Reaktion mit 150 μl eiskaltem Methanol abgestoppt und 100 μl des Überstandes wurden zur Bestimmung von Cyanid verwendet. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen zweier unabhängig voneinander durchgeführten Inkubationsansätze mit $n=3$ pro Konzentration. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$.

5.1.3.4 Inkubationen mit rekombinanten CYP450-Isoenzymen

Nicht nur die Bildung von Cyanid ist relevant, sondern auch die Frage, welches Isoenzym des CYP450-Enzymsystems an der Bildung von Cyanid beteiligt ist. Deshalb wurden die gleichen Inkubationsansätze, wie in Kap. 5.1.3.1 beschrieben mit rekombinanten Isoenzymen durchgeführt (Abbildung 5-6). CYP3A4 zeigte die höchste Umsatzrate von $33 \pm 10,2 \text{ pmol CN} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{pmol CYP}^{-1}$. CYP2D6 wies eine Umsatzrate von $13 \pm 3,5 \text{ pmol CN} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{pmol CYP}^{-1}$ auf und CYP2C9 eine Umsatzrate von $5 \pm 1 \text{ pmol CN} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{pmol CYP}^{-1}$. Bei den anderen eingesetzten Isoenzymen befand sich die Umsatzrate unterhalb der Nachweisgrenze. CYP3A4 war hauptsächlich an der Bildung von Cyanid beteiligt. CYP2C9 spaltete nur wenig Cyanid ab. Die Menge befand sich nahe der Nachweisgrenze.

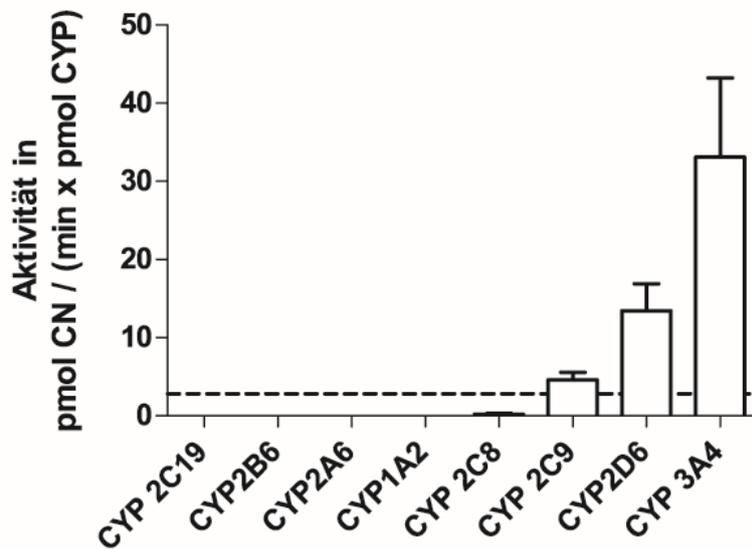


Abbildung 5-6 Bestimmung des beteiligten Isoenzymen an der Abspaltung von Cyanid

Ein Inkubationsansatz enthielt 1,5 mM Tofacitinibcitrat, 1 mM NADPH in 10 mM Tris-HCl pH 7.4. Der spezifische Gehalt der Isoenzyme betrug 100000 pmol/ml. Nach 7 min wurde die Reaktion mit 150 µl eiskaltem Methanol abgestoppt und 100 µl des Überstandes wurden zur Bestimmung von Cyanid verwendet. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichungen zweier unabhängig voneinander durchgeführten Inkubationsansätze mit n= 2 pro Konzentration.

5.1.4 *in vitro* Biotransformation von Tofacitinib-Derivaten

Eine Voraussetzung für den Ablauf der enzymatischen Abspaltung von Cyanid ist das Vorliegen eines α -Wasserstoffatoms am Kohlenstoff, der die Nitrilgruppe trägt. Um den hypothetischen Mechanismus zu verifizieren, wurde deshalb PF-069 mit porcinen und humanen Lebermikrosomen inkubiert. PF-069 weist ein Dipyrrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridin-Grundgerüst auf und das α -Wasserstoffatom wurde zusätzlich durch ein Cyclopropyl-Rest ersetzt. Das Fehlen eines α -Wasserstoffatoms verhinderte im humanen und im porcinen System die Bildung von Cyanid (Abbildung 5-7), da diese mechanistisch nicht mehr möglich ist. Zusätzlich wurde PF-068 inkubiert. Dieses besitzt das gleiche Grundgerüst wie PF-069, jedoch weist es ein α -Wasserstoffatom auf. Die Veränderung des Grundgerüsts bewirkte ebenfalls eine Veränderung in der

70 Ergebnisse

Cyanidbildung. Die Umsatzrate der SLMs lag bei $4 \pm 1,2 \text{ pmol CN} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{pmol CYP}^{-1}$ (Tofacitinib) und bei $2 \pm 0,2 \text{ pmol CN} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{pmol CYP}^{-1}$ für das PF-068. Die Inkubation mit hLMs verlief gleich. Die Änderung des Grundgerüsts führte zu einer Abnahme der Umsatzrate von $3 \pm 0,5 \text{ pmol CN} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{pmol CYP}^{-1}$ (Tofacitinib) auf $1 \pm 1 \text{ pmol CN} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{pmol CYP}^{-1}$ (PF-068).

Eine Änderung des Grundgerüsts führte in diesem Fall zu einer Verringerung der Cyanidbildung. Eine Blockade der Position des α -Wasserstoffatoms verhinderte erwartungsgemäß die Entstehung von Cyanid.

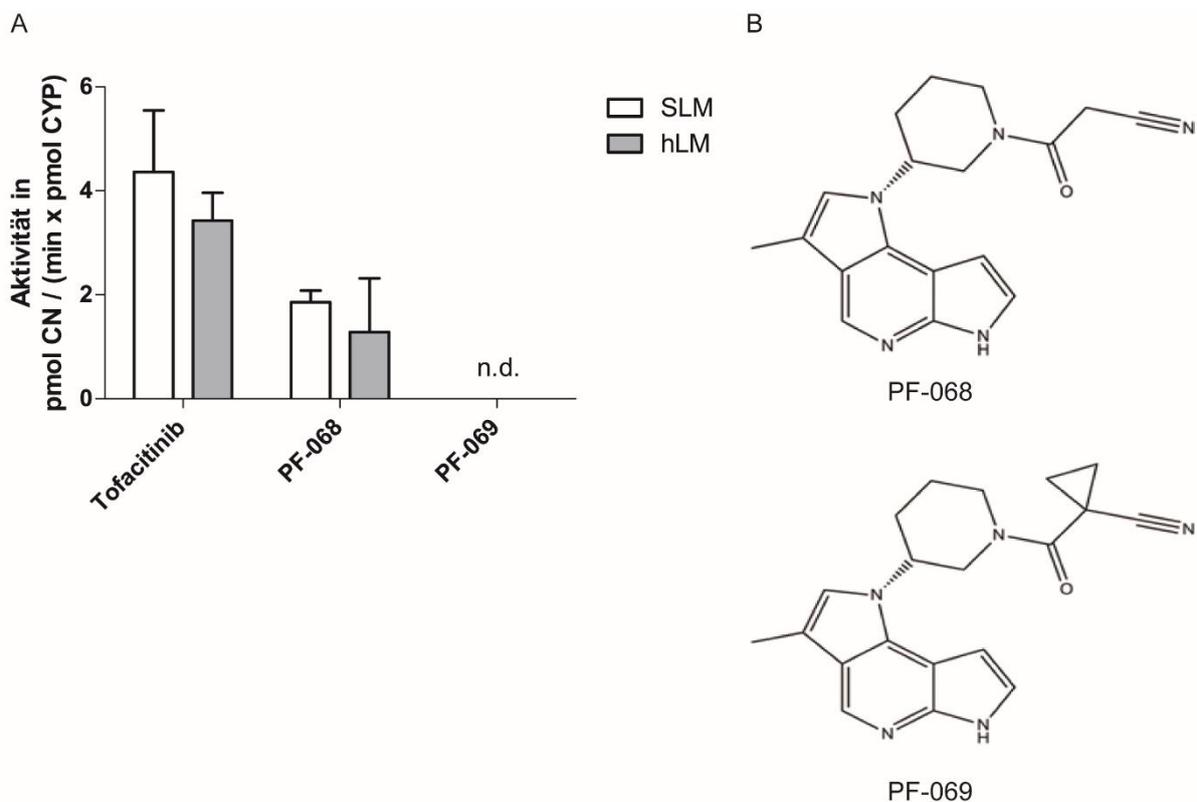


Abbildung 5-7: Abspaltung von Cyanid bei Tofacitinib-Derivaten

A: Ein Inkubationsansatz enthielt 1,5 mM Tofacitinibcitrat, 1,5 mM PF-068 oder PF-069, 1 mM NADPH in 10 mM Tris-HCl pH 7.4. Der spezifische Gehalt von CYP450 betrug bei Inkubationsansätzen mit porcinen Lebermikrosomen 2076,78 pmol/ml und bei Ansätzen mit humanen Lebermikrosomen 1516,2 pmol/ml. Nach 7 min wurde die Reaktion mit 150 μl eiskaltem Methanol abgestoppt und 100 μl des Überstandes wurden zur Bestimmung von Cyanid verwendet. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen zweier unabhängig voneinander durchgeführten Inkubationsansätze mit $n=3$ pro Konzentration. B: Strukturformeln der Tofacitinib-Derivate.

5.2 *In vitro* Untersuchungen von Tofacitinib, PF-189 und PF-183

5.2.1 Charakterisierung von Tofacitinib, PF-189 und PF-183

5.2.1.1 Expression von JAK und STAT-Proteinen

Für die nachfolgenden *in vitro* Untersuchungen und zur Bestimmung der Wirkungsweise von Tofacitinib in einem intestinalen Zellmodell wurden die drei humanen kolorektalen Adenokarzinomzelllinien HT-29, Caco-2 und SW480 zunächst auf ihre Proteinexpression hinsichtlich der für die Wirkung von Tofacitinib relevanten Signalmoleküle untersucht. Hierbei wurde als erstes die Expression von JAK-Proteinen ermittelt (Abbildung 5-8).

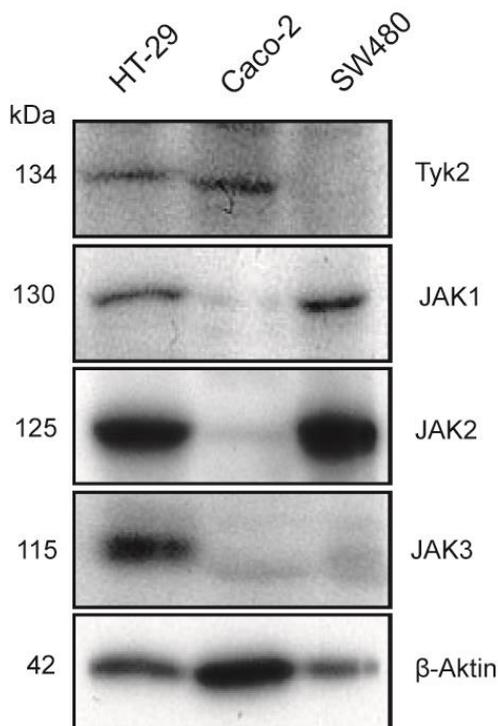


Abbildung 5-8: Expression von JAK-Proteinen in HT-29, Caco-2 und SW480

HT-29, Caco-2 und SW480 Zellen wurden jeweils im geeigneten Medium ausgesät. Aus den Zellen wurden Proteinlysate gewonnen. Proteinlevel wurden mittels Western Blot Analyse bestimmt. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung dient β -Aktin.

In der HT-29 Zelllinie wurden alle JAK-Proteine exprimiert, wobei JAK2 am stärksten exprimiert vorlag, dann JAK3, JAK1 und Tyk2. In Caco-2 Zellen wurde nur Tyk2 exprimiert, während in den SW480 Zellen JAK2 und JAK1 zu finden waren. Hier wurde ebenfalls JAK2 stärker exprimiert. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden für alle weiteren *in vitro* Untersuchungen HT-29 Zellen verwendet.

5.2.1.2 Stabilität der Amidoxim-Prodrugs

Untersuchungen zur Stabilität bei physiologischen pH-Werten von Tofacitinib, PF-189 und PF-183 wurden, wie in Kap. 4.2 beschrieben, durchgeführt (Abbildung 5-9).

72 Ergebnisse

Über die gesamte Versuchsdauer nahm die Konzentration an Tofacitinib bei pH 7 und 9 nicht ab, jedoch war es instabil bei pH 2. Die Konzentration von PF-189 blieb bei allen pH-Werten während der ersten drei Stunden gleich. Erst nach 24 h war eine deutliche Abnahme der Konzentration bei allen pH-Werten zu sehen. Die Konzentration von PF-183 konnte bei pH 7 und 9 nicht bestimmt werden, da die Substanz bei diesen pH-Werten schwer löslich war und während der Messung keine homogene Verteilung des Feststoffes möglich war. Jedoch war sie während der kompletten Versuchsdauer bei pH 2 stabil.

Tofacitinib eignet sich optimal für die Arbeit bei allen drei pH-Werten über längere Zeiträume. Die Instabilität von PF-189 ermöglicht nur Inkubationen innerhalb von 3 h. Trotzdem wurden auch Inkubationen über längere Zeiträume mit Zellen durchgeführt. PF-183 zeigte zwar eine Sedimentation bei pH 7 und 9 im Kaliumhydrogenphosphat-Puffer, jedoch ließ es sich optimal im jeweiligen Zellmedium lösen, wodurch Versuche im Zellmodell möglich waren.

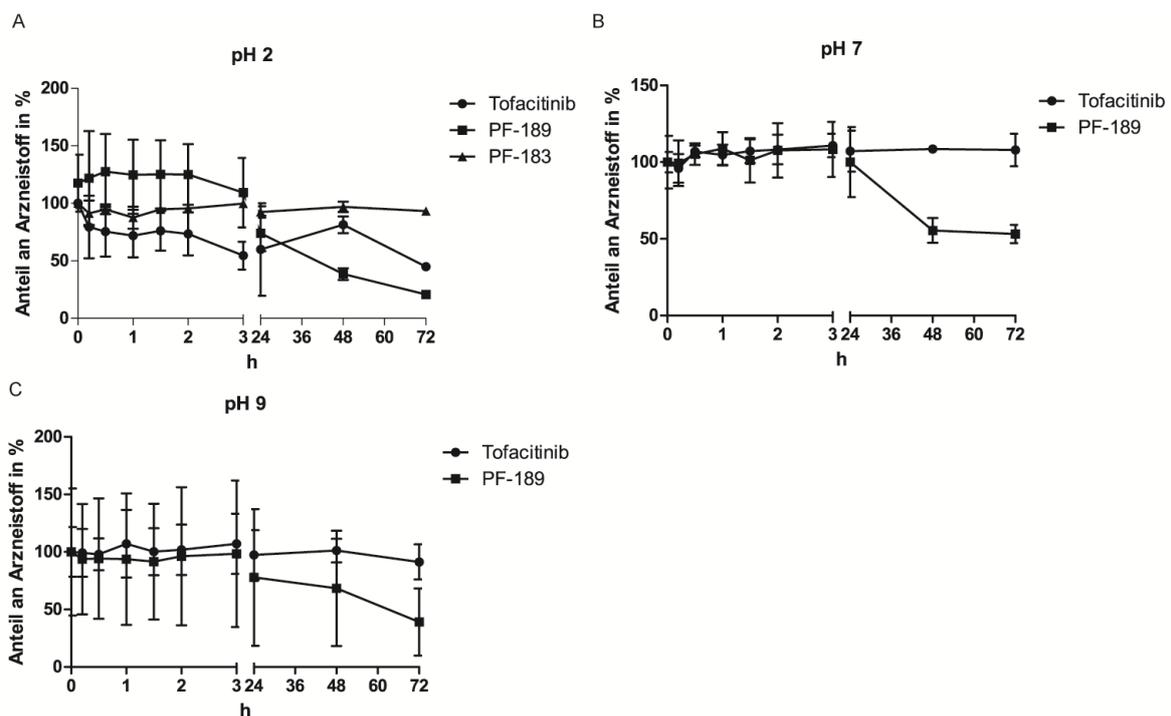


Abbildung 5-9: Stabilität der Amidoxim-Prodrugs im Vergleich zu Tofacitinib

Tofacitinib wurde in DPBS, PF-189 und PF-183 wurden in DMSO zu einer 10 mM Lösung gelöst. Anschließend wurden die Lösungen auf 50 μ M in Kaliumhydrogenphosphat-Puffer pH 2, 7 und 9 verdünnt. Die Proben wurden im Thermoblock bei 37 °C für 10 und 30 min und 1, 2, 3, 24, 48 und 72 h inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Proben auf 25 μ M mit Kaliumhydrogenphosphat-Puffer pH 7,4 verdünnt. Die Proben wurden mittels HPLC-Analytik vermessen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit n=3 pro Konzentration.

5.2.1.3 Überprüfung der Toxizität von Tofacitinib, PF-189 und PF-183

Da es noch keine toxikologischen Studien zu PF-189 und PF-183 gab, wurde einerseits die Zellviabilität als auch die Induktion der Apoptose durch die Amidoxim-Prodrugs bestimmt. Beide Untersuchungen dienen der Ermittlung der optimalen Konzentration, die für weitere Experimente verwendet werden soll. Hierfür wurden HT-29-Zellen für 24, 48 und 72 h mit den jeweiligen Substanzen in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Nach Ablauf der Zeit wurde die Zellviabilität mittels MTS-Assay (s. Kap. 4.3.2) ermittelt (Abbildung 5-10). Bereits nach 24 h war eine stark verminderte Zellviabilität bei der Behandlung mit 500 μ M PF-189 (31 ± 9 %), und PF-183 ($17 \pm 24,7$ %) zu sehen, während Tofacitinib den Anteil an lebenden Zellen nur gering beeinflusste ($89 \pm 26,7$ %) (Abbildung 5-10 A). Nach 48 h konnte ein ähnlicher Effekt der drei Verbindungen auf die Zellviabilität beobachtet werden (Abbildung 5-10 B). Während Tofacitinib die Zellviabilität nur um 19% senkte, bewirkte die Behandlung mit PF-189 eine Abnahme um 69 % und mit PF-183 um 57%. Nach 72 h beeinträchtigten alle drei Substanzen die Viabilität der Zellen, wobei PF-189 ($28 \pm 20,3$ %) und PF-183 ($16 \pm 12,5$ %) ein höheres toxisches Potential auf HT-29 Zellen aufwiesen als Tofacitinib (58 ± 17 %) (Abbildung 5-10 C).

74 Ergebnisse

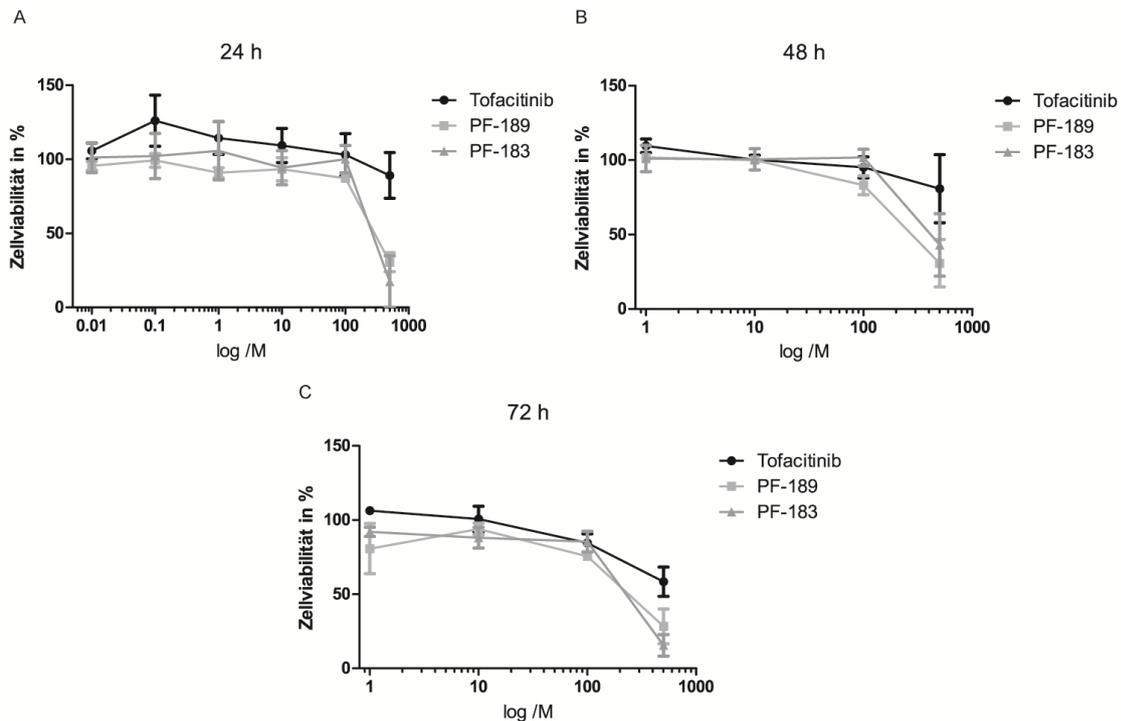


Abbildung 5-10: Messung der Zellviabilität von HT-29-Zellen nach Behandlung mit Tofacitinib, PF-189 und PF-183. HT-29 Zellen wurden mit 0,1, 1, 10 100 und 500 μM Tofacitinib, PF-189 und PF-183 für 24, 48 oder 72 h behandelt und die Zellviabilität mittels MTS-Assay bestimmt. Die Grafiken repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimente mit jeweils $n=5$.

Des Weiteren wurde die Induktion der Apoptose in HT-29 Zellen durch die einzelnen Substanzen bestimmt. Hierfür wurden HT-29 Zellen mit 1, 10 und 100 μM der jeweiligen Verbindungen für 24, 48 und 72 h behandelt (Abbildung 5-11). Als Positivkontrolle diente die Behandlung mit 100 μM Etoposid. Es wird als Zytostatikum in der Arzneimitteltherapie verwendet und hemmt die Topoisomerase II, wodurch es Apoptose in den Zellen induziert [231]. Als Negativkontrolle wurden die Zellen nur im Medium für die jeweiligen Zeitpunkte inkubiert. Die Bestimmung der Apoptose wurde anschließend, wie in Kap. 4.3.3 beschrieben, durchgeführt.

Nach 24 h konnte bei den Konzentrationen 1 und 10 μM aller drei Substanzen kein Unterschied zur Negativkontrolle beobachtet werden (Abbildung 5-11 A). Hingegen wies die Behandlung mit 100 μM PF-183 einen signifikant erhöhten Anteil an toten Zellen ($28 \pm 5,3 \%$) auf, wobei es sich hauptsächlich um nekrotische Zellen handelte. Bei einer andauernden Stimulation über 48 h mit PF-183 konnte jedoch kein weiterer Anstieg der Anzahl nekrotischer Zellen ($26 \pm 5,3 \%$) festgestellt werden (Abbildung 5-11 B). Auch die Behandlung mit den anderen beiden Substanzen beeinflusste die

Apoptose nicht. Die Behandlung mit Etoposid führte nach 48 h Inkubation zu einem starken Anstieg apoptotischer Zellen ($57 \pm 7,8 \%$), dabei befanden sich die Zellen in der späten Apoptose (Abbildung 5-11 B). In diesem Stadium konnten sie AnnexinV binden und ihre Membran war ebenfalls durchlässig für Propidiumiodid (Abbildung 5-12 B). Dies wurde deutlich durch die Zellpopulation rechts oben im Histogramm. Nach 72 h Behandlung mit Tofacitinib stieg auch hier der Anteil nekrotischer Zellen, im Vergleich zu PF-189. Der Anteil toter Zellen nach Inkubation mit PF-183 war im Vergleich zu PF-189 zwar höher, jedoch war die Zahl nicht mit der Zeit gestiegen ($29 \pm 11,6 \%$) (Abbildung 5-11 C).

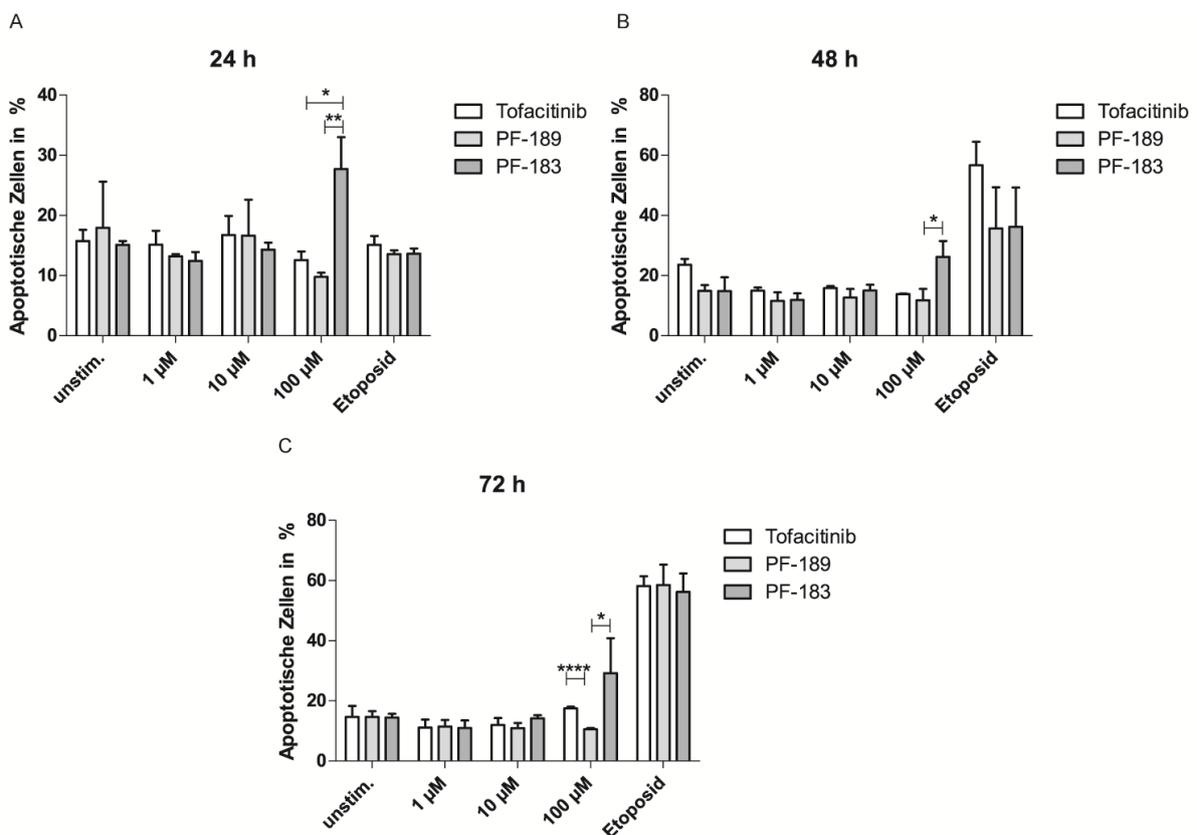
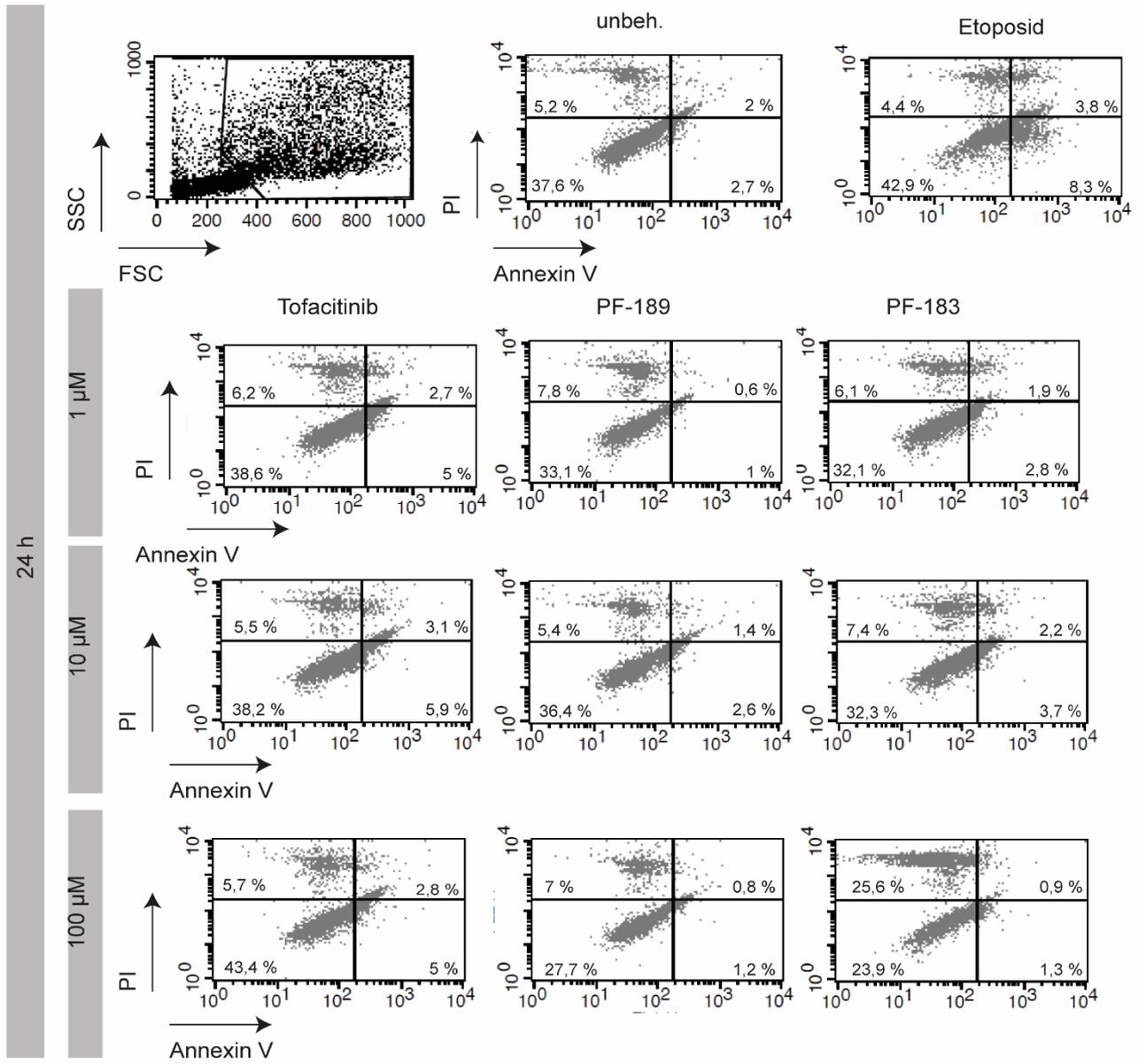
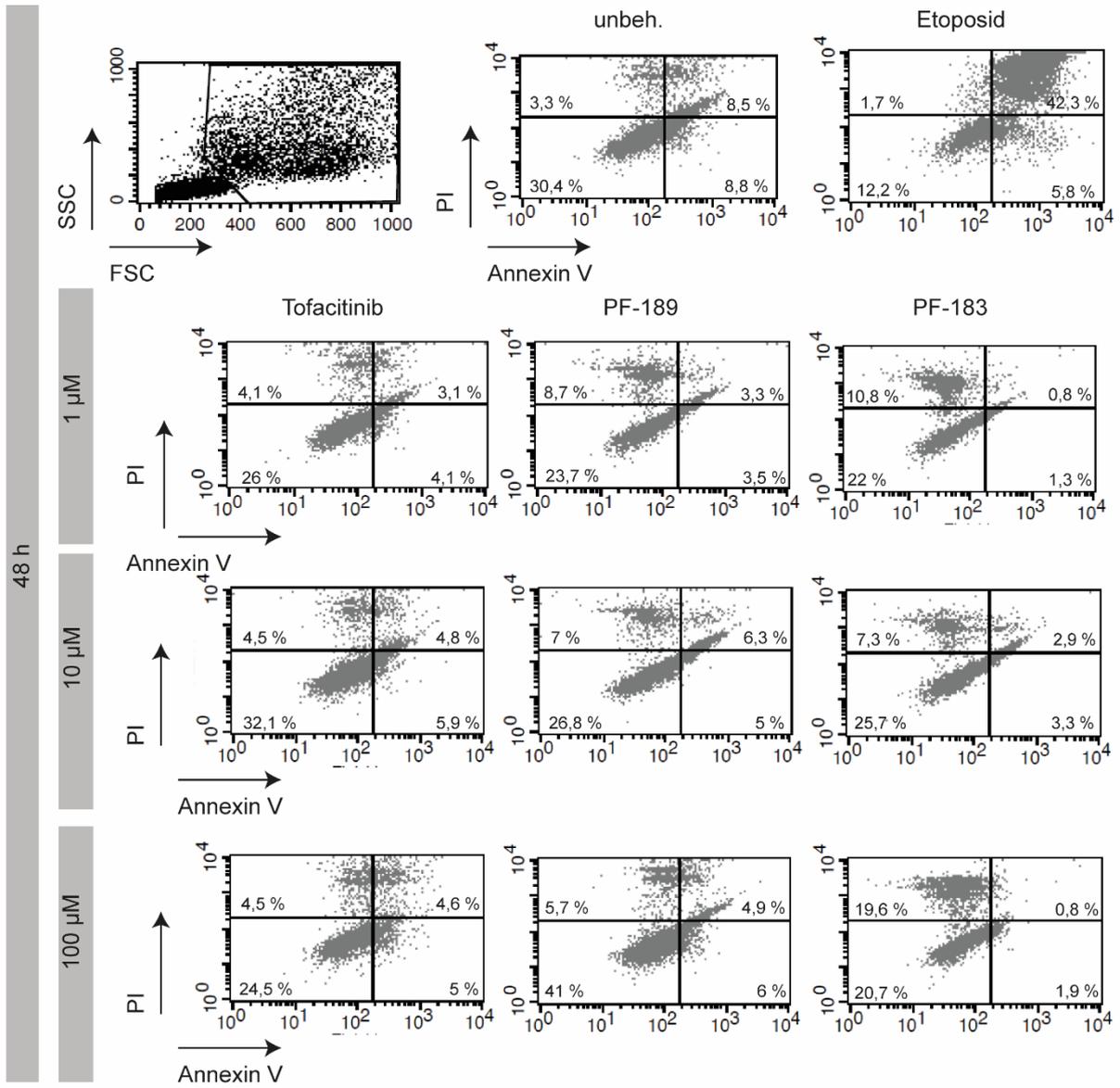


Abbildung 5-11: Messung der Apoptose mittels Durchflusszytometrie

HT-29 Zellen wurden mit 1, 10 100 μM Tofacitinib, PF-189 und PF-183 für 24, 48 oder 72 h behandelt. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen mit AnnexinV/Propidiumiodid markiert und mittels Durchflusszytometrie der Anteil apoptotischer oder nekrotischer Zellen bestimmt. Dargestellt sind hier Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimente mit jeweils $n=3$. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, **** = $p < 0,0001$.

76 Ergebnisse





78 Ergebnisse

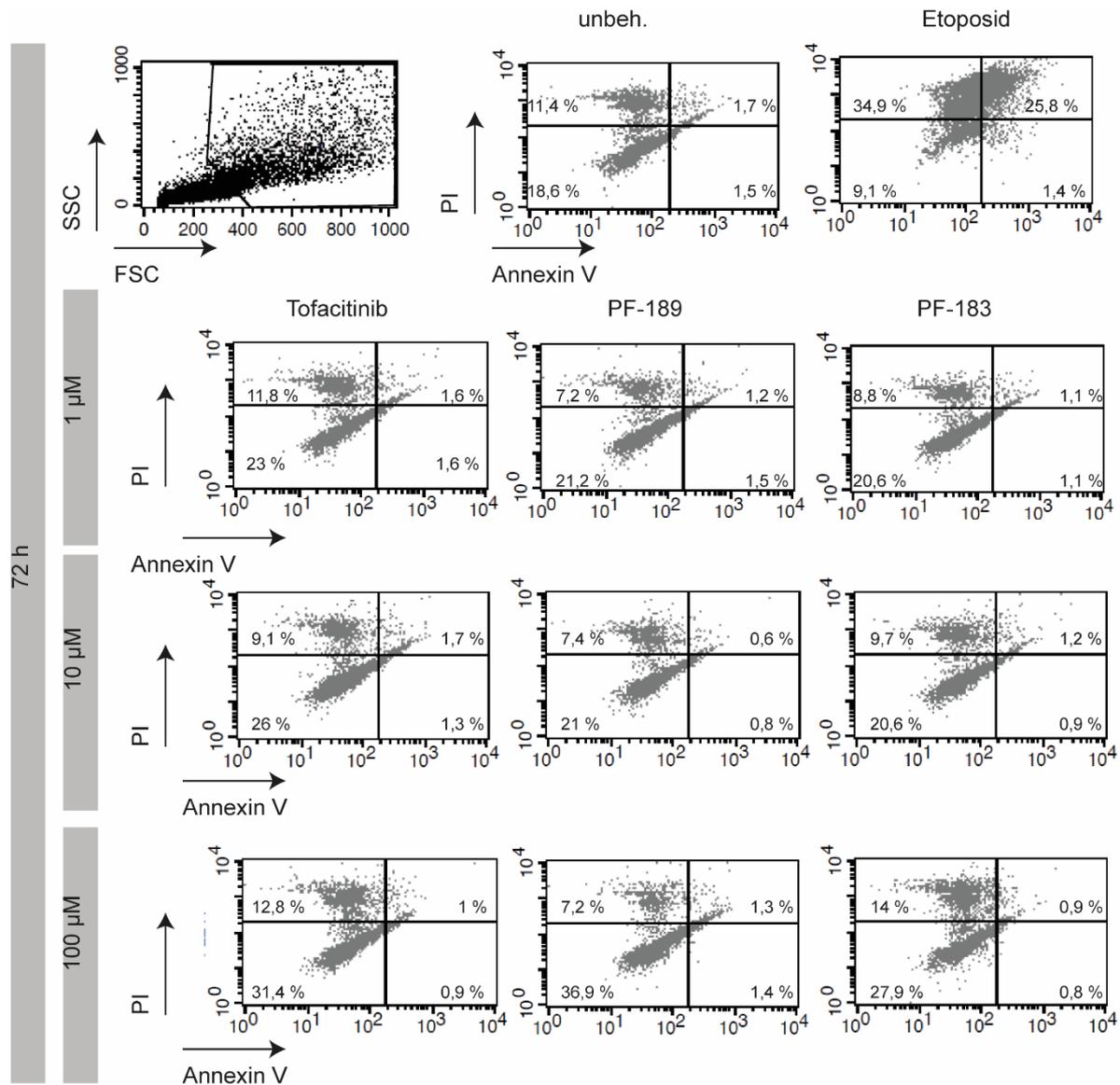


Abbildung 5-12: Induktion der Apoptose durch Tofacitinib, PF-189 und PF-183

HT-29 Zellen wurden mit 1, 10 100 µM Tofacitinib, PF-189 und PF-183 für 24, 48 oder 72 h behandelt. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen mit AnnexinV/Propidiumiodid markiert und mittels Durchflusszytometrie der Anteil apoptotischer oder nekrotischer Zellen bestimmt. Die Histogramme sind repräsentativ für 3 unabhängig voneinander durchgeführten Untersuchungen. unbeh.: unbehandelt, SSC: *sideward scatter*, FSC: *forward scatter*, PI: Propidiumiodid

Zur Bestimmung der Apoptoserate wurde neben der Durchflusszytometrie auch die PARP-Spaltung im Western Blot betrachtet. PARP-1 (Poly(ADP-ribose)-Polymerase) katalysiert die ADP-Ribosylierung von Chromatinproteinen, wie Histonen, und spielt eine wichtige Rolle in der DNA-Reparatur [232]. Diese Polymerasen übertragen eine ADP-Ribose Einheit von NAD⁺ auf das Zielprotein und bilden somit lange ADP-Ribose-Polymere aus. Wenn es zu einer Hyperaktivierung von PARP-1 und somit zu einem übermäßigen Verbrauch von NAD⁺ kommt, wird vermehrt ATP verbraucht

und die Zelle leitet Apoptose ein. Um diesen Vorgang zu verhindern, spalten Caspasen PARP-1 in das Spaltprodukt mit einer Größe von 89 kDa, welches als Merkmal der Apoptose im Western Blot nachgewiesen werden kann.

Zur Untersuchung, ob die Substanzen ebenfalls das PARP-1-Spaltprodukt induzieren, wurden HT-29 Zellen mit 1, 10 und 100 μM der jeweiligen Substanz für 24, 48 und 72 h inkubiert (Abbildung 5-13). Als Positivkontrolle diente Etoposid und als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Behandlung mit Tofacitinib für 24, 48 oder 72 h induzierte bei allen drei Konzentrationen keine Apoptose (Abbildung 5-13 A). Das 89 kDa Spaltprodukt war nur bei der Behandlung mit 100 μM Etoposid zu sehen. PF-189 induzierte während der kompletten Behandlung, weder bei 24, 48 noch bei 72 h eine Spaltung des PARP-1 (Abbildung 5-13 B). Bei PF-183 war nach 48 h eine leichte Bildung des Spaltproduktes und nach 72 h eine deutliche Spaltung zu sehen (Abbildung 5-13 B).

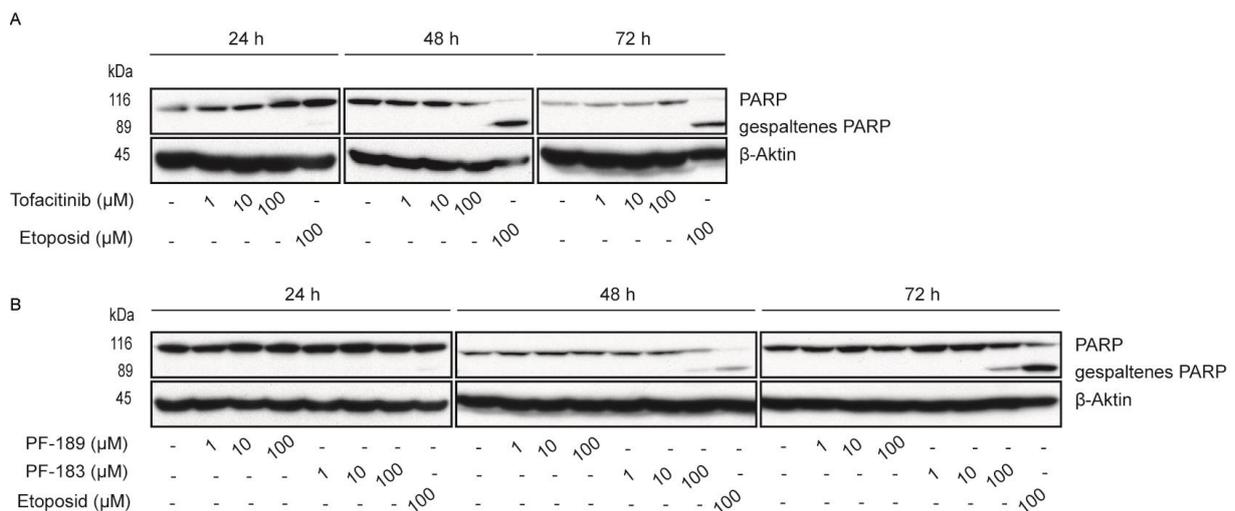


Abbildung 5-13: Untersuchungen der Bildung des charakteristischen 89 kDa PARP-1-Spaltproduktes

A: HT-29 Zellen wurden 24, 48 und 72 h mit 1, 10, 100 μM Tofacitinibcitrat gelöst in DPBS und 100 μM Etoposid inkubiert. B: HT-29 Zellen wurden 24, 48 und 72 h mit 1, 10, 100 μM PF-189 und PF-183 gelöst in DMSO und 100 μM Etoposid inkubiert. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung dient β -Aktin. Bestimmung der exprimierten Proteine erfolgte mittels Western Blot Analyse. kDa: Kilodalton, PARP: Poly(ADP-ribose)-Polymerase, μM : Mikromolar, h: Stunde

Die optimale, einzusetzende Konzentration sowohl von Tofacitinib, als auch von den Amidoxim-Prodrugs PF-189 und PF-183 war 1 oder 10 μM . Bei diesen Konzentrationen verursachten die Amidoxim-Prodrugs weder eine Abnahme der Zellviabilität noch eine Induktion von Apoptose. Erst durch den Einsatz höherer Konzentrationen wurde die Zellviabilität erniedrigt und die Anzahl an apoptotischen

80 Ergebnisse

Zellen erhöht. Somit konnten für weitere Untersuchungen die niedrigen Konzentrationen (1 und 10 μM) verwendet werden.

5.2.1.4 Wirkung von Tofacitinib, PF-189 und PF-183 auf Ba/F3-gp130/hIL6R-Zellen

Zur Untersuchung der Wirksamkeit der Amidoxim-Prodrugs auf die Zellproliferation wurde ein Zellsystem gewählt, dessen Proliferation essentiell von der Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges abhängt. Hierfür transfizierten Rose-John *et al.* Ba/F3-Zellen mit der Untereinheit gp130 und dem humanen IL-6-Rezeptor [233]. Die Ba/F3-gp130/hIL6R-Zellen proliferieren nur in Anwesenheit von IL-6, welches den JAK/STAT-Signalweg aktiviert (s. Kap. 1.2.3.1). Wenn dieser Signalweg durch Tofacitinib, PF-189 oder PF-183 gehemmt wird, können die Zellen trotz Anwesenheit von IL-6 nicht proliferieren. Die Zellen wurden mit Tofacitinib, PF-189 und PF-183 in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 μM für 24 h inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde ein MTS-Assay durchgeführt. Hierbei wurde deutlich, dass die Proliferation der Zellen durch alle drei Substanzen inhibiert wurde. Eine Inhibition ist schon bei 1 μM Tofacitinib und PF-183 zu sehen (Abbildung 5-14). Tofacitinib senkte den Anteil an lebenden Zellen um 26 und PF-183 um 32 %. Bei einer Konzentration von 10 μM Tofacitinib und PF-183 betrug die Viabilitätsrate nur noch 36 %. PF-189 wies hingegen erst bei 100 μM einen inhibitorischen Effekt auf (26 % lebender Zellen), für Tofacitinib und PF-183 betrug der Anteil an lebenden Zellen nur 23 %.

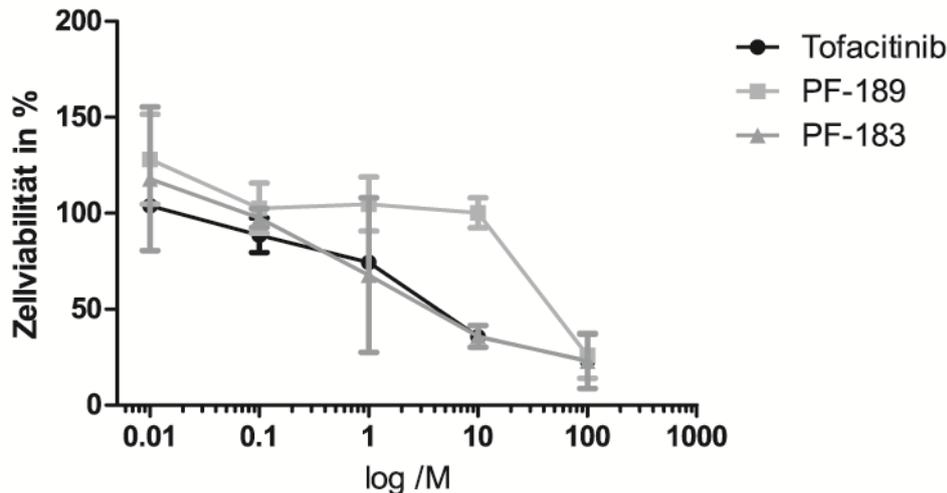


Abbildung 5-14: Inhibitorischer Effekt von Tofacitinib, PF-189 und PF-183 auf die Proliferation von BA/F3-gp130/hIL-6R- Zellen

BA/F3-gp130/hIL-6R- Zellen wurden mit 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 μ M Tofacitinib, PF-189 und PF-183 für 24 h behandelt. Nach Ablauf der Zeit wurde ein MTS-Assay durchgeführt. Die Grafik repräsentiert 3 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente mit jeweils n=5.

Sowohl Tofacitinib als auch die modifizierten Wirkstoffe sind in der Lage JAK/STAT-Aktivierung zu inhibieren. Diese Tatsache wurde anschließend in HT-29 Zellen überprüft.

5.2.1.5 Inhibition des JAK/STAT-Signalweges durch Amidoxim-Prodrugs

In diesem Experiment sollte nun die Inhibition der JAK-und STAT-Proteine durch die neuen Amidoxim-Prodrugs gezeigt werden, nachdem eine Aktivierung durch unterschiedliche Zytokine stattgefunden hatte. Hierbei dient die Stärke der Inhibition durch Tofacitinib als Referenz für die neuen Wirkstoffe. Die Inhibition der einzelnen JAK-Proteine konnte aufgrund unselektiver Antikörper gegen phosphorylierte JAKs, nicht dargestellt werden. Die inhibitorische Wirkung von Tofacitinib, PF-189 und PF-183 konnte aber durch die fehlende Aktivierung der STAT-Proteine gezeigt werden. In Kapitel 1.2.1 wurde bereits auf die Phosphorylierung der STAT-Proteine durch die JAKs detailliert eingegangen.

Das Designerzytokin hyperIL-6 (hyIL-6) besteht aus einem löslichen IL-6-Rezeptor (IL-6R) und IL-6. Es wurde entwickelt, da gezeigt werden konnte, dass der IL-6R nicht nur als transmembraner Rezeptor mit einer gp130-Einheit auf Hepatozyten, Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen exprimiert wird, sondern auch als löslicher

82 Ergebnisse

Rezeptor vorliegen kann [234, 235]. Als Komplex mit sezerniertem IL-6 kann es nun an gp130 binden, welches transmembran auf jeder Zelle exprimiert wird [236]. Die Bindung von IL-6 oder hylL-6 führt zu einer Autophosphorylierung von JAK1, JAK2 und Tyk2 und anschließend zu einer Aktivierung von STAT1 und STAT3 [237]. Durch vorherige Inkubation mit 1 μM Tofacitinib konnte die hylL-6 vermittelte Phosphorylierung beider Proteine teilweise gehemmt werden (Abbildung 5-15 A). Die Level an p-STAT1 (phosphoryliertes-STAT1) und p-STAT3 (phosphoryliertes STAT3) waren niedriger. Jedoch war die Stärke des inhibitorischen Effekts von Tofacitinib zeitabhängig bei der Inhibition von p-STAT1. Hierbei war nach 24 h eine stärkere Inhibition der Aktivierung von p-STAT1 zu sehen als nach 2 h (Abbildung 5-14 A). Die p-STAT3 Aktivierung war bei beiden Zeitpunkten gleich stark gehemmt. Bereits nach 2-stündiger Inkubation mit 10 μM Tofacitinib war die Phosphorylierung der STAT1- und STAT3-Proteine vollständig inhibiert (Abbildung 5-15 A). Diese Inhibition war auch nach einer Vorinkubation für 24 h noch zu beobachten. Die Inhibition des JAK/STAT-Signalweges nach Stimulation mit IL-6 wurde durch Tofacitinib effektiver gehemmt (Abbildung 5-15 B). Sowohl bei der 2-stündigen, als auch nach 24 h Behandlung konnte bei beiden Konzentrationen eine vollständige Inhibition von STAT1 und STAT3 nachgewiesen werden (Abbildung 5-15 B). Da die Stimulation mit hylL-6 die Aktivierung von JAK1, JAK2 und Tyk2 hervorruft und somit den gleichen Signalweg stimuliert, wurde die Inhibition durch die Amidoxim-Prodrugs des hylL-6-Signalweges bestimmt (Abbildung 5-15 C). Hierbei wurden HT-29 Zellen nur mit 10 μM der Amidoxim-Prodrugs behandelt. Die anschließende Stimulation mit hylL-6 zeigte, dass PF-189 und PF-183 die Aktivierung von STAT1 und STAT3 nach beiden Zeitpunkten inhibierten (Abbildung 5-15 C).

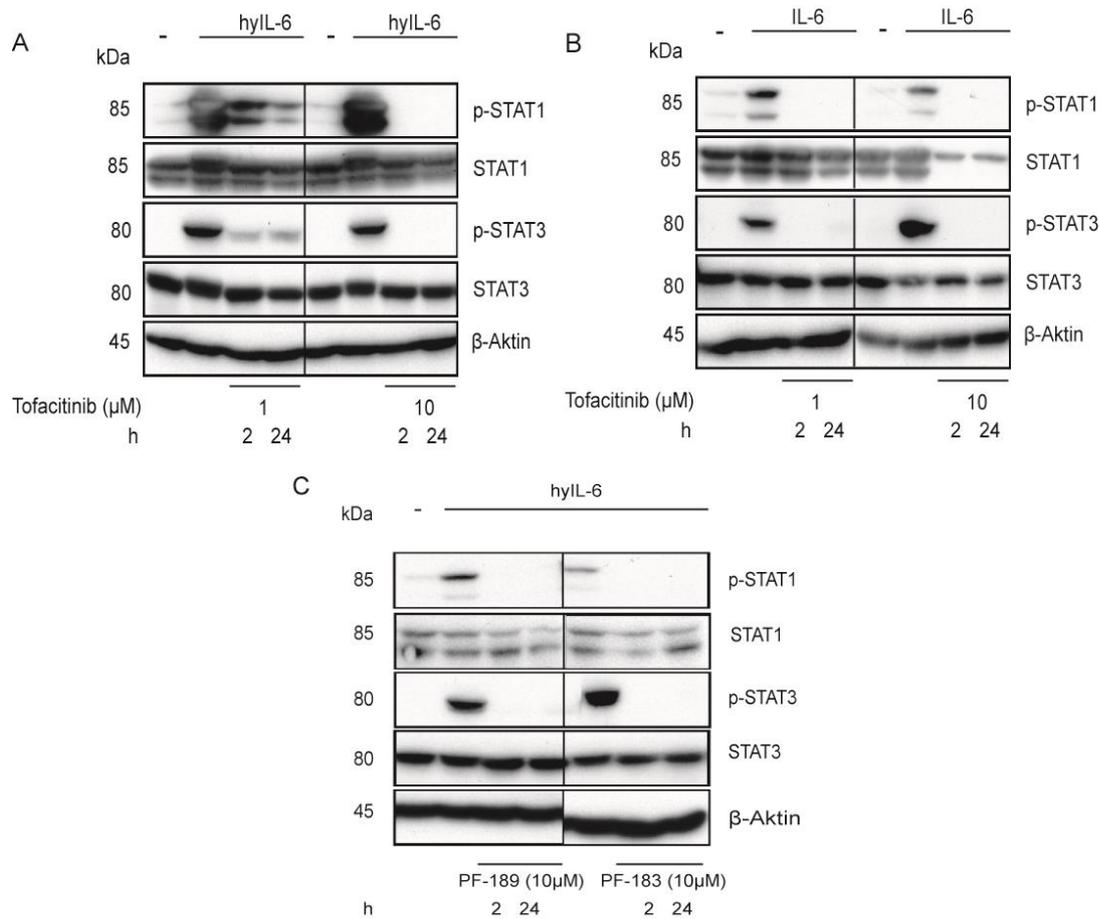


Abbildung 5-15: Inhibitorische Kapazität von Tofacitinib, PF-183 und PF-189 in HT-29 auf die hylL-6- und IL-6-aktivierten JAK/STAT-Signalwege in HT-29 Zellen

A, B: HT-29 Zellen wurden 2 oder 24 h mit 1 μM oder 10 μM Tofacitinib inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 30 min mit hylL6 (100ng/ml) oder IL-6 (100ng/ml) stimuliert. C: Zellen wurden 2 und 24 h mit 10 μM PF-189 und PF-183 inkubiert. Die Zellen wurden 30 min mit hylL6 (100ng/ml) stimuliert. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung dienten die unphosphorylierten Proteine und β-Aktin. Bestimmung der Proteinlevel erfolgte mittels Western Blot Analyse. DPBS: Dulbecco's Phospho buffered saline diente als Negativkontrolle. hylL-6: hyperIL-6, IL: Interleukin, kDa: Kilodalton, μM: Mikromolar STAT: *signal transducer and activator of transcription*

Der IFN-γ-Rezeptor (IFN-γR) ist ebenfalls mit JAK1 und JAK2 assoziiert, aktiviert jedoch nur STAT1 (s. Kap. 1.2.3). Eine vorherige Inkubation mit 1 μM Tofacitinib senkte das IFN-γ-aktivierte Level an p-STAT1 zeitabhängig. Während p-STAT1 nach einer 2-stündigen Vorinkubation nur teilweise gehemmt wurde, führte die 24-stündige Vorinkubation zu einer kompletten Inhibition. Bei der Inkubation mit einer Konzentration von 10 μM Tofacitinib erfolgte hingegen zeitunabhängig eine vollständige Hemmung der p-STAT1-Level (Abbildung 5-16 A). Anders als bei Tofacitinib konnte erst nach einer 24-stündigen Inkubation mit 10 μM PF-189 eine sehr schwache Abnahme der IFN-γ aktivierten Phosphorylierung von STAT1 detektiert werden (Abbildung 5-16 B). Wenn auch schwächer als bei Tofacitinib, konnte im

84 Ergebnisse

Gegensatz dazu, die IFN- γ -induzierte Phosphorylierung von STAT1 durch die Inkubation mit 10 μM PF-183 zeitabhängig stärker inhibiert werden (Abbildung 5-16 B).

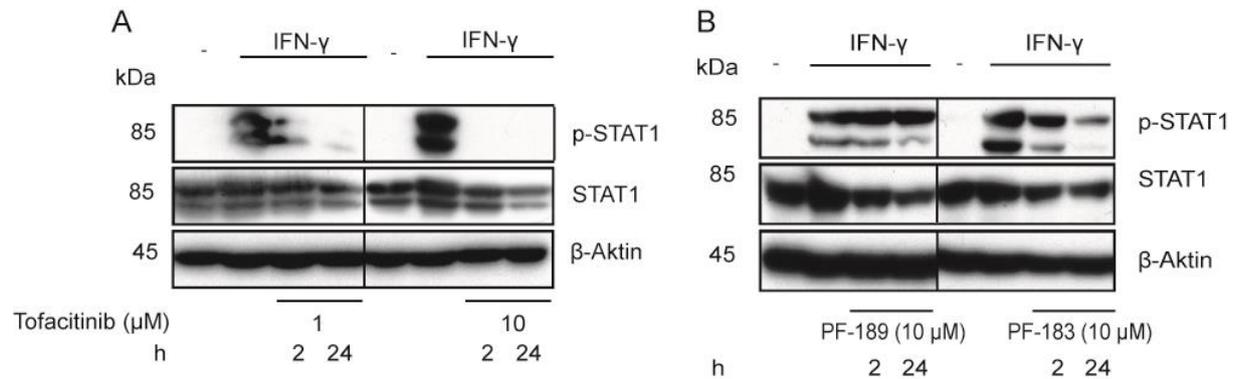


Abbildung 5-16: Inhibitorische Kapazität von Tofacitinib, PF-183 und PF-189 auf den IFN- γ -induzierten JAK/STAT-Signalweg in HT-29 Zellen

A: HT-29 Zellen wurden 2 und 24 h mit 1 μM oder 10 μM Tofacitinib behandelt. B: HT-29 Zellen wurden 2 und 24 h mit 10 μM PF-189 und PF-183 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 30 min mit IFN- γ (100ng/ml) stimuliert. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung dienten die unphosphorylierten Proteine und β -Aktin. Bestimmung der Proteinlevel erfolgte mittels Western Blot Analyse. DPBS: Dulbecco's Phospho buffered saline diente als Negativkontrolle. IFN: Interferon, IL: Interleukin, kDa: Kilodalton, μM : Mikromolar, h: Stunde, STAT: *signal transducer and activator of transcription*.

IL-22 ist ein Zytokin der IL-10R-Familie [238]. Der IL-22-Rezeptor ist mit JAK1 und Tyk2 assoziiert, so dass dessen Aktivierung zur Phosphorylierung von STAT1, aber auch von STAT3 führt [235]. Nach 2-stündiger Inkubation mit 1 μM Tofacitinib wurde die Phosphorylierung sowohl von STAT1 als auch STAT3 nicht vollständig gehemmt (Abbildung 5-17 A). Eine 24-stündige Inkubation inhibierte nur die IL-22-induzierte Aktivierung von p-STAT1 (Abbildung 5-17 A). Wie mit Tofacitinib führte die Behandlung mit PF-189 und PF-183 zu einer kompletten Inhibition der Aktivierung von STAT1 (Abbildung 5-17 B). Im Gegensatz zu Tofacitinib konnten PF-189 und PF-183 die IL-22-induzierte Aktivierung von STAT3 jedoch nicht vollständig hemmen. Die Inkubation mit 10 μM Tofacitinib führte bei beiden Zeitpunkten zu einer vollständigen Inhibition von p-STAT1 und p-STAT3 (Abbildung 5-17 B).

86 Ergebnisse

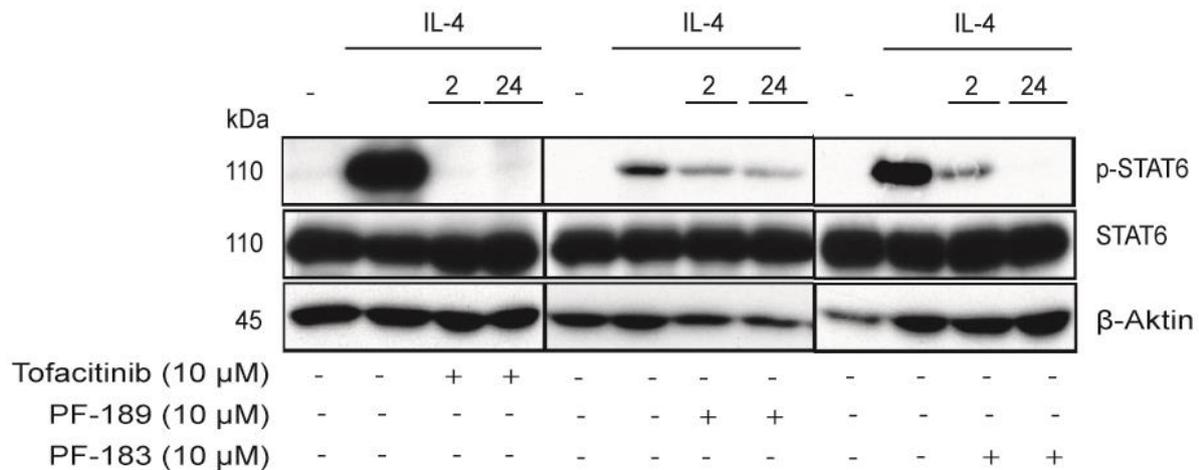


Abbildung 5-18: Inhibitorische Kapazität von Tofacitinib, PF-183 und PF-189 auf den IL-4-vermittelten JAK/STAT-Signalweg in HT-29 Zellen

HT-29 Zellen wurden 2 und 24 h mit 10 μ M Tofacitinib, PF-189 und PF-183 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 30 min mit IL-4 (50ng/ml) stimuliert. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung dienten die unphosphorylierten Proteine und β -Aktin. Bestimmung der Proteinlevel erfolgte mittels Western Blot Analyse. DPBS: Dulbecco's Phospho buffered saline diente als Negativkontrolle. IL: Interleukin, kDa: Kilodalton, μ M: Mikromolar, h: Stunde, STAT: *signal transducer and activator of transcription*

Die neuen Amidoxim-Prodrugs wiesen teilweise nicht die gleiche inhibitorische Kapazität auf wie Tofacitinib. Trotzdem waren sie in der Lage die durch die einzelnen Zytokine induzierten Signalwege in Adenokarzinomzellen zu inhibieren.

5.2.1.6 Überprüfung der Inhibition durch Amidine von PF-189 und PF-183

Es sollte getestet werden, ob die korrespondierenden Amidine der Amidoxime auch einen Einfluss auf die Viabilität von Ba/F3-gp130/hIL-6R-Zellen aufweisen und in der Lage sind den JAK/STAT-Signalweg in HT-29 Zellen zu inhibieren. PF-192 ist das korrespondierende Amidin von PF-189 und PF-185 das Amidin von PF-183. Die Inhibition der Ba/F3-gp130/hIL-6R-Zellen und HT-29 Zellen durch die Amidoxime wurde in Kap. 5.2.1.5 und 5.2.1.5 gezeigt.

Zuerst wurden verschiedene Konzentrationen der Amidine hinsichtlich ihres Einflusses auf die Zellproliferation von Ba/F3-gp130/hIL-6R-Zellen getestet (Abbildung 5-19 A). Für eine optimale Vergleichbarkeit wurden die gleichen Konzentrationen von PF-192 und PF-185 wie in Kap. 5.2.1.4 verwendet. Bei beiden Amidinen konnte bei einer

Konzentration bis zu 100 μM kein Einfluss auf die Proliferation der Zellen festgestellt werden.

Zusätzlich wurden HT-29 Zellen wie in Kap. 5.2.1.5 mit den Amidinen für 2 oder 24 h vorinkubiert und anschließend mit IL-4 stimuliert, um eine Inhibition des JAK1/JAK3/STAT6-Signalweges zu sehen (Abbildung 5-19 B, C). Beide Amidine führten weder zur Abnahme der Aktivierung noch zu einer Inhibition des Signalweges.

Die korrespondierenden Amidine konnten weder den JAK/STAT-Signalweg in Ba/F3-gp130/hIL-6R-Zellen noch in HT-29 Zellen hemmen. Die Inhibition ist nur durch die Amidoxime möglich.

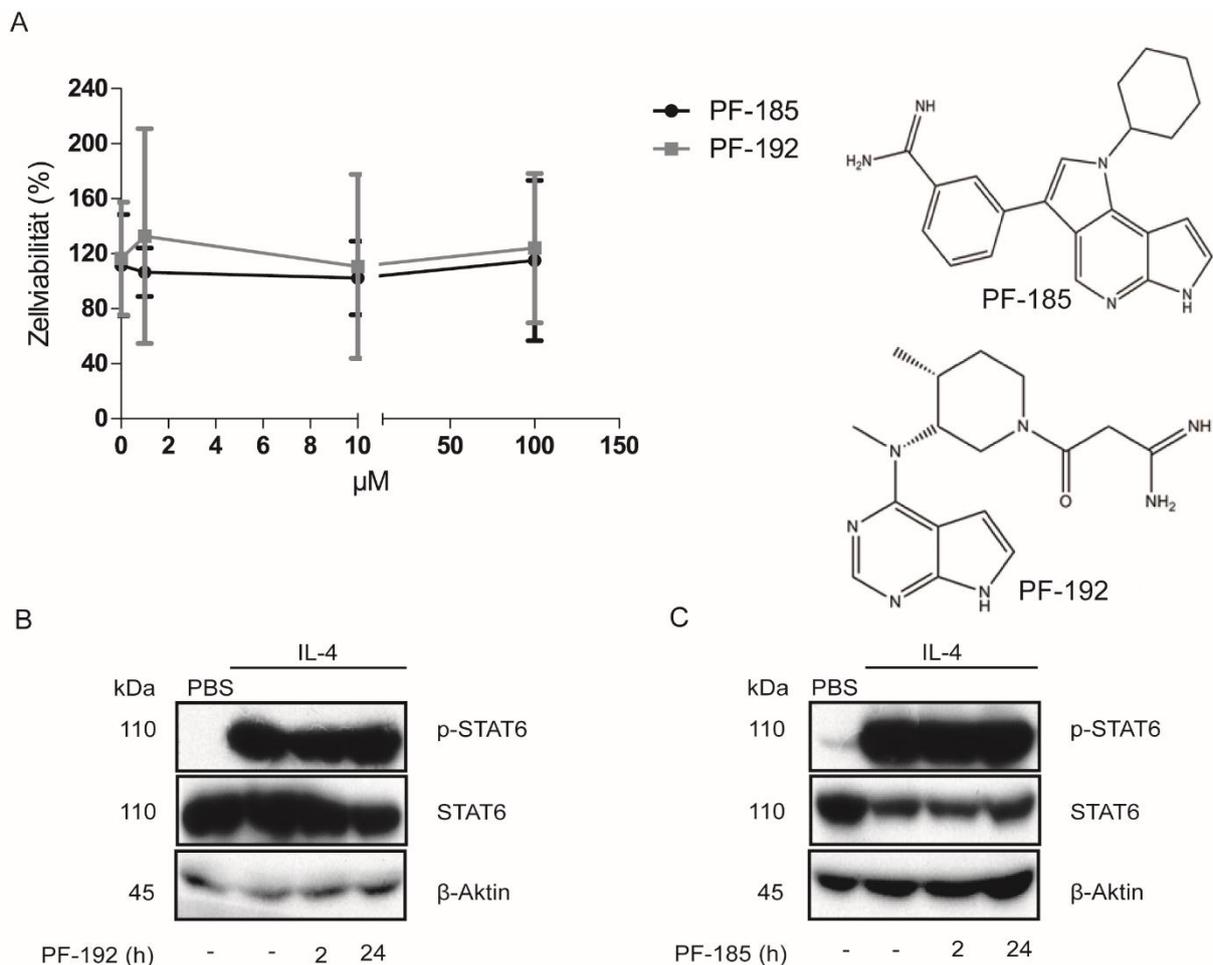


Abbildung 5-19: Inhibitorische Kapazität der Amidine PF-185 und PF-192

A: Ba/F3-gp130/hIL-6R-Zellen wurden 24 h mit 0,5, 1, 10, 100 μM PF-192 oder PF-185 inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde ein MTS-Assay durchgeführt. Die Grafik repräsentiert 3 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente mit jeweils $n=5$. B, C: HT-29 Zellen wurden 2 und 24 h mit 10 μM PF-192 oder PF-185 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 30 min mit IL-4 (50 ng/ml) stimuliert. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung dienten die unphosphorylierten Proteine und β -Aktin. Bestimmung der Proteinlevel erfolgte mittels Western Blot Analyse. DPBS: Dulbecco's Phospho buffered saline diente als Negativkontrolle. IL: Interleukin, kDa: Kilodalton, h: Stunde, STAT: *signal transducer and activator of transcription*.

88 Ergebnisse

5.2.1.7 Wirkung von Tofacitinib, PF-189 und PF-183 auf Immunzellen

Wie in Kap. 1.4.2 aufgezeigt wurde, kommt es bei Patienten mit CED durch Zerstörung der IECs zu einer Beeinträchtigung der Barrierefunktion. Hierdurch könnten Tofacitinib und die Amidoxim-Prodrugs in direkten Kontakt mit Immunzellen der *Lamina propria* kommen. Somit wurde die Inhibition des JAK/STAT-Signalweges durch die drei Wirkstoffe in Immunzellen durch den Einsatz von Modellsystemen, wie THP-1 Zellen und Jurkat Zellen, nachgewiesen. THP-1 Zellen sind Monozyten gewonnen aus einem Patienten mit akuter monozytärer Leukämie. Bei den Jurkats handelt es sich um T-Lymphozyten aus einer akuten T-Zell Leukämie.

Hierfür wurden beide Zelllinien jeweils 2 h mit Tofacitinib, PF-189 und PF-183 (10 µM) behandelt und anschließend mit IL-4 und IL-6 stimuliert (Abbildung 5-20). Es fand keine Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges durch IL-6 in Jurkat-Zellen statt (Daten nicht gezeigt), jedoch in THP-1 Zellen konnte eine Phosphorylierung von STAT3 nachgewiesen werden. Dabei konnte auch ein inhibitorischer Effekt durch die Substanzen in THP-1 Zellen detektiert werden (Abbildung 5-20 A). Sowohl Tofacitinib als auch PF-183 hemmten die IL-6-vermittelte Phosphorylierung von STAT3 vollständig, während nach der Behandlung mit PF-189 immer noch eine schwache Phosphorylierung zu beobachten war. Im Gegensatz zu IL-6, bewirkte die Stimulation mit IL-4 in beiden Zelllinien eine Aktivierung des JAK1/3-STAT6-Signalweges (Abbildung 5-20 B). In Jurkat Zellen waren beide Amidoxim-Prodrugs in der Lage die Phosphorylierung von STAT6 vollständig zu hemmen, während Tofacitinib STAT6 nur partiell hemmte. In THP-1 Zellen zeigten Tofacitinib und PF-183 hingegen eine vollständige Inhibition der Aktivierung. PF-189 konnte STAT6 nur partiell hemmen.

Tofacitinib und die Amidoxim-Prodrugs hemmten in beiden Zelllinien die Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges. Somit wirkten die jeweiligen Substanzen nicht nur auf den JAK/STAT-Signalweg im Modellsystem der IECs, sondern auch in Modellen der Immunzellen.

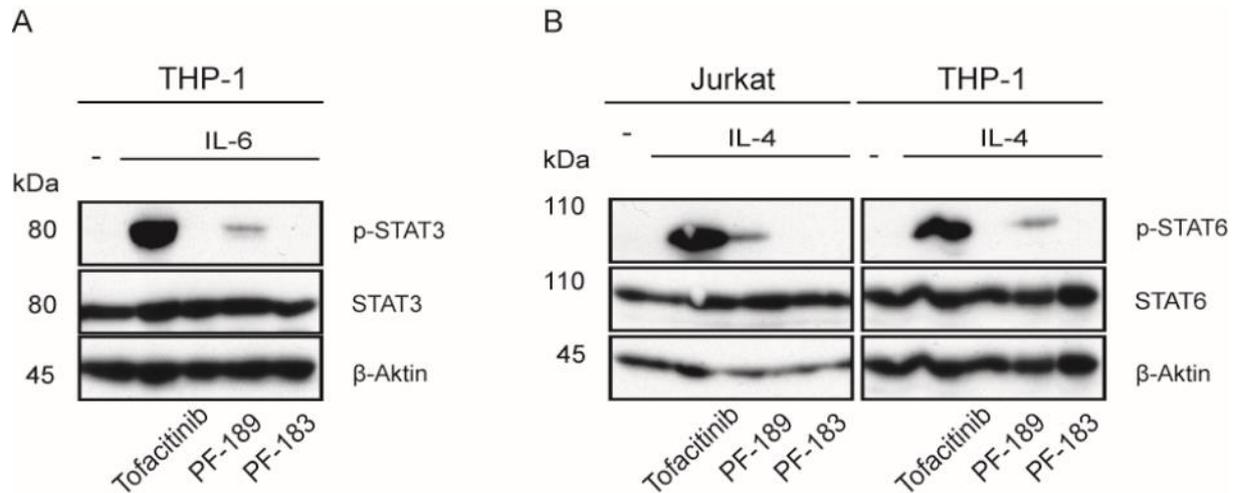


Abbildung 5-20: Inhibition des IL-6- und IL-4-induzierten JAK/STAT-Signalweges durch Tofacitinib, PF-189 und PF-183 in THP-1 und Jurkat Zellen

THP-1 und Jurkat Zellen wurden 2 h mit 10 μ M Tofacitinib, PF-189 oder PF-183 inkubiert. A: Anschließend wurden die Zellen 30 min mit IL-6 (100 ng/ml) stimuliert. B: Die Zellen wurden 30 min mit IL-4 (50 ng/ml) stimuliert. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung dienten die unphosphorylierten Proteine und β -Aktin. Bestimmung der Proteinlevel erfolgte mittels Western Blot Analyse. DPBS: Dulbecco's Phospho buffered saline diente als Negativkontrolle. IL: Interleukin, kDa: Kilodalton, μ M: Mikromolar, STAT: *signal transducer and activator of transcription*.

5.2.1.8 Kinetik der JAK/STAT-Inhibition durch Tofacitinib, PF-189 und PF-183

Es sollten die kinetischen Parameter der durch die drei Substanzen induzierten Inhibition des JAK/STAT-Signalweges untersucht werden. Einerseits dienen die Ergebnisse der Schlussfolgerung bezüglich der Stabilität der eingesetzten Verbindungen im verwendeten Medium bei einem physiologischen pH-Wert und der Art der Inhibition und andererseits können die Erkenntnisse für spätere *in vivo* Untersuchungen bezüglich der Halbwertszeit genutzt werden.

Für diese Untersuchungen wurden zwei verschiedene Ansätze verwendet. Im ersten experimentellen Teil wurde die Inhibitionsdauer und somit die Stabilität der Substanzen bestimmt, wenn diese dem Zellsystem permanent zur Verfügung standen. Hierfür wurden HT-29 Zellen 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24, 48 und 72 h mit 10 μ M Tofacitinib vorbehandelt. Am Ende der jeweiligen Zeitpunkte wurden die Zellen für 30 min mit IL-6 (Abbildung 5-21 A) oder IL-22 (Abbildung 5-21 B) jeweils in einer Konzentration von 100 ng/ml stimuliert. Die IL-6-induzierte Phosphorylierung und somit Aktivierung von STAT1 und STAT3 wurde durch Tofacitinib über 72 h komplett gehemmt (Abbildung 5-21 A). Somit war eine Inhibition von JAK1, Tyk 2 und JAK2 über 72 h gewährleistet. Die Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 wurde bei der IL-22-vermittelten

90 Ergebnisse

Signalkaskade hingegen erst nach einer 2-stündigen Vorbehandlung mit Tofacitinib fast vollständig gehemmt (Abbildung 5-21 B). Somit war Tofacitinib über 72 h stabil und die inhibitorische Kapazität von Tofacitinib war im IL-6-vermittelten Signalweg höher.

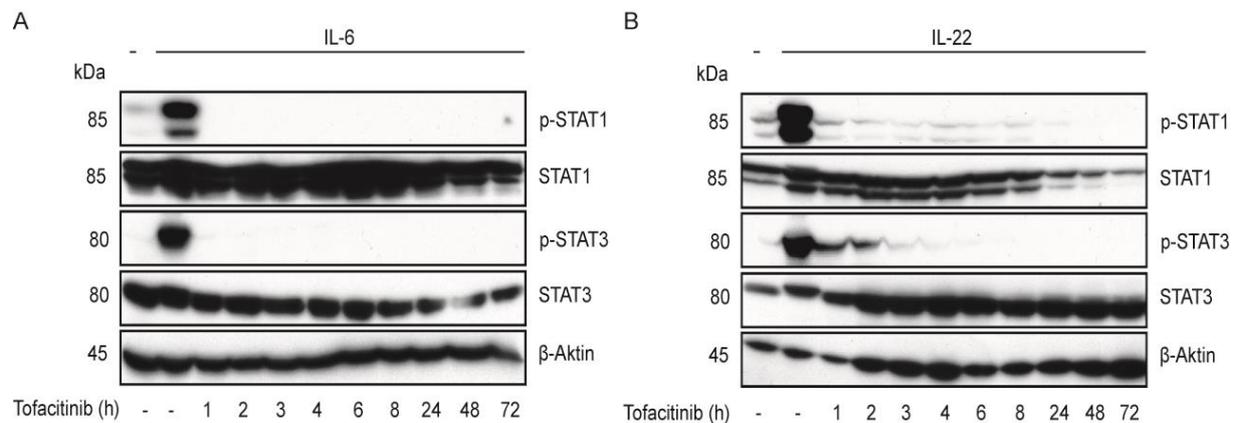


Abbildung 5-21: Kinetik der Inhibition durch Tofacitinib über 72 h

HT-29 Zellen wurden 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24, 48, 72 h mit 10 μM Tofacitinib inkubiert. A: HT-29 Zellen wurden 30 min mit IL-6 (100 ng/ml) stimuliert. B: HT-29 Zellen wurden 30 min mit IL-22 (100 ng/ml) stimuliert. Als Negativkontrolle diente keine Stimulation und zur Positivkontrolle die Stimulation mit den jeweiligen Zytokinen. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung dienten die unphosphorylierten Proteine und β -Aktin. Bestimmung der Proteinlevel erfolgte mittels Western Blot Analyse. DPBS: Dulbecco's Phospho buffered saline diente als Negativkontrolle. IL: Interleukin, kDa: Kilodalton, μM : Mikromolar, h: Stunde, STAT: *signal transducer and activator of transcription*

Diese Kinetik sollte auch für das JAK1/JAK3-System bestimmt werden. Für die Bestimmung wurden HT-29 Zellen für 1, 2, 4, 6, 24, 48, 72 h mit Tofacitinib, PF-189 oder PF-183 (10 μM) behandelt und anschließend für 30 min mit IL-4 (50 ng/ml) stimuliert. Sowohl Tofacitinib als auch PF-183 inhibierten die Phosphorylierung von p-STAT6 über den Zeitraum von 72 h bzw. 48 h (Abbildung 5-22 A, C). PF-189 zeigte dagegen keinen inhibitorischen Effekt auf diesen JAK/STAT-Signalweg (Abbildung 5-22 B).

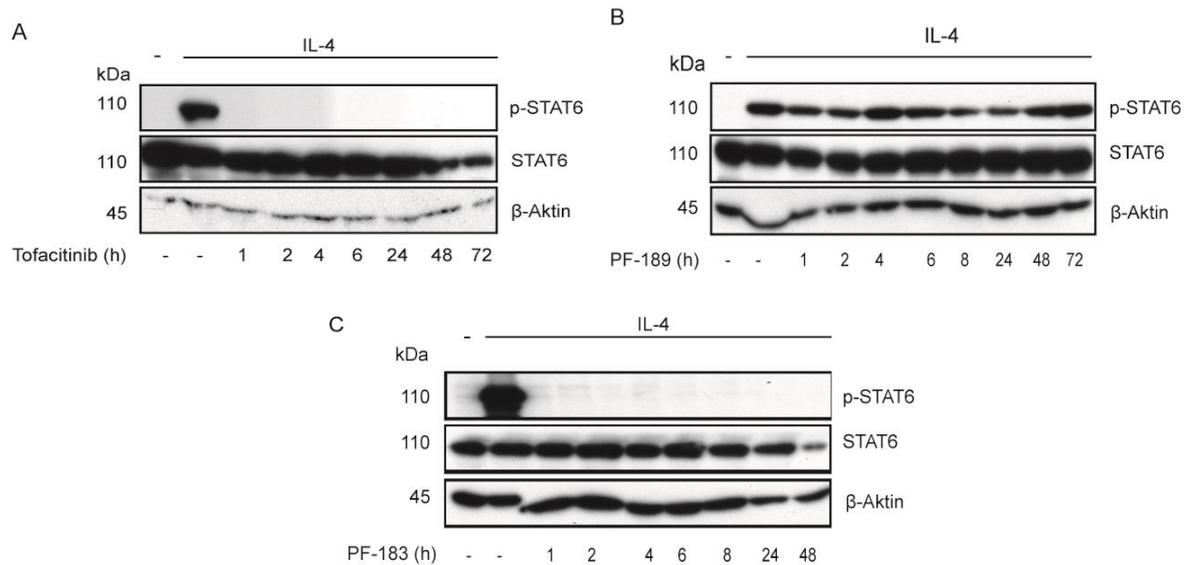


Abbildung 5-22: Kinetik der Inhibition des JAK1/3-STAT6-Signalweges durch Tofacitinib, PF-189 und PF-183

HT-29 Zellen wurden 1, 2, 4, 6, 8, 24, 48 oder 72 h mit 10 μ M Tofacitinib, PF-189 und PF-183 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 30 min mit IL-4 (50 ng/ml) stimuliert. Als Negativkontrolle dient keine Stimulation und zur Positivkontrolle die Stimulation mit IL-4. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung dienten die unphosphorylierten Proteine und β -Aktin. Bestimmung der Proteinlevel erfolgte mittels Western Blot Analyse. DPBS: Dulbecco's Phospho buffered saline diente als Negativkontrolle. IL: Interleukin, kDa: Kilodalton, h: Stunde, STAT: *signal transducer and activator of transcription*

Im zweiten Ansatz wurde die Dauer der kompetitiven Inhibition von Tofacitinib bestimmt und der Frage nachgegangen, ob die neuen Moleküle ebenfalls kompetitive Inhibitoren sind. Hierfür wurden HT-29 Zellen für 2 h mit 10 μ M Tofacitinib, PF-189 oder PF-183 vorstimuliert. Anschließend wurden die jeweiligen Substanzen durch einen Mediumwechsel entfernt und die Zellen nach 1, 2, 2,5 3, 4, 6 oder 8 h für 30 min mit IL-6 (100 ng/ml) oder IL-22 (100 ng/ml) stimuliert (Abbildung 5-23). Eine Inhibition der Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 durch Tofacitinib war nach den jeweiligen Zeitpunkten bei beiden Stimulationen nicht detektierbar (Abbildung 5-23A, B). Für die Untersuchung der kompetitiven Inhibition der Amidoxim-Prodrugs wurde die Stimulation nur mit IL-6 (100 ng/ml) durchgeführt, da hier die Aktivierung der drei JAK-Proteine (JAK1, 2 und Tyk2) abgedeckt wurde. Die Stimulation mit PF-189 zeigte die gleiche Kinetik wie Tofacitinib (Abbildung 5-23 A, C). Es hemmte den IL-6-vermittelten Signalweg solange es im Medium verfügbar war (s. Kap. 5.2.1.5), verlor jedoch bereits nach einer Stunde seine schwache inhibitorische Kapazität gegenüber der Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 (Abbildung 5-23 C). PF-183 wies dagegen eine sehr hohe inhibitorische Kapazität auf, da nach 8 h immer noch eine hohe Inhibition der Phosphorylierung sowohl von STAT1 als auch von STAT3 zu

92 Ergebnisse

beobachten war (Abbildung 5-23 D). Die Untersuchungen ergaben, dass Tofacitinib und PF-189 kompetitive Inhibitoren des JAK1/JAK2/Tyk2-Signalweges sind. Dies führte zu einem Verlust der Hemmung. PF-183 wies jedoch auf diesen Signalweg eine andauernde Inhibition auf und darüberhinaus konnte eine Stabilität über 8 h nachgewiesen werden.

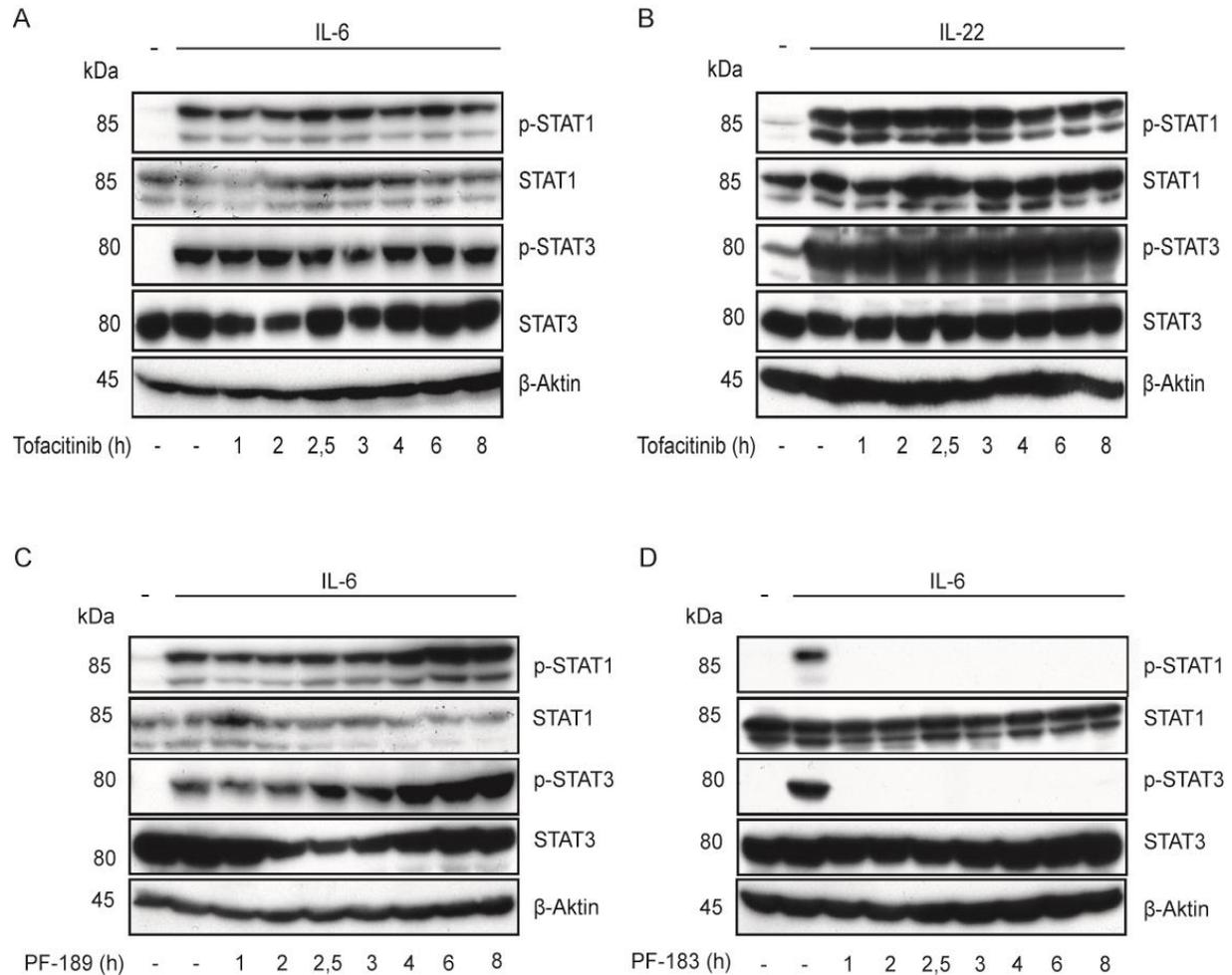


Abbildung 5-23: Abhängigkeit der inhibitorischen Kapazität von Tofacitinib, PF-189 und PF-183 von der Zeit
 A, B: HT-29 Zellen wurden 2 h mit Tofacitinib (10 μ M) vorinkubiert. Anschließend wurde das Tofacitinib aus dem Medium entfernt und die Zellen nach 1, 2, 2,5, 3, 4, 6, 8 h mit IL-6 (100 ng/ml) oder IL-22 (100 ng/ml) für 30 min stimuliert. C, D: HT-29 Zellen wurden 2 h mit PF-189 und PF-183 (10 μ M) vorinkubiert und anschließend entfernt. Nach 1, 2, 2,5, 3, 4, 6, 8 h wurden die Zellen 30 min mit IL-6 (100 ng/ml) stimuliert. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung dienen die unphosphorylierten Proteine und β -Aktin. Bestimmung der Proteinlevel erfolgte mittels Western Blot Analyse. DPBS: Dulbecco's Phospho buffered saline diente als Negativkontrolle. IL: Interleukin, kDa: Kilodalton, h: Stunde, STAT: *signal transducer and activator of transcription*

Diese Untersuchungen wurden auch im JAK1/JAK3-STAT6-Signalweg durchgeführt. Interessanterweise konnte in IL-4-stimulierten HT-29 Zellen sowohl für Tofacitinib als auch für PF-189 dieselbe Kinetik wie nach der Stimulation mit IL-6 detektiert werden (Abbildung 5-24 A, B). Bei beiden Substanzen war bereits nach einer Stunde keine

Inhibition der Phosphorylierungslevel von STAT6 mehr zu beobachten. Ähnlich wie nach der Stimulation mit IL-6 zeigte PF-183 dagegen eine langanhaltende Inhibition. Erst nach 8 h war eine schwache Phosphorylierung von STAT6 zu sehen (Abbildung 5-24 C).

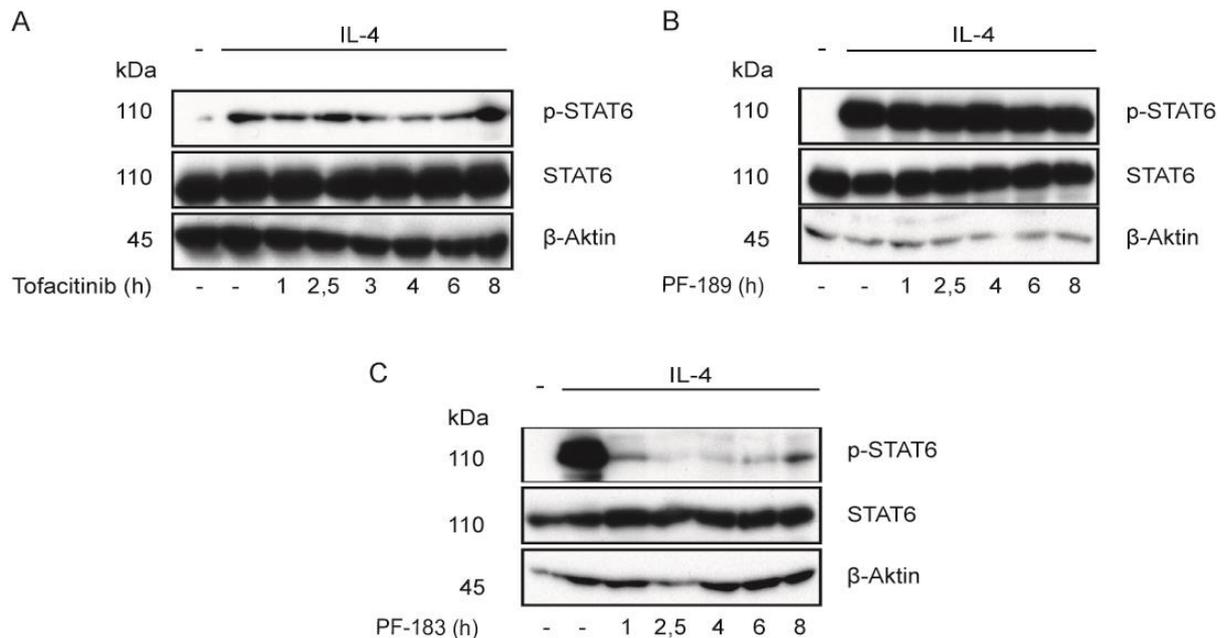


Abbildung 5-24: Kinetik der JAK1/JAK3-Inhibition durch Tofacitinib, PF-189 und PF-183

HT-29 Zellen wurden mit 10 μ M Tofacitinib, PF-189 und PF-183 2 h inkubiert und anschließend entfernt. Nach 1, 2,5, 3, 4, 6, 8 h wurden die Zellen mit IL-4 (50 ng/ml) 30 min stimuliert. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung dienten die unphosphorylierten Proteine und β -Aktin. Bestimmung der Proteinlevel erfolgte mittels Western Blot Analyse. DPBS: Dulbecco's Phospho buffered saline diente als Negativkontrolle. IL: Interleukin, kDa: Kilodalton, h: Stunde, STAT: *signal transducer and activator of transcription*.

5.2.1.9 Untersuchungen der Selektivität gegen JAK1/JAK2/Tyk2

In diesem Abschnitt sollte bestimmt werden, ob und gegen welche JAK-Proteine die Amidoxim-Prodrugs PF-189 und PF-183 selektiv wirken. Tofacitinib ist ein pan-JAK-Inhibitor und inhibiert alle vier JAK-Proteine, ist jedoch selektiver gegen JAK1 und JAK3 (s. Kap. 1.3.1.1). Durch den Mangel der Selektivität treten JAK-spezifische Nebenwirkungen auf (s. Kap.1.2.3.1).

Um den Einfluss der Amidoxim-Prodrugs auf die verschiedenen JAK-Proteine zu analysieren, wurden HT-29 Zellen für 2 h mit 5, 10, 15, 20, 50, 100, 200, 500 oder 1000 μ M Tofacitinib, PF-189 oder PF-183 behandelt und anschließend 30 min mit hIL-6 (100 ng/ml) stimuliert. hIL-6 aktiviert die Phosphorylierung von JAK1, JAK2 und Tyk2, so dass zunächst die Selektivität gegen diese JAK-Proteine bestimmt

94 Ergebnisse

werden konnte. Anhand der verminderten Phosphorylierungslevel von STAT1 und STAT3 wurde deutlich, dass die Inhibition dieser JAK-Proteine durch Tofacitinib schon bei einer Konzentration von 50 nM (Abbildung 5-25 A) eintrat, während PF-189 und PF-183 diesen Signalweg erst ab einer Konzentration von 200 nM (Abbildung 5-25 B) bzw. 500 nM (Abbildung 5-25 C) inhibierten.

Tofacitinib inhibierte schon in geringen Konzentrationen JAK1, JAK2 und Tyk2, während die neuen Amidoxim-Prodrugs erst ab hohen Konzentrationen eine Inhibition von STAT1 und STAT3 aufwiesen. Sie haben im Vergleich zu Tofacitinib eine höhere Selektivität.

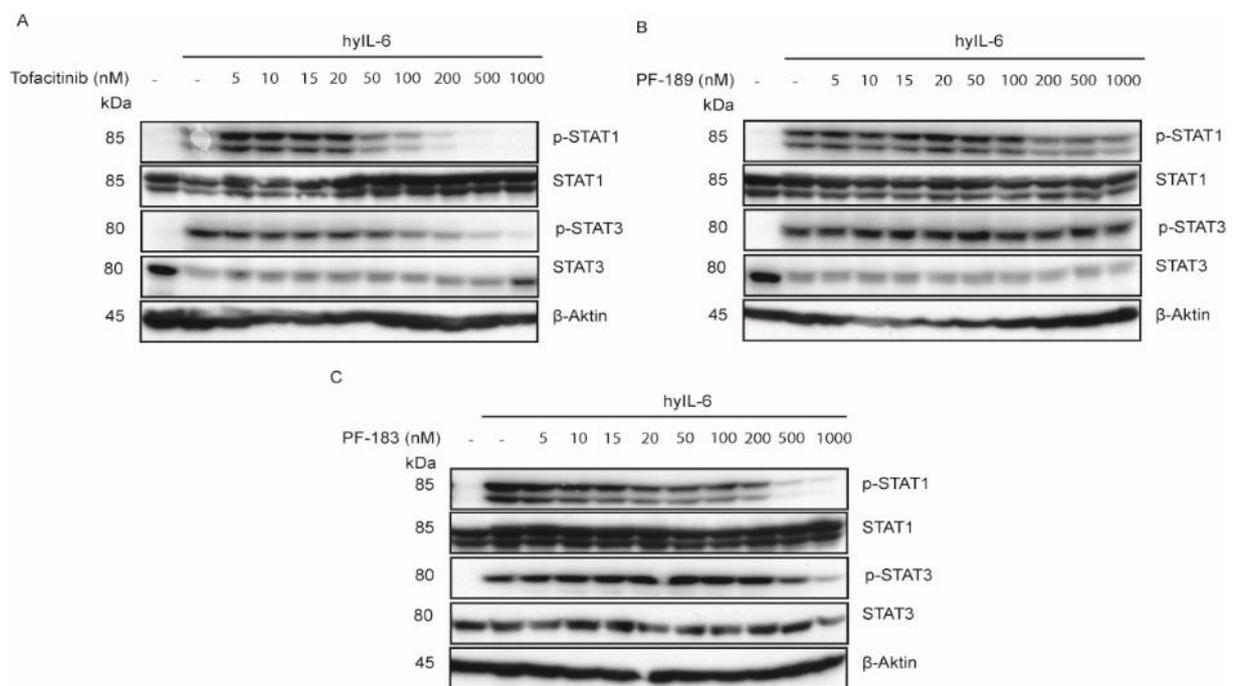


Abbildung 5-25: Überprüfung der Selektivität von Tofacitinib, PF-189 und PF-183 gegen JAK1, JAK2 und Tyk2

HT-29 Zellen wurden für 2 h mit 5, 10, 15, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 nM Tofacitinib, PF-189 und PF-183 behandelt. Anschließend wurden die Zellen 30 min mit hylL-6 (100 ng/ml) stimuliert. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung dienten die unphosphorylierten Proteine und β-Aktin. Bestimmung der Proteinlevel erfolgte mittels Western Blot Analyse. DPBS: Dulbecco's Phospho buffered saline diente als Negativkontrolle. hylL-6: hyperIL-6, IL: Interleukin, nM: Nanomolar, h: Stunde, STAT: *signal transducer and activator of transcription*

5.2.1.10 Untersuchungen der Selektivität gegen JAK1 und JAK3

Durch die Stimulation mit IL-4 kann eine Aussage über die Selektivität der untersuchten Substanzen gegen JAK1 und JAK3 getroffen werden. Hier wurde der gleiche Versuchsaufbau wie in Kap. 5.2.1.9 gewählt. Tofacitinib und PF-183 inhibierten die Phosphorylierung von STAT6 und somit die Aktivierung von JAK1 und JAK3 schon ab einer Konzentration von 100 nM (Abbildung 5-26 A, C). Während es durch die Behandlung mit 500 nM Tofacitinib jedoch bereits zur vollständigen Inhibition des Signalweges kam (Abbildung 5-26 A), war für das Amidoxim PF-183 eine höhere Dosis von 10000 nM für die vollständige Hemmung notwendig (Abbildung 5-26 C). PF-189 hemmte dagegen bei einer Konzentration von 500 nM (Abbildung 5-26 B). Jedoch kam es auch beim Einsatz einer hohen Konzentration von 10000 nM zu keiner vollständigen Inhibition (Abbildung 5-26 B).

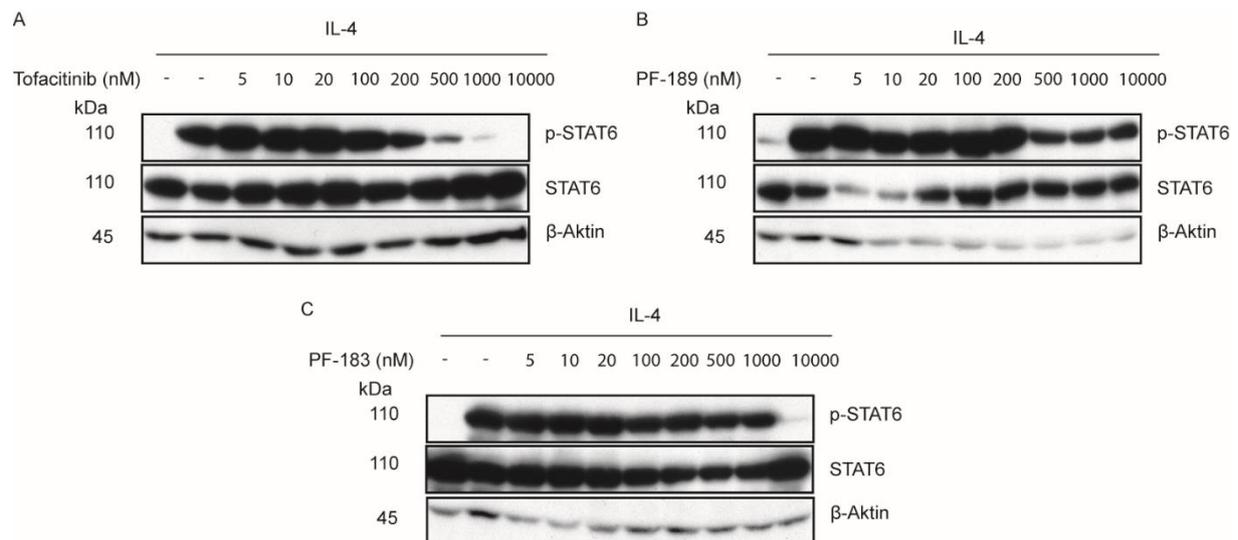


Abbildung 5-26: Überprüfung der Selektivität von Tofacitinib, PF-189 und PF-183 gegen JAK1 und JAK3
HT-29 Zellen wurden für 2 h mit 5, 10, 15, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 nM Tofacitinib, PF-189 und PF-183 behandelt. Anschließend wurden die Zellen 30 min mit IL-4 (50 ng/ml) stimuliert. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung dienten die unphosphorylierten Proteine und β -Aktin. Bestimmung der Proteinlevel erfolgte mittels Western Blot Analyse. DPBS: Dulbecco's Phospho buffered saline diente als Negativkontrolle. IL: Interleukin, nM: Nanomolar, kDa: Kilodalton, h: Stunde, STAT: *signal transducer and activator of transcription*

Nach Durchführung der Untersuchungen zur Selektivität der jeweiligen Substanzen wurde deutlich, dass sowohl Tofacitinib als auch PF-183 selektiv gegen JAK1 und JAK3 waren. Erst bei höheren Konzentrationen kommt es zur Inhibition des JAK1/JAK2/Tyk2-Signalweges. PF-189 zeigte dagegen weder für den JAK1/JAK3-Signalweg noch für den JAK1/JAK2/Tyk2-Signalweg eine Selektivität.

96 Ergebnisse

Ganz im Gegenteil waren erst hohe Konzentrationen notwendig, um die Phosphorylierung von STAT1, STAT3 oder STAT6 zu inhibieren.

5.2.2 Wirkung auf die *in vitro* Wundheilung

Sowohl die IL-4-vermittelte Phosphorylierung von STAT6 als auch die IL-22-vermittelte Phosphorylierung von STAT3 spielen bei der Regenerierung und Proliferation von IECs eine wichtige Rolle (s. Kap. 1.2.3.2) [240]. In vorherigen Experimenten wurde deutlich, dass alle drei Substanzen die Phosphorylierung von STAT3 und STAT6 inhibieren können. Aus diesem Grund wurde zunächst untersucht, wie Tofacitinib und die Amidoxim-Prodrugs die *in vitro* Wundheilung beeinflussen. Die Bestimmung des Einflusses von Tofacitinib, PF-189 und PF-183 auf die *in vitro* Wundheilung erfolgte mittels Scratch-Assay (s. Kap. 4.3.4).

Die Zellmigration nach Stimulation mit IL-22 war signifikant höher als die der unbehandelten Zellen (Abbildung 5-27 A). Bei einer kombinierten Stimulation mit IL-22 zeigte keine der drei untersuchten Substanzen ein verringertes Wachstum im Vergleich zur Stimulation nur mit IL-22 (Abbildung 5-27 A). Auf Proteinebene wurde deutlich, dass die Phosphorylierung von STAT3 durch IL-22 teilweise von Tofacitinib gehemmt wurde (Abbildung 5-27 B). Dies konnte nicht für PF-189 und PF-183 beobachtet werden (Abbildung 5-28 B).

Die Stimulation mit IL-4 bewirkte eine signifikante Erhöhung der Zellmigration im Vergleich zu unstimulierten HT-29 Zellen (Abbildung 5-27 C). Anders als bei IL-22, konnte nach der kombinierten Behandlung mit IL-4 und Tofacitinib ein signifikant verringertes relatives Wachstum detektiert werden (Abbildung 5-27 C). Währenddessen konnte bei kombinierter Stimulation mit IL-4 und PF-189 oder PF-183 keine signifikante Veränderung der Zellmigration nachgewiesen werden (Abbildung 5-27 C). Bei der Auswertung der assoziierten IL-4-induzierten Phosphorylierung von STAT6, konnte beobachtet werden, dass Tofacitinib die Bildung von p-STAT6 stark inhibierte und PF-189 nur schwach (Abbildung 5-27 D). PF-183 dagegen inhibierte die Phosphorylierung nicht.

Obwohl in den Western Blot Analysen deutlich wurde, dass Tofacitinib die IL-22-vermittelte Phosphorylierung von STAT3 inhibierte, zeigte diese Inhibition keinen

Effekt auf die Zellmigration. Interessanterweise hemmten beide Amidoxim-Prodrugs bei diesem Versuchsaufbau die Bildung von p-STAT3 nicht, obwohl in Kap. 5.2.1.5 die Inhibition deutlich gezeigt wurde. Im Gegensatz dazu zeigte die Inhibition des IL-4-vermittelten Signalweges eine signifikante Erniedrigung der Zellmigration. Während eine nicht vorhandene Inhibition auch das relative Wachstum nicht beeinflusste.

98 Ergebnisse

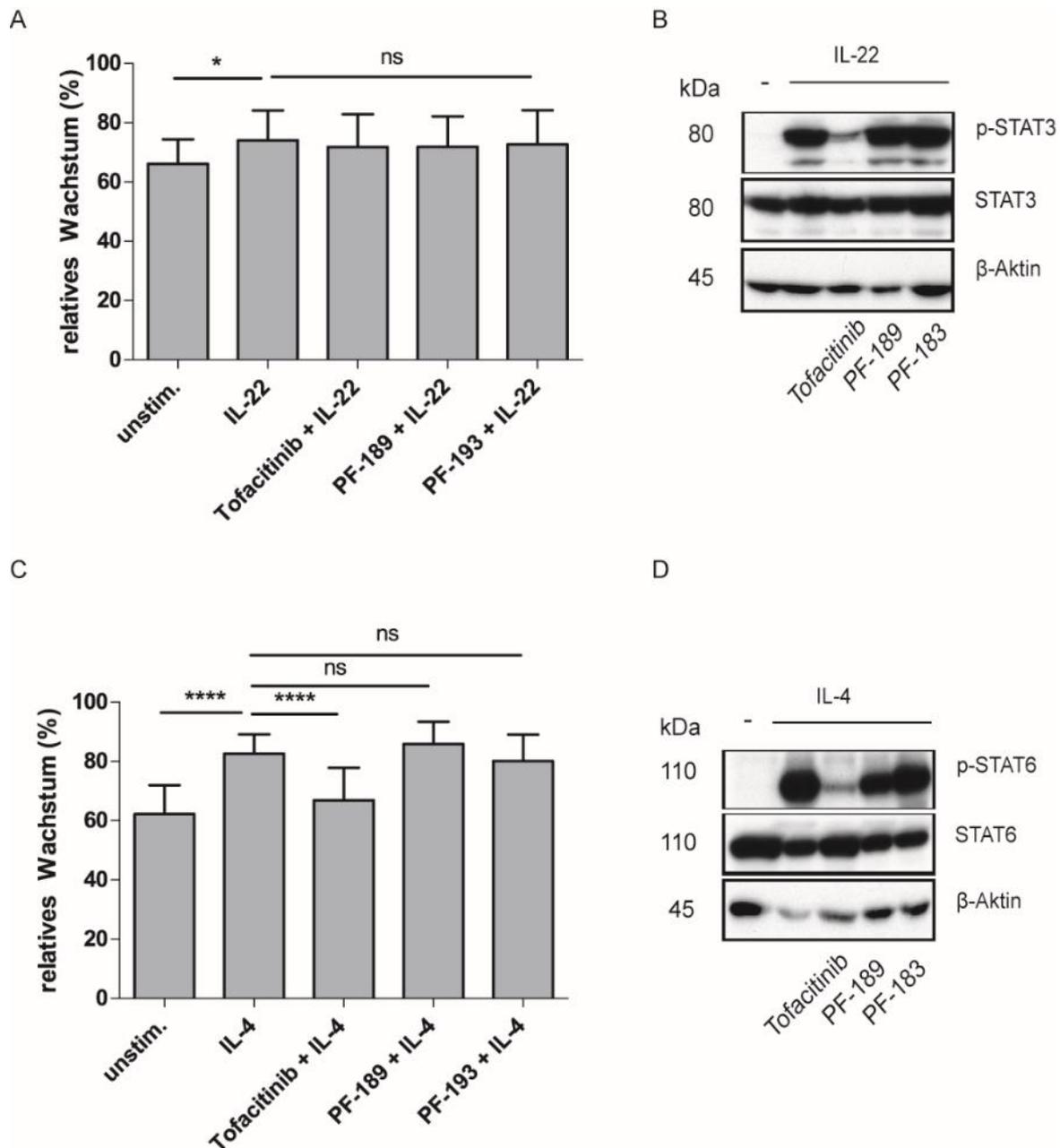


Abbildung 5-27: Bestimmung des Einflusses von Tofacitinib, PF-189 und PF-183 auf die *in vitro* Wundheilung

HT-29 Zellen wurden für 2 h mit 10 μ M Tofacitinib, PF-189 und PF-183 behandelt. Anschließend wurde der Zellverband pro *well* durch 3 Risse „verletzt“. Die Risse wurden zweimal mit DPBS gespült und die *wells* mit Medium gefüllt, welches die Substanzen und IL-22 (100 ng/ml) oder IL-4 (50 ng/ml) enthielt. Die Risse wurden nach 0 und 24 h unter dem Mikroskop aufgenommen und ausgewertet. Nach 24 h wurden Proteinlysate gewonnen. Die einzelnen Proteine wurden mittels Western Blot Analyse bestimmt. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung dienten die unphosphorylierten Proteine und β -Aktin. Bestimmung der Proteinlevel erfolgte mittels Western Blot Analyse. DPBS: Dulbecco's Phospho buffered saline diente als Negativkontrolle. Scratch-Assay wurde mittels Axiovision SE64 Rel.4.9 ausgewertet. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen dreier unabhängig voneinander durchgeführten Experimente mit $n=3$. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt $*= p < 0,05$, $****= p < 0,0001$. Unstim.: unstimuliert, ns: nicht signifikant, IL: Interleukin, kDa: Kilodalton, STAT: *signal transducer and activator of transcription*

Zur Simulation der Wundheilungskapazität von Tofacitinib, PF-189 und PF-183 bei einer akuten Entzündung wurden HT-29 Zellen mit einer Kombination aus IL-22 und der jeweiligen Substanz für 72 h stimuliert. Dabei wurde das Medium nach 24 h komplett gewechselt und mit neuen Stimulantien und Inhibitoren versehen. Nach 48 h wurde eine Verletzung des intestinalen Epithels mittels Scratch-Assay simuliert und die Zellmigration nach weiteren 24 h bestimmt. Die andauernde Stimulation der Zellen mit IL-22 führte zu einer gesteigerten Zellmigration verglichen mit den unbehandelten Zellen (Abbildung 5-28 A). Eine zusätzliche Stimulation mit Tofacitinib oder PF-189 inhibierte das relative Wachstum signifikant (Abbildung 5-28 A), während PF-183 keine signifikante Veränderung der Zellmigration hervorrief (Abbildung 5-28 A). Anders als bei PF-189 konnte ebenfalls eine durch Tofacitinib induzierte Inhibition der Phosphorylierung von STAT3 im Western Blot detektiert werden (Abbildung 5-28 B).

Bei einer kombinierten Inhibition und Stimulation mit Tofacitinib über 72 h zeigte die Inhibition der Phosphorylierung von STAT3 einen Einfluss auf die Abnahme der Zellmigration. Bei PF-189 war keine Inhibition von p-STAT3 zu detektieren, dennoch verringerte es das relative Wachstum.

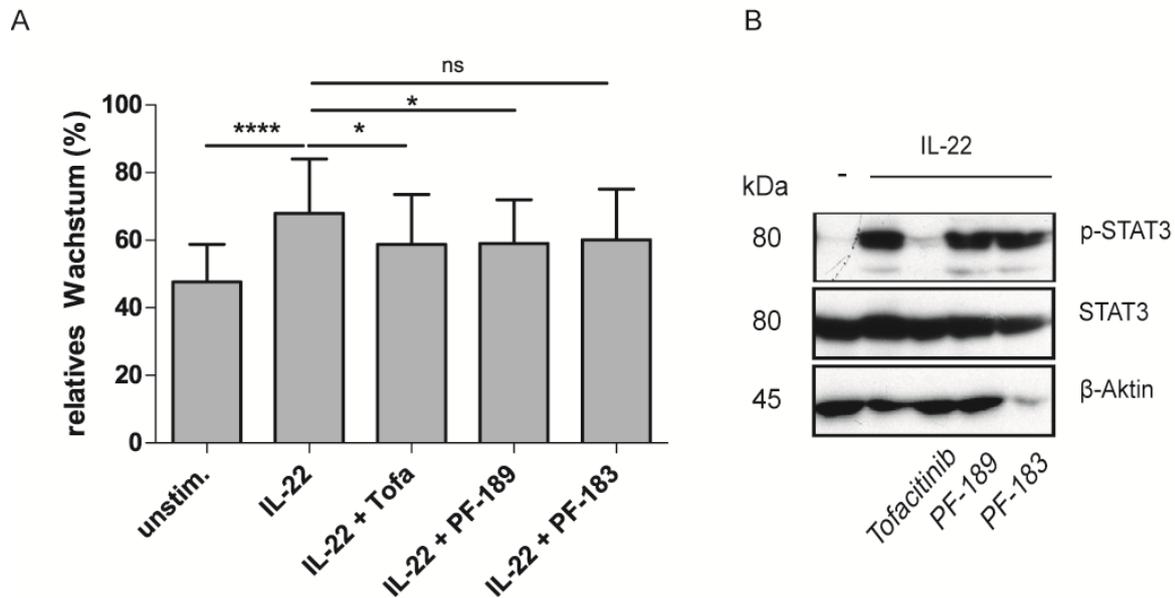


Abbildung 5-28: Bestimmung der *in vitro* Zellmigration nach Dauerstimulation mit IL-22, Tofacitinib, PF-189 und PF-183

HT-29 Zellen wurden für 2 h mit 10 μ M Tofacitinib, PF-189 und PF-183 behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit IL-22 (100 ng/ml) stimuliert. Dies wiederholte sich 2 Tage. Nach 48 stündiger Stimulation und Inhibition wurde der Zellverband pro *well* durch 3 Risse „verletzt“. Die Risse wurden zweimal mit DPBS gespült und die *wells* mit Medium gefüllt, welches die Substanzen und IL-22 (100 ng/ml) enthielt. Nach 24 h wurden Proteinlysate gewonnen. Die einzelnen Proteine wurden mittels Western Blot Analyse bestimmt. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung dienten die unphosphorylierten Proteine und β -Aktin. Bestimmung der Proteinlevel erfolgte mittels Western Blot Analyse. DPBS: Dulbecco's Phospho buffered saline diente als Negativkontrolle. Scratch-Assay wurde mittels Axiovision SE64 Rel.4.9 ausgewertet. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen dreier unabhängig voneinander durchgeführten Experimente mit $n=2$. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt* = $p < 0,05$, **** = $p < 0,0001$. Unstim.: unstimuliert, ns: nicht signifikant, IL: Interleukin, kDa: Kilodalton, STAT: *signal transducer and activator of transcription*

5.2.3 Wirkung von Tofacitinib, PF-189 und PF-183 auf den IFN- γ -induzierten Zelltod

Ein weiterer wichtiger Faktor während einer Entzündung ist die Sekretion proinflammatorischer Zytokine, die unter anderem den programmierten Zelltod induzieren können. IFN- γ ist ein klassisches Zytokin, das durch die Aktivierung von STAT1 Apoptose in Zellen hervorrufen kann (1.2.3.2). In diesem Versuchsaufbau sollte die Fähigkeit von Tofacitinib, PF-189 und PF-183 bestimmt werden, ob und in welchem Maß die Substanzen in der Lage sind, Apoptose mittels der Inhibition der Phosphorylierung von STAT1 zu beeinflussen. Hierfür wurden HT-29 Zellen 2 h mit den jeweiligen Substanzen behandelt und anschließend für 24, 48 oder 72 h mit IFN- γ

stimuliert. Die Zellen wurden mit AnnexinV und Propidiumiodid markiert und mittels Durchflusszytometrie vermessen (s. Kap. 4.3.3).

Nach einer 24-stündigen Stimulation mit IFN- γ zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Anteil apoptotischer Zellen verglichen mit unbehandelten HT-29 Zellen (Abbildung 5-29 A).

Nach 48-stündiger IFN- γ -Stimulation wurde, verglichen mit den unstimulierten Zellen ($14 \pm 1,9 \%$), eine signifikant erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen festgestellt (Abbildung 5-29 B). Die Behandlung mit Tofacitinib bzw. PF-189 senkte die IFN- γ induzierte Apoptose von $39 \pm 5,7 \%$ auf $12 \pm 1,7 \%$ bzw. auf $19,8 \pm 4,5 \%$. PF-183 zeigte keine signifikante Verminderung der Anzahl apoptotischer Zellen ($36 \pm 7,4 \%$), jedoch erhöhte es auch nicht den Anteil an toten Zellen.

Nach 72 h zeigte die Stimulation mit IFN- γ einen noch deutlicheren Anstieg apoptotischer Zellen auf $65 \pm 5 \%$, während bei den unstimulierten HT-29 Zellen nur $17 \pm 3,7 \%$ apoptotisch waren (Abbildung 5-29 C). Die Behandlung mit Tofacitinib senkte den Anteil apoptotischer Zellen auf $14 \pm 2 \%$. PF-189 wies ebenfalls eine inhibitorische, aber geringere Wirkung als Tofacitinib auf den IFN- γ -induzierten Zelltod auf ($45 \pm 3,3 \%$). PF-183 zeigte hingegen auch nach 72 h Inkubation mit einem Anteil von $60 \pm 4,5 \%$ apoptotischer Zellen keinen protektiven Effekt.

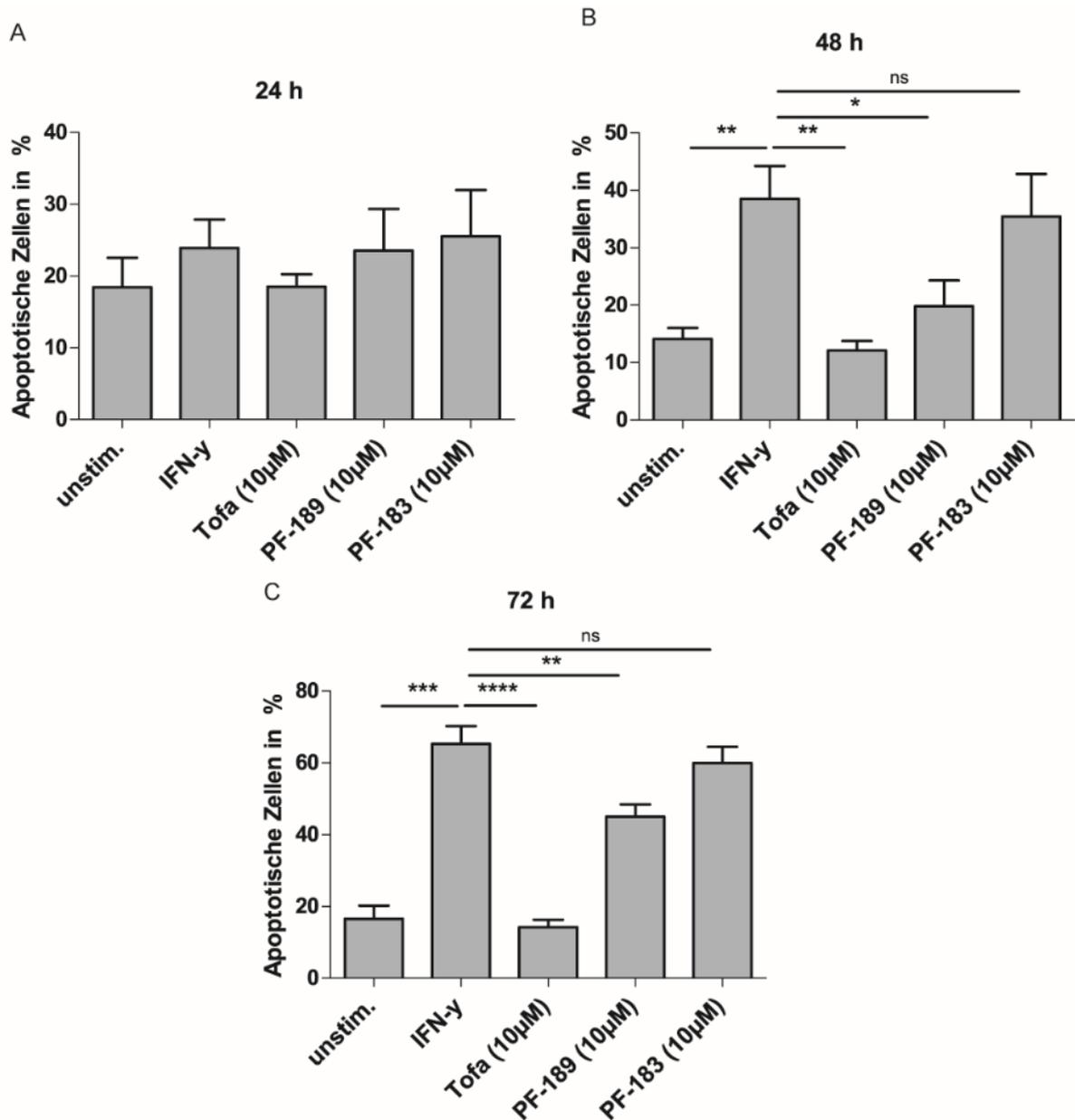


Abbildung 5-29: Einfluss von Tofacitinib, PF-189 und PF-183 auf den IFN- γ -induzierten Zelltod

HT-29 Zellen wurden für 2 h mit 10 μ M Tofacitinib, PF-189 und PF-183 behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 24, 48 oder 72 h mit IFN- γ (100 ng/ml) stimuliert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen mit AnnexinV/Propidiumiodid markiert und mittels Durchflusszytometrie wurde der Anteil apoptotischer Zellen bestimmt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen dreier unabhängig voneinander durchgeführten Experimente mit n=3. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,0005$, **** = $p < 0,0001$. Unstim.: unstimuliert, ns: nicht signifikant, IFN: Interferon, kDa: Kilodalton, μ M: Mikromolar, h: Stunde, STAT: *signal transducer and activator of transcription*.

Tofacitinib zeigte sich als geeigneter Kandidat zur Therapie des IFN- γ -induzierten Zelltodes während einer CED, da es die Anzahl apoptotischer Zellen deutlich verringert hat. PF-189 könnte in diesem Signalweg eine schwache Inhibition hervorrufen, müsste aber *in vivo* genauer untersucht werden. PF-183 eignet sich nicht für die Therapie der Apoptose, da es keine Verbesserung zeigte.

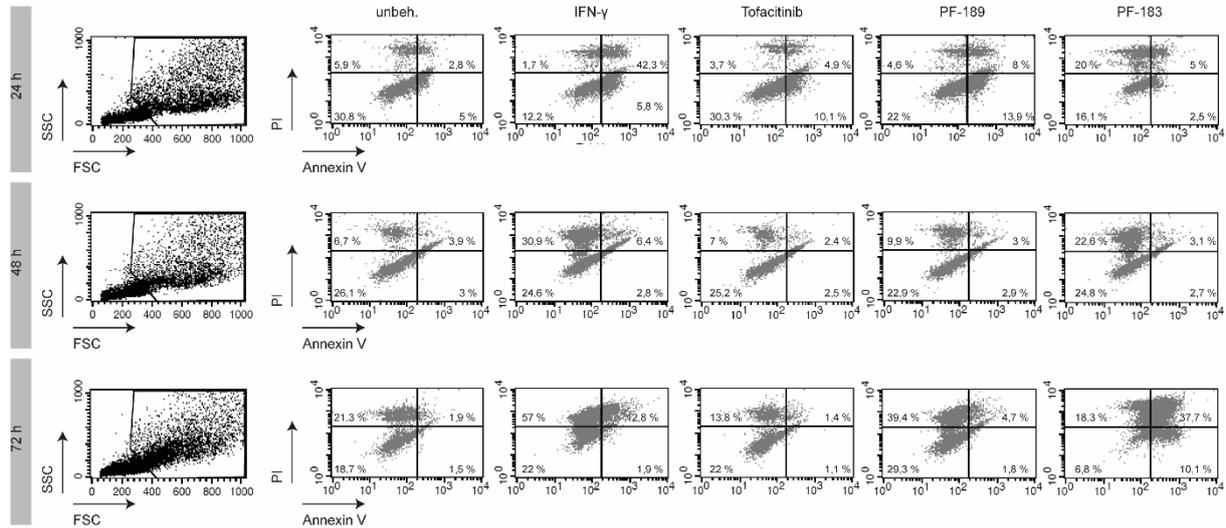


Abbildung 5-30: Histogramme des Einflusses von Tofacitinib, PF-189 und PF-183 auf den IFN- γ -induzierten Zelltod

HT-29 Zellen wurden für 2 h mit 10 μ M Tofacitinib, PF-189 und PF-183 behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 24, 48 oder 72 h mit IFN- γ (100 ng/ml) stimuliert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen mit AnnexinV/Propidiumiodid markiert und mittels Durchflusszytometrie der Anteil an apoptotischen Zellen bestimmt. Die dargestellten Histogramme repräsentieren 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimente. Unbeh.: unbehandelt, SSC: *sideward scatter*, FSC: *forward scatter*, PI: Propidiumiodid

Mittels Proteinanalytik sollte zusätzlich überprüft werden, ob die IFN- γ -induzierte Apoptose in den HT-29 Zellen tatsächlich auf die Phosphorylierung und somit Aktivierung von STAT1 zurückzuführen ist. Hierfür wurden die Zellen 2 h mit je einer der zu testenden Verbindungen inkubiert und anschließend mit IFN- γ für 24, 48, 72 h oder 2 x 24 h stimuliert. Bei 2 x 24 h wurde nach 24 h das Medium entnommen und mit frischem Medium, welches die Substanzen und IFN- γ enthielt, ersetzt. Anschließend wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt (s. Kap. 4.5.3).

Die Stimulation mit IFN- γ induzierte zu jedem der untersuchten Zeitpunkte sowohl die Bildung des charakteristischen 89 kDa PARP-1 Spaltproduktes als auch die Phosphorylierung von STAT1 (Abbildung 5-29 und 5-31). Diese Tatsachen könnten darauf hindeuten, dass IFN- γ mittels der Aktivierung von STAT1 programmierten Zelltod auslöst. Tofacitinib inhibierte ebenfalls die Bildung von p-STAT1 und die

104 Ergebnisse

Spaltung von PARP (Abbildung 5-31 A). Die beiden Amidoxim-Prodrugs hingegen konnten die starke Phosphorylierung von STAT1 nicht inhibieren und auch nicht die Bildung des Spaltproduktes (Abbildung 5-31 B, C). Lediglich bei der Stimulation mit frischem IFN- γ und Substanz über 2 x 24 h sah man eine verminderte Bildung des Spaltproduktes nach Behandlung mit PF-189 und PF-183, jedoch sieht man keine Inhibition der Phosphorylierung von p-STAT1.

Tofacitinib konnte sowohl die Phosphorylierung von STAT1 inhibieren, als auch die Bildung des Spaltproduktes. Somit könnte die Bildung des Spaltproduktes von PARP auf die Phosphorylierung von STAT1 zurückzuführen sein. PF-189 und PF-183 hingegen konnten die Apoptose nicht inhibieren und dieser Einfluss muss *in vivo* genauer untersucht werden. Wie schon die Ergebnisse bei der Messung der Apoptose mittels Durchflusszytometrie zeigten, konnte PF-183 die Apoptose der Zellen nicht ausreichend hemmen.

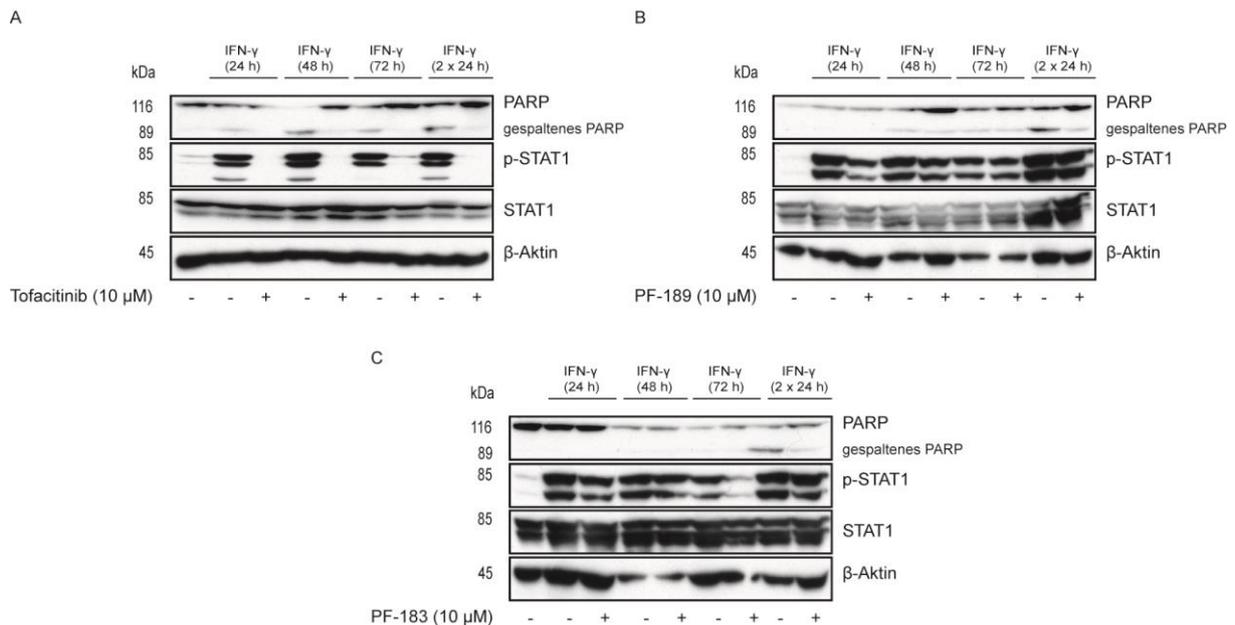


Abbildung 5-31: Zusammenhang zwischen p-STAT1-Aktivierung und Apoptose

HT-29 Zellen wurden für 2 h mit 10 μ M Tofacitinib, PF-189 und PF-183 behandelt. Anschließend wurden die Zellen 24, 48, 72 und 2 x 24 h mit IFN- γ (100 ng/ml) stimuliert. Die einzelnen Proteine wurden mittels Western-Blot-Analyse bestimmt. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung dienen die unphosphorylierten Proteine und β -Aktin. IFN- γ : Interferon- γ , kDa: Kilodalton, μ M: Mikromolar, h: Stunde, PARP: Poly(ADP-ribose)-Polymerase, STAT: *signal transducer and activator of transcription*

5.3 *In vitro* Studien mit Organoiden murinen Ursprungs

5.3.1 Einfluss von Tofacitinib, PF-189 und PF-183 auf Stammzell- und Differenzierungsmarker der Organoiden

Organoiden fungieren als ein *in vitro* Modell zur Gewinnung von Erkenntnissen bezüglich der Erneuerung von Geweben oder über die Auswirkung von Wirkstoffen auf die Entwicklung der Organoiden und der Differenzierung von Stammzellen [241]. Sie ähneln stark dem Ursprungsgewebe in Bezug auf Aufbau und Zellpopulation und sind nicht durch Mutationen verändert.

Aus diesem Grund wurde der Einfluss von Tofacitinib und den Amidoxim-Prodrugs auf Stammzell- und Differenzierungsmarker der Organoiden untersucht. Hierfür wurden die Organoiden zehn Tage mit den jeweiligen Substanzen behandelt. Bei den in der vorliegenden Studie untersuchten Stammzellmarkern, wie *Lgr5*, *Ascl2* und *Olfm4* konnte keine veränderte mRNA Expression durch die getesteten Substanzen festgestellt werden (Abbildung 5-32 A, B, C). Weiterhin konnte kein Einfluss auf die mRNA Level von *Muc2*, *Lyz1* und *Villin1* beobachtet werden, die hier als respektive Marker für ausdifferenzierte Becherzellen, Paneth-Zellen und Enterozyten verwendet wurden (Abbildung 5-32 D, E, F).

Die Behandlung der Organoiden mit Tofacitinib, PF-189 und PF-183 führte somit zu keiner Beeinträchtigung der Stammzell- bzw. Differenzierungsmarker. Somit haben sie keinen negativen Effekt auf die Regeneration und Erneuerung des intestinalen Epithels.

106 Ergebnisse

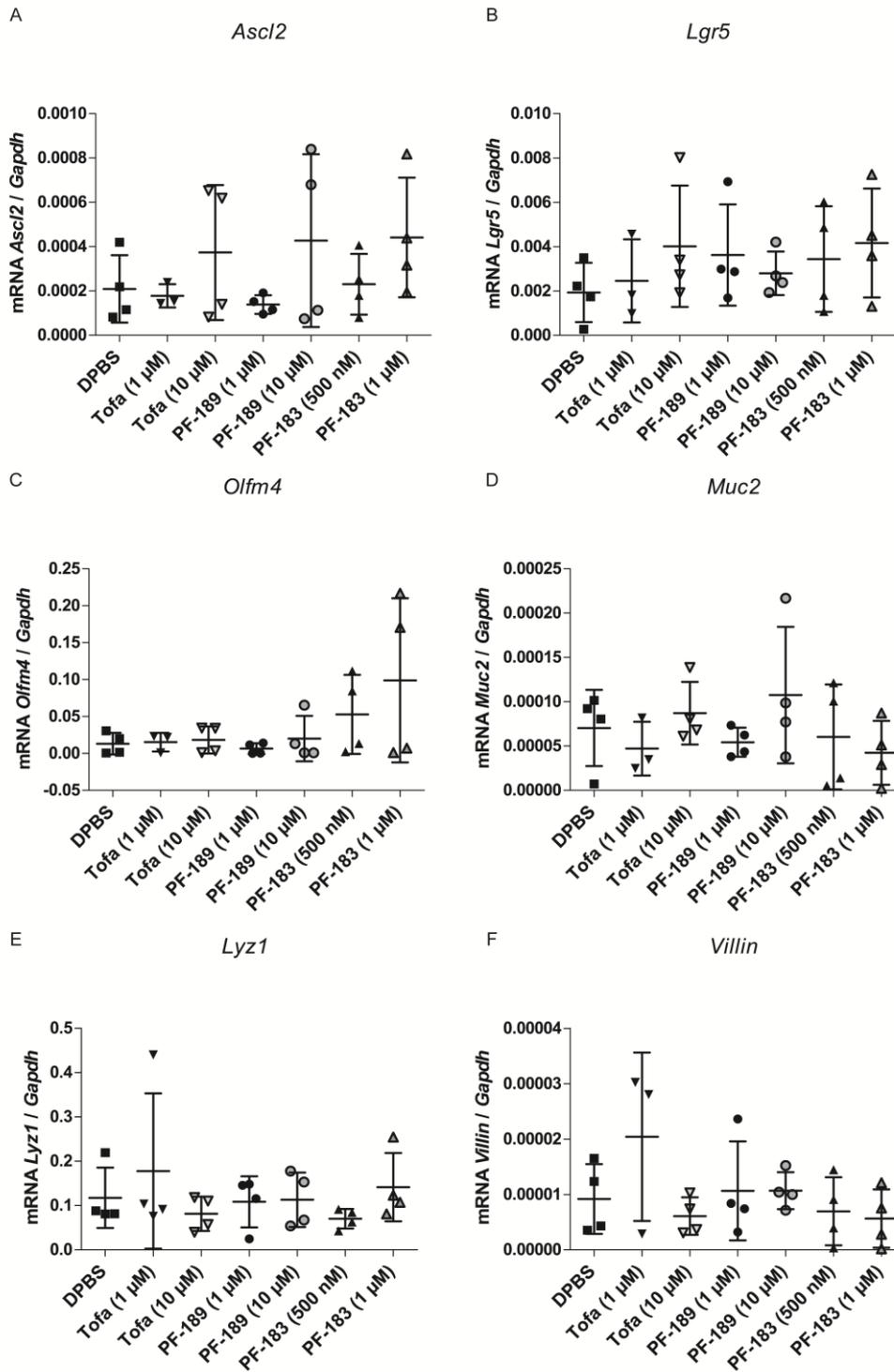


Abbildung 5-32: qPCR zur Bestimmung von Stammzell- und Differenzierungsmarkern

Nach der 4. Passage wurden die Organoide 10 Tage mit 10 µM Tofacitinib, PF-189 oder PF-183 behandelt. Anschließend wurden 2 Proben gepoolt um die Anzahl der Organoide zu erhöhen und in 350 µl RLT+2-Mercaptoethanol-Puffer aufgenommen. Mittels des RNeasy Mini Kit wurde die RNA isoliert. Die komplementäre DNA wurde hergestellt und eine qPCR durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von Organoiden gewonnen aus 2 verschiedenen Mäusen. DPBS: Dulbecco's Phospho buffered saline diente als Negativkontrolle. µM: Mikromolar, Ascl: *achaete-scute complex homolog*, Olfm: *olfactomedin*, Muc: *mucin*, Lyz: *lysozym*

5.3.2 JAK/STAT-Signalweg in Organoiden

Die Inhibition des JAK/STAT-Signalweges in Organoiden wurde ebenfalls untersucht, um die inhibitorische Kapazität in Primärzellen zu bestimmen. Hierbei wurden die Organoide 2 h mit 1 oder 10 μM der jeweiligen Substanz inkubiert und anschließend mit IL-22 oder IFN- γ (jeweils 100 ng/ml) für 30 min stimuliert. Wie bereits in der humanen HT-29 Zelllinie (s. Kap. 5.2.1.5) führte die Stimulation mit IL-22 zur Phosphorylierung und somit Aktivierung von STAT3, wohingegen nach einer IFN- γ -Stimulation die Phosphorylierung von STAT1 zu beobachten war. Andere Zytokine, wie IL-6 und hIL-6 zeigten keine Aktivierung des Signalweges in Organoiden (Daten nicht gezeigt). Die Kombination aus Behandlung mit 1 μM Tofacitinib und einer IL-22-Stimulation führte zu einer schwachen Inhibition der Phosphorylierung von STAT3, während die Behandlung mit 10 μM Tofacitinib eine vollständige Inhibition hervorriefte (Abbildung 5-33 A). Die IFN- γ vermittelte Phosphorylierung von STAT1 wurde bei beiden Konzentrationen von Tofacitinib inhibiert (Abbildung 5-33 B). PF-189 dagegen konnte weder bei einer Konzentration von 1 μM noch bei 10 μM die IL-22-vermittelte STAT3-Phosphorylierung inhibieren (Abbildung 5-33 C). PF-183 inhibierte wie das Tofacitinib die Phosphorylierung von STAT3. Dabei zeigte es eine schwache Inhibition von p-STAT3 bei einer Konzentration von 1 μM , konnte jedoch bei einer Erhöhung der Konzentration auf 10 μM die Phosphorylierung vollständig inhibieren (Abbildung 5-33 D).

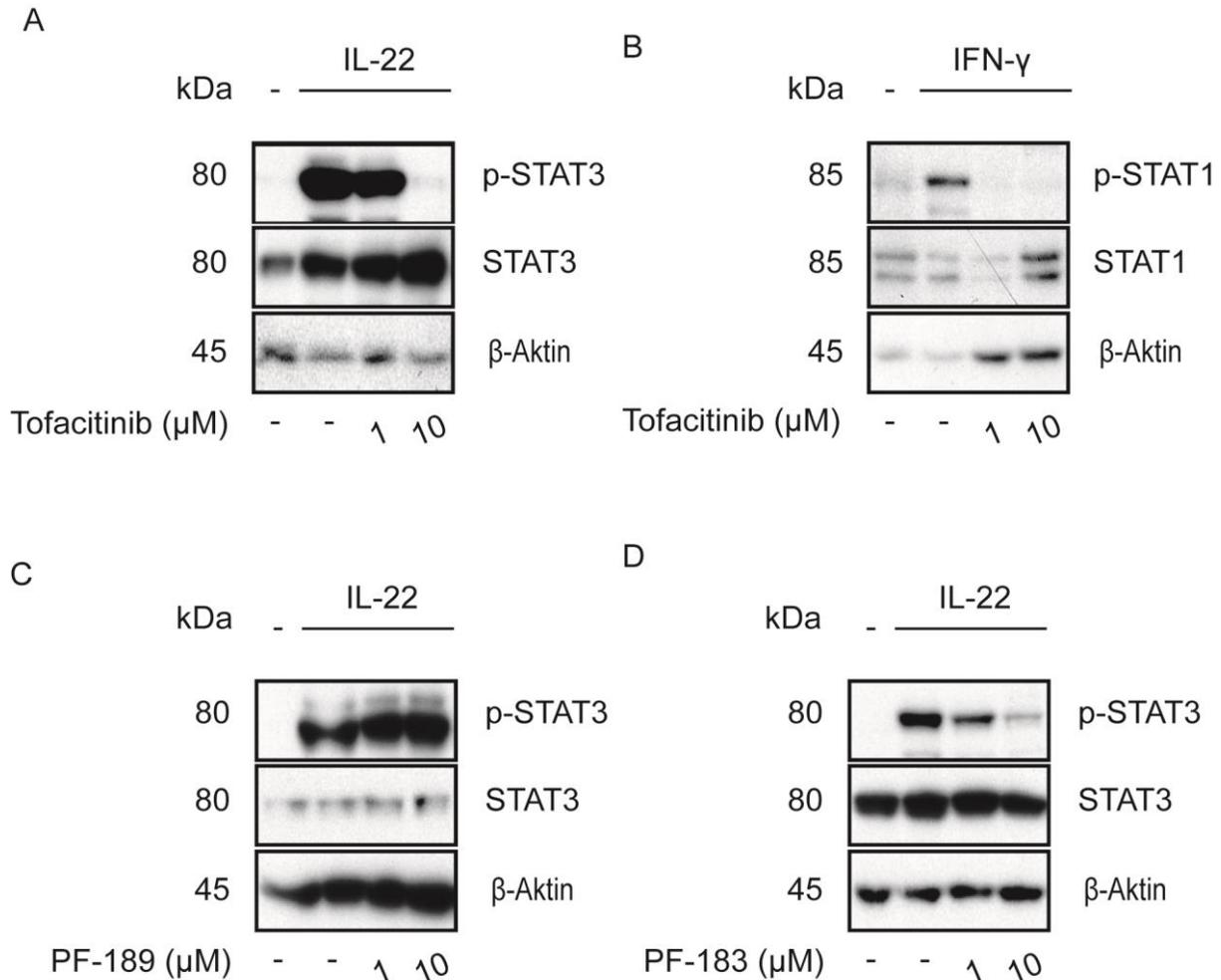


Abbildung 5-33 Inhibition des IL-22- oder IFN-γ-vermittelten JAK/STAT-Signalweges durch Tofacitinib, PF-189 und PF-183 in Organoiden

Nach der 3. Passage wurden die Organoiden 2 h vorher mit 1 oder 10 μM Tofacitinib, PF-189 oder PF-183 behandelt. Anschließend wurden sie mit IL-22 (100 ng/ml) und IFN-γ (100 ng/ml) für 30 min stimuliert. Die einzelnen Proteine wurden mittels Western Blot Analyse detektiert. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung dienten die unphosphorylierten Proteine und β-Aktin. Bestimmung der Proteinlevel erfolgte mittels Western Blot Analyse. Die dargestellten Western Blots repräsentieren zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimente. DPBS: Dulbecco's Phospho buffered saline diente als Negativkontrolle. IL: Interleukin, μM: Mikromolar, kDa: Kilodalton, STAT: *signal transducer and activator of transcription*

5.4 In vivo Studien

5.4.1 Expressionslevel von JAK- und STAT-Proteinen im murinen Darm

Zur Bestimmung der Expression der einzelnen JAK-/STAT-Proteine wurden aus verschiedenen anatomischen Bereichen des murinen Darms Proben entnommen und auf die Expression der JAK- und STAT-Proteine untersucht.

Tyk2, JAK2, STAT3 und STAT1 konnten in jedem Abschnitt des Dünndarmes und im Kolon nachgewiesen werden. Jedoch wurde Tyk2 und STAT1 hauptsächlich im

Jejunum und *Ileum* exprimiert, während JAK2 vorwiegend im *Jejunum*, *Ileum* und Kolon detektiert wurde. JAK1 als auch JAK3 wurden nicht im Duodenum exprimiert. STAT6 konnte nicht im *Duodenum* und nur zu einer geringen Konzentration im Kolon bestimmt werden. STAT5 konnte in keinem Abschnitt nachgewiesen werden.

Sowohl die JAK- als auch die STAT-Proteine sind im kompletten murinem Darm exprimiert. Somit ist der medikamentöse Einsatz von JAK-Inhibitoren begründet.

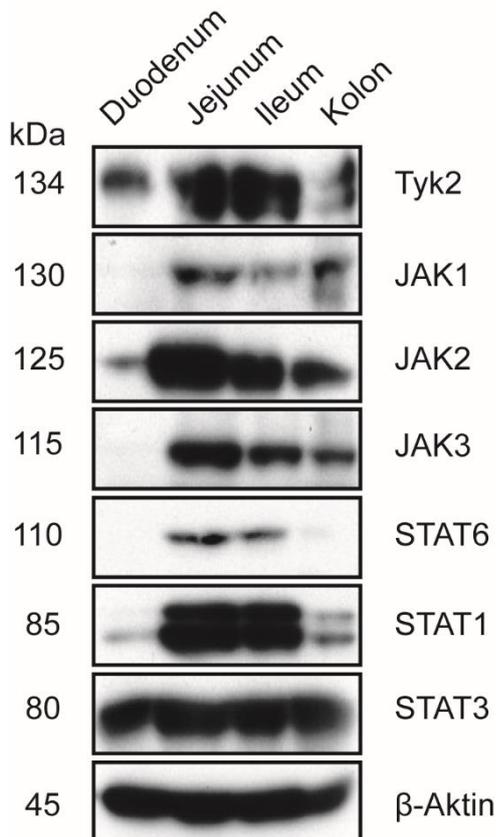


Abbildung 5-34 Expressionsmuster der JAK/STAT-Proteine im murinen GIT

Stücke des Doudenums, Jejunums, Ileums und Kolon wurde der Maus entnommen und die einzelnen Proteine mittels Western Blot Analytik bestimmt. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung dienen die unphosphorylierten Proteine und β -Aktin. kDa: Kilodalton, JAK: Janus Kinase, STAT: *signal transducer and activator of transcription*.

5.4.2 Bioverfügbarkeit von Tofacitinib in der Maus nach rektaler oder i.p. Gabe

Die Tofacitinib-spezifischen Nebenwirkungen treten auf, da sich Tofacitinib nach oraler Gabe systemisch verteilt und in jedem Gewebe eine Inhibition des JAK/STAT-Signalweges bewirkt. In diesem Abschnitt sollte geklärt werden, ob eine gezielte rektale Gabe dazu führt, dass Tofacitinib nur am Entzündungsort, dem Darm, verbleibt oder ob es systemisch verteilt wird. Die intraperitoneale (i.p.) Gabe dient als Simulation der systemischen Verteilung. Hiefür wurde der Tierversuch, wie in

110 Ergebnisse

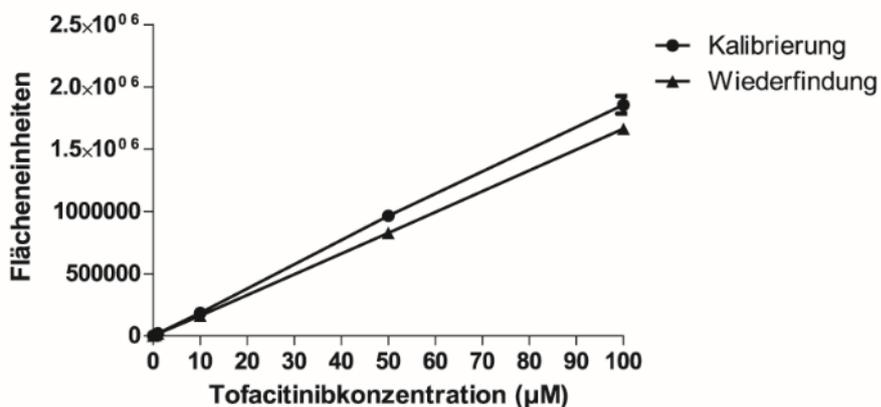
Kap. 4.7.1.1 beschrieben, durchgeführt. Die Organe wurden dann mittels HPLC-Analytik vermessen (s. Kap. 4.7.1.4).

5.4.2.1 Kalibrierung und Wiederfindung von Tofacitinib

Bevor die Bioverfügbarkeit von Tofacitinib in den einzelnen Organen bestimmt werden konnte, musste die HPLC-Methode auf Linearität, Wiederfindung und Richtigkeit validiert werden.

Die Kalibriergerade wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,05-100 μM erstellt. Dabei war sie linear ($R^2=0,9997$) und die Richtigkeit in diesem Bereich betrug $100 \pm 7,5 \%$ (Abbildung 5-35). Mithilfe der Kalibriergerade wurde eine Wiederfindung von Tofacitinib im selben Konzentrationsbereich in muriner Leber ermittelt. Dabei betrug die Wiederfindung $99 \pm 8,4 \%$ bei einer Linearität von $R^2=1$. Die Richtigkeit bei der Bestimmungsgrenze von 0,5 μM betrug 88 %. Ein repräsentatives HPLC-Chromatogramm ist in Abbildung 5-36 gezeigt.

Die entwickelte HPLC-Methode zeigte eine ausreichende Wiederfindung und Linearität und war somit optimal zur Detektion von Tofacitinib in murinen Proben geeignet.



5-35: Kalibrierung und Wiederfindung von Tofacitinib

Die Kalibrierung erfolgte mit Tofacitinib in einem Konzentrationsbereich von 0,05-100 μM . Für die Wiederfindung wurden die Standardkonzentrationen verwendet und mit muriner Leber aufgearbeitet. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung zweier unabhängig voneinander durchgeführten Messungen.

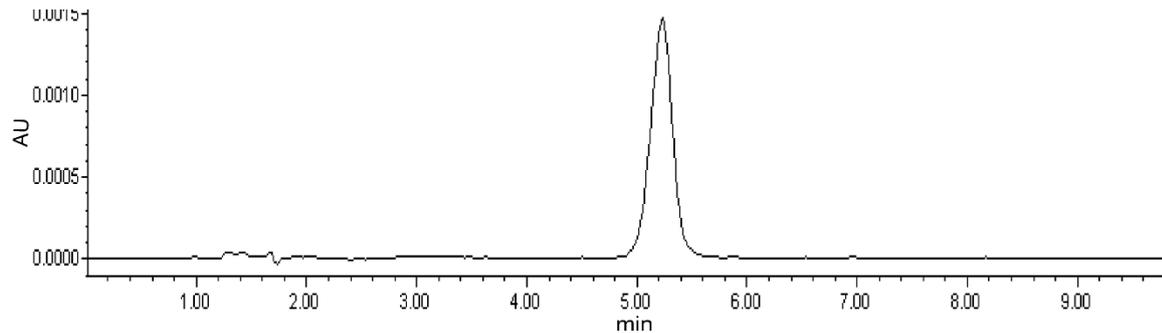


Abbildung 5-36 Repräsentatives HPLC-Chromatogramm

Dargestellt ist der Peak von 1 μM Tofacitinib mit einer Retentionszeit von 5,2 min. AU: *absorption units*, min: Minute

5.4.2.2 Bestimmung von Tofacitinib nach rektaler oder intraperitonealer Gabe

Es sollte bestimmt werden, ob eine gezielte rektale Gabe von Tofacitinib zu einer verminderten systemischen Aufnahme führt und eine Verminderung der auftretenden Nebenwirkungen bewirkt. Im Vergleich dazu wurde Tofacitinib i.p. gegeben.

Dabei wurde deutlich, dass die gezielte rektale Gabe die systemische Aufnahme von Tofacitinib nicht minimiert. Ganz im Gegensatz konnten große Mengen an Tofacitinib in der Niere und geringere Mengen in Leber und Kolon detektiert werden (Abbildung 5-37). Im Vergleich dazu zeigte die i.p. Gabe ähnliche Anreicherungen in den Organen. Hier konnte eine hohe Konzentration in der Niere gefunden werden (Abbildung 5-37). Interessanterweise konnte auch ein Teil von Tofacitinib im Kolon nachgewiesen werden. Zusammengefasst konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der rektalen und i.p. Gabe bestimmt werden.

Eine gezielte rektale Applikation vermindert die systemische Aufnahme von Tofacitinib nicht, weil es schnell systemisch verteilt wurde und nicht mehr am Hauptort der Entzündung, dem Kolon, wirken, konnte.

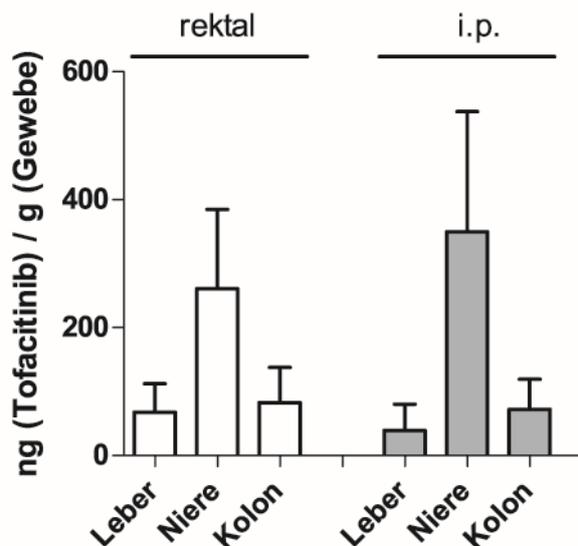


Abbildung 5-37: Konzentration von Tofacitinib nach rektaler und intraperitonealer (i.p.) Applikation

Tofacitinib wurde C57BL/6J Mäusen für 90 min rektal oder i.p. appliziert. Die Tiere wurden getötet, die Organe entnommen, aufgearbeitet und mittels HPLC-Analytik vermessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n=5$ pro Applikationsweg. i.p.: intraperitoneal.

Tabelle 5-1: Tofacitinibkonzentrationen in den Organen.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von Tofacitinib in den einzelnen Organen von $n=5$ pro Applikationsweg. i.p.: intraperitoneal.

Gewebe	Tofacitinibkonzentration in ng/ g Gewebe	
	Rektal	i.p.
Leber	67,7 \pm 44,5	39,5 \pm 40,6
Niere	260,5 \pm 124,4	349,6 \pm 188,4
Kolon	34,4 \pm 53,9	40,2 \pm 50,6

5.4.3 Überprüfung der Funktion des Amidoxim-Prodrug-Prinzips mit PF-189 und PF-183

In diesem Abschnitt sollte das Amidoxim-Prodrug-Prinzip in Bezug auf die Funktionalität überprüft werden. Dabei sollten die Amidoxim-Prodrugs PF-189 und PF-183 rektal verabreicht werden. Im Kolon sollten sie in die IECs diffundieren, wo sie durch das mARC-Enzymsystem zu den Amidinen reduziert werden, welche aufgrund des physiologischen pH-Wertes protoniert vorliegen und nicht mehr durch Diffusion aus der Zelle ausgeschleust werden können. Das würde dazu führen, dass weder in der Leber noch in der Niere Amidoxim oder Amidin nachgewiesen werden könnten. Jedoch sollte das Amidin im Kolon detektierbar sein. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass auch Darmbakterien eine Reduktion von Amidoximen katalysieren [242]. Darüberhinaus könnte es zu einer Absorption von Amidoximen

kommen und erst systemisch, spätestens in der Leber, zu einer Reduktion zu Amidinen. Dann könnten Amidine auch in Organen nachgewiesen werden. Um die Funktion des Prodrug-Prinzips zu überprüfen wurde ein Tierstudien-Design, wie in Kap. 4.7.2.1 dargestellt, gewählt. Nach Beenden des Versuches wurden Leber, Niere, Milz und Kolon entnommen, aufgearbeitet (s. Kap. 4.7.1.3) und mittels HPLC-Analytik vermessen (s. Kap. 4.7.2.4, 4.7.2.5).

5.4.3.1 Kalibrierung und Wiederfindung von dem Amidoxim PF-189 und dem korrespondierendem Amidin PF-192

Bevor die Konzentrationen am Amidoxim PF-189 und dem korrespondierendem Amidin PF-192 oder dem Amidoxim PF-183 und dem korrespondierendem Amidin PF-185 in den einzelnen Organen ermittelt werden konnten, musste die HPLC-Methode auf Linearität, Wiederfindung und Richtigkeit validiert werden.

Die Kalibriergerade für PF-189 und PF-192 wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,5-100 μM erstellt (Abbildung 5-38). Dabei war sie für PF-189 linear ($R^2=0,994$) und die Richtigkeit in diesem Bereich betrug $93 \pm 13,7 \%$. Für PF-192 betrug die Linearität $R^2=0,999$ mit einer Richtigkeit von $74 \pm 16,9 \%$. Mithilfe der Kalibriergeraden wurde eine Wiederfindung im selben Konzentrationsbereich in der murinen Leber ermittelt. Dabei betrug die Wiederfindung für PF-189 $74 \pm 16,4 \%$ bei einer Linearität von $R^2=0,989$ und für PF-192 lag die Wiederfindung bei $51 \pm 16,6 \%$ bei einer Linearität von $R^2=0,994$. Die Bestimmungsgrenze betrug 1 μM . Ein repräsentatives Chromatogramm von PF-189 und PF-192 ist in Abbildung 5-39 gezeigt.

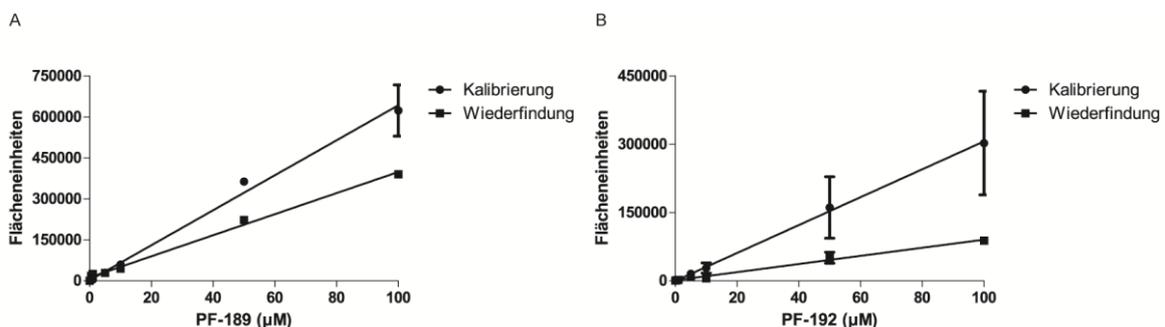


Abbildung 5-38: Kalibrierung und Wiederfindung

A: Die Kalibrierung und Wiederfindung in muriner Leber erfolgte mit dem Amidoxim PF-189 in einem Konzentrationsbereich von 0,05-100 μM . B: Die Kalibrierung und Wiederfindung in muriner Leber erfolgte mit dem Amidin PF-192 in einem Konzentrationsbereich von 0,05-100 μM . Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung zweier unabhängig voneinander durchgeführten Messungen. μM : Mikromolar.

114 Ergebnisse

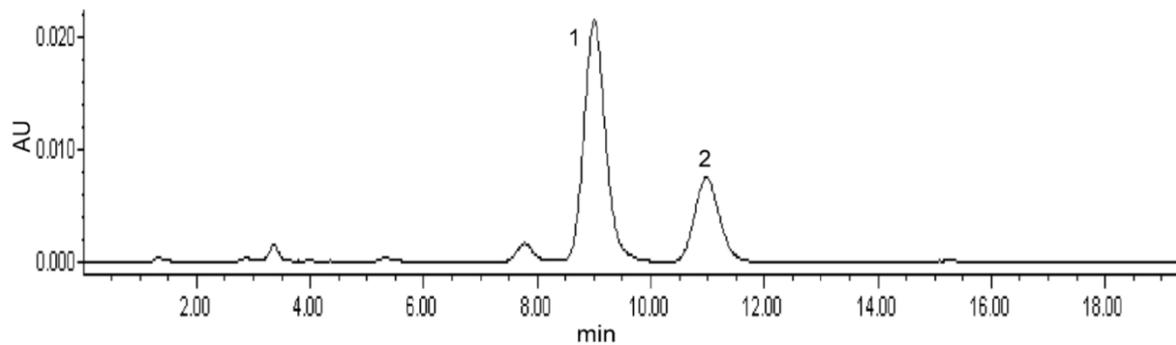


Abbildung 5-39: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm vom Amidoxim PF-189 und dem Amidin PF-192
Dargestellt sind die Peaks von 100 μM PF-189 (1) und PF-192 (2). AU: *absorption units*, min: Minute

5.4.3.2 Kalibrierung und Wiederfindung von dem Amidoxim PF-183 und dem korrespondierendem Amidin PF-185

Die Kalibriergerade für das Amidoxim PF-183 und das Amidin PF-185 wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,5-100 μM erstellt (Abbildung 5-40). Für PF-183 betrug die Linearität $R^2=0,995$ mit einer Richtigkeit von $77 \pm 28,2\%$ (Abbildung 5-40 A) und für PF-185 die Linearität von $R^2=0,99$ und die Richtigkeit in diesem Bereich betrug $80 \pm 29,9\%$ (Abbildung 5-40 B). Mithilfe der Kalibriergeraden wurde eine Wiederfindung im selben Konzentrationsbereich in muriner Leber ermittelt. Die Wiederfindung wurde im selben Konzentrationsbereich bestimmt. Die Wiederfindung von PF-183 lag bei $8 \pm 9,9\%$. Interessanterweise lag die Wiederfindung in dem Konzentrationsbereich von 0,5-5 μM bei $74 \pm 39,8\%$. Für PF-185 betrug die Wiederfindung $41 \pm 44,2\%$. Ein repräsentatives Chromatogramm von PF-183 und PF-185 ist in Abbildung 5-41 gezeigt.

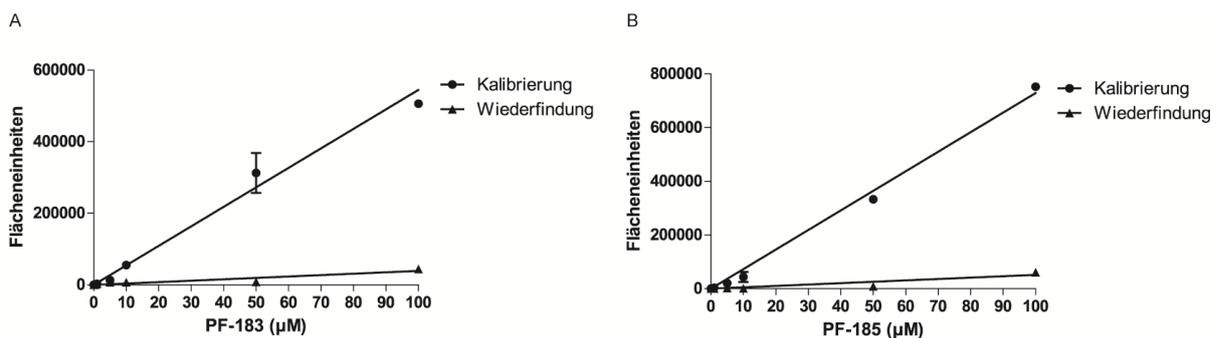


Abbildung 5-40: Kalibrierung und Wiederfindung

A: Die Kalibrierung und Wiederfindung in muriner Leber erfolgte mit dem Amidoxim PF-183 in einem Konzentrationsbereich von 0,05-100 μM . B: Die Kalibrierung und Wiederfindung in muriner Leber erfolgte mit dem Amidin PF-185 in einem Konzentrationsbereich von 0,05-100 μM . Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung zweier unabhängig voneinander durchgeführten Messungen. μM : Mikromolar

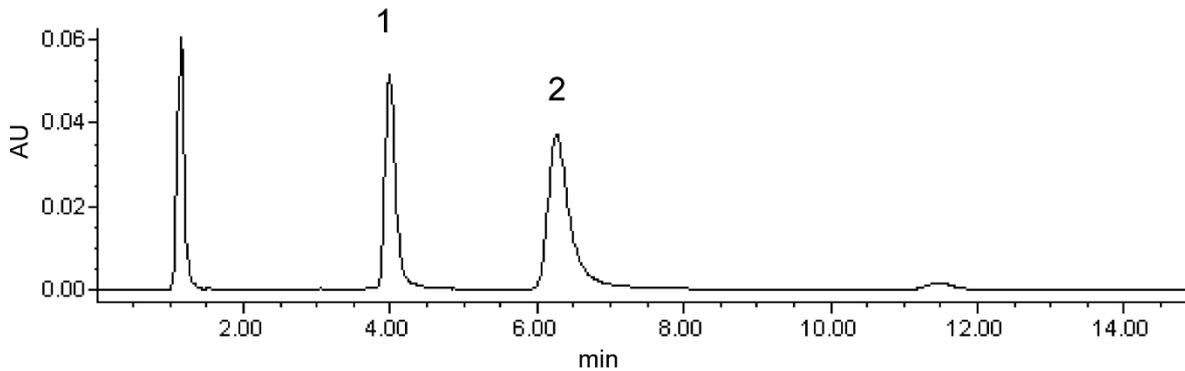


Abbildung 5-41: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm vom Amidoxim PF-183 und dem Amidin PF-185
Dargestellt sind die Peaks von 100 μM PF-185 (1) und PF-183 (2). AU: *absorption units*, min: Minute.

5.4.3.3 Konzentrationen von PF-189/PF-192 und PF-183/PF-185

Zur Bestimmung der Amidoxime und Amidine wurden Leber, Niere, Milz und Kolon, wie in Kap. 4.7.2.4 beschrieben, aufgearbeitet und mittels HPLC gemessen. PF-189 oder PF-192 konnten weder in Leber, Niere noch Milz detektiert werden, während das Amidin im Kolon nachgewiesen werden konnte. Es befanden sich $14 \pm 0,4 \mu\text{g/g}$ Amidin, jedoch kein Amidoxim im Kolon.

PF-183 oder PF-185 konnten nicht in der Leber, Niere oder Milz, aber im Kolon nachgewiesen werden. Im Kolon befand sich sowohl das Amidin mit $6 \pm 0,4 \mu\text{g/g}$, als auch das Amidoxim mit $2 \pm 1 \mu\text{g/g}$.

Es wurde keine Substanz systemisch aufgenommen, wodurch das Risiko für systemische Nebenwirkungen sinkt. Somit konnten die Substanzen für die DSS-Kolitis verwendet werden.

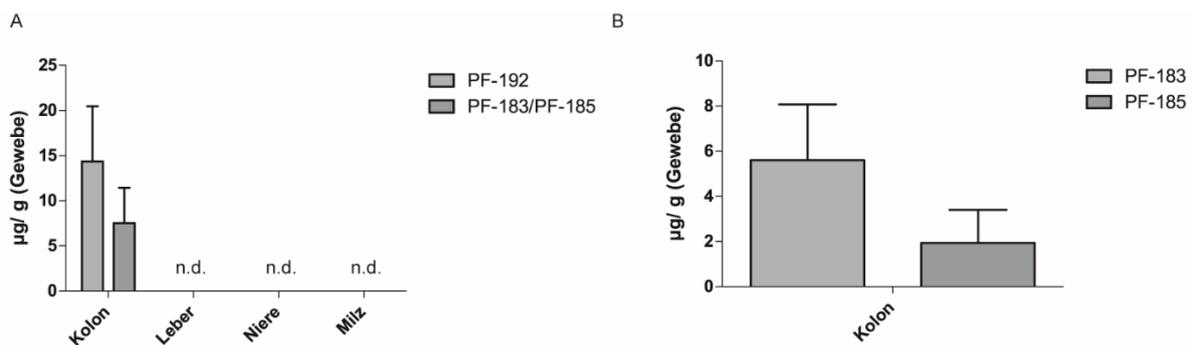


Abbildung 5-42: Konzentration von PF-189/PF-192 und PF-183/PF-185 in den Organen

Die Substanzen PF-189 und PF-183 wurden C57BL/6J Mäusen für 90 min rektal appliziert. Die Tiere wurden getötet, die Organe entnommen, aufgearbeitet und mittels HPLC-Analytik vermessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n=4$.

5.4.4 Einfluss von Tofacitinib, PF-189 und PF-183 auf gesunde Mäuse

Bevor eine akute DSS-induzierte Kolitis in den Mäusen durchgeführt werden konnte, musste überprüft werden, ob die Behandlung mit Tofacitinib, PF-189 und PF-183 einen negativen Einfluss auf die Tiere ausübte. Hierfür wurden die Gewichtskurven der Mäuse betrachtet. Zur Beurteilung des Einflusses auf das intestinale Epithel des Kolons wurden histologische Färbungen des Kolons durchgeführt.

Es wurde deutlich, dass die Tiere während der Behandlung kein Gewicht verloren. Somit zeigte die Behandlung mit Tofacitinib, PF-189 und PF-183 keinen sichtbaren Einfluss auf die Tiere (Abbildung 5-42).

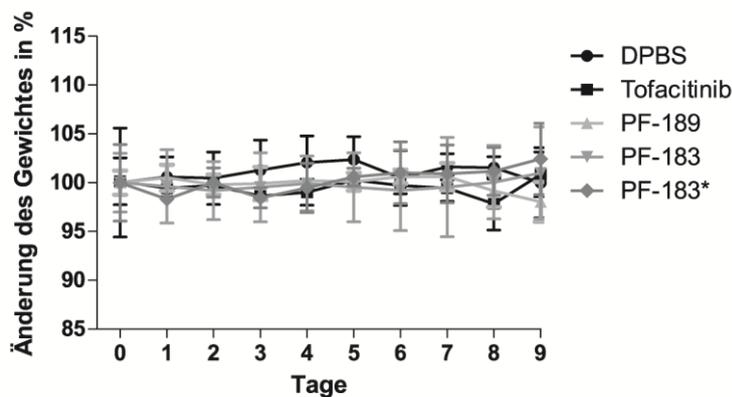


Abbildung 5-43: Gewichtskurve gesunder Tiere während der Behandlung mit Tofacitinib, PF-189 und PF-183

Autoklaviertes Leitungswasser wurde über 10 Tage verabreicht. Tofacitinib, PF-189 und PF-183 und DPBS wurden C57BL/6J Mäusen über 9 Tage rektal appliziert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n=3$ (DPBS, Tofacitinib: 30 mg/kg KG, PF-183: 0,1 mg/kg KG) und $n=4$ (PF-189: 30 mg/kg KG, PF-183: 30 mg/kg KG). DPBS: Dulbecco's Phospho buffered saline.

Die Funktionalität von STAT3 auf die Wundheilung und Proliferation der Zellen wurde in Kap. 5.2.2 beschrieben. Nun sollte nachgewiesen werden, ob die gezielte Inhibition des JAK/STAT-Signalweges durch die Amidoxim-Prodrugs und Tofacitinib in IECs eine Auswirkung auf die Proliferation hat.

Hierfür wurde die Anzahl der Zellen bestimmt, die zum Zeitpunkt des Todes der Mäuse noch aktiv waren und die allgemeine Anzahl der proliferierenden Zellen. Zur Bestimmung der proliferierenden Zellen, die kurz vor dem Tod der Mäuse noch aktiv waren, wurde 90 min vor Tötung der Tiere BrdU (Brom-desoxyuridin) i.p. gespritzt. Es wurde die Anzahl BrdU-positiver Zellen von 100 Krypten unter dem Mikroskop bestimmt (Abbildung 5-43 A).

Eine gesteigerte Anzahl BrdU-positiver Zellen war nach der Behandlung mit PF-183 nachweisbar (Abbildung 5-43 A).

Zur Bestimmung aller proliferierenden Zellen wurde Ki67 in IECs bestimmt, welches als Marker fungiert (Abbildung 5-43 B). Hierbei konnte eine signifikante Abnahme der proliferierenden Zellen nach Behandlung mit Tofacitinib nachgewiesen werden (Abbildung 5-43 B).

Desweiteren sollte untersucht werden, ob die Behandlung mit den einzelnen Substanzen eine Apoptose im intestinalen Epithel des Kolons der Maus induzierte. Hierfür wurden im Kolon DNA-Fragmente markiert, die durch Apoptose in den Zellen entstanden (Abbildung 5-43 C). Eine gesteigerte Anzahl an toten Zellen konnte nach keiner der Behandlungen detektiert werden (Abbildung 5-43 C).

Nach Bewertung der Ergebnisse hatten die Amidoxim-Prodrugs keinen negativen Einfluss auf proliferierende Zellen und führten nicht zu einer Apoptose, wodurch sie für die Durchführung einer akuten induzierten Kolitis geeignet sind. Tofacitinib könnte möglicherweise im DSS-Kolitis-Modell zu einer Inhibition der proliferierenden Zellen führen.

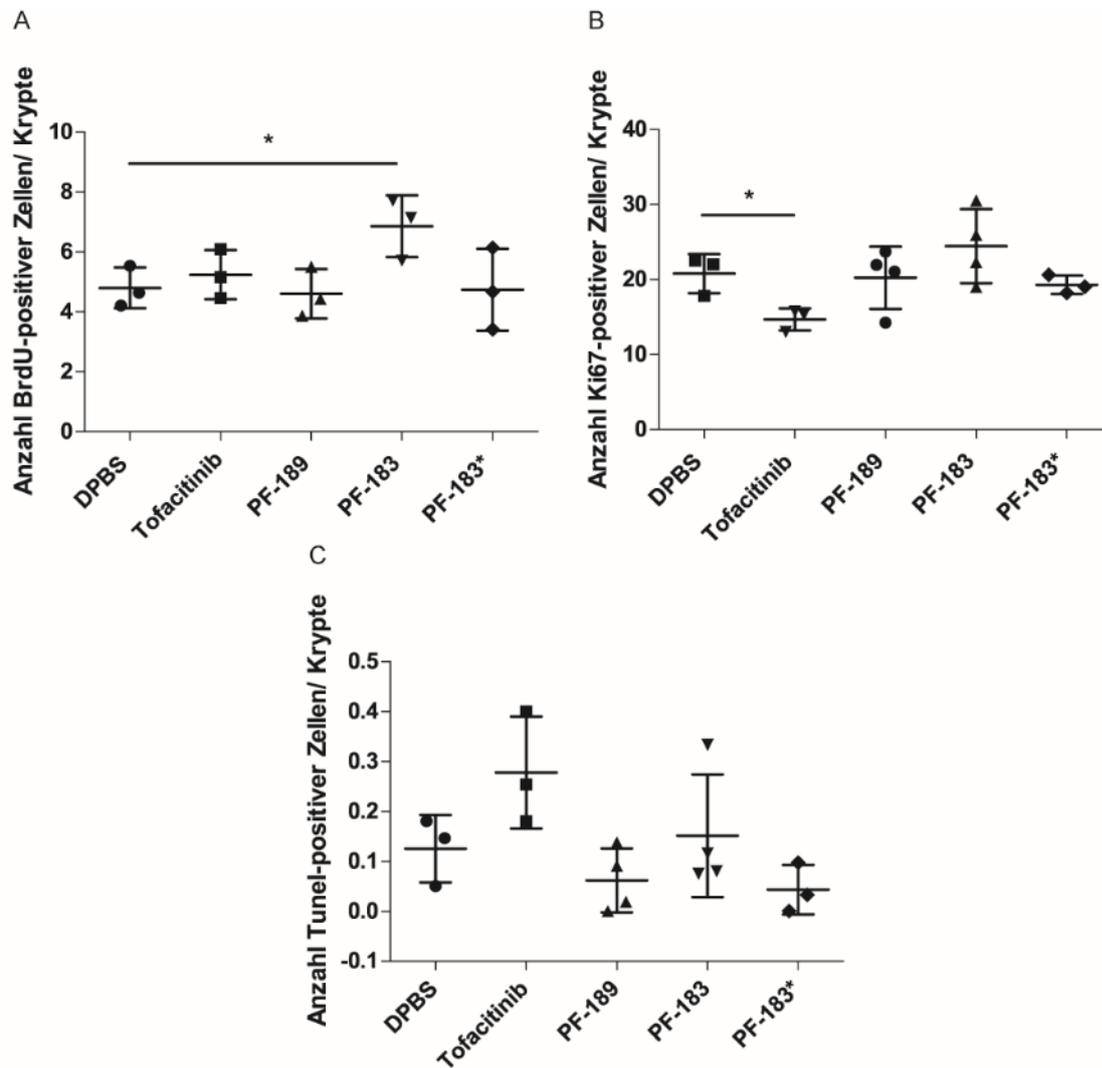


Abbildung 5-44: Bestimmung proliferierender und apoptotischer Zellen nach Behandlung mit Tofacitinib, PF-189 und PF-183

Autoklaviertes Leitungswasser wurde 10 Tage verabreicht. Tofacitinib, PF-189 und PF-183 und DPBS wurden C57BL/6J Mäusen über 9 Tage rektal appliziert. A, B: In Paraffin eingebettetes Kolon wurde mit dem Proliferationsmarker BrdU und Ki67 gefärbt. C: Markierung der apoptotischen Zellen mittels TDT. Zur Bestimmung der Anzahl positiver Zellen wurden 100 Krypten gezählt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von DPBS n=3, Tofacitinib n=3, PF-189 n=4, PF-183 n= 4, PF-183* n=3. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. $^* = p < 0,05$. DPBS: Dulbecco's Phospho buffered saline.

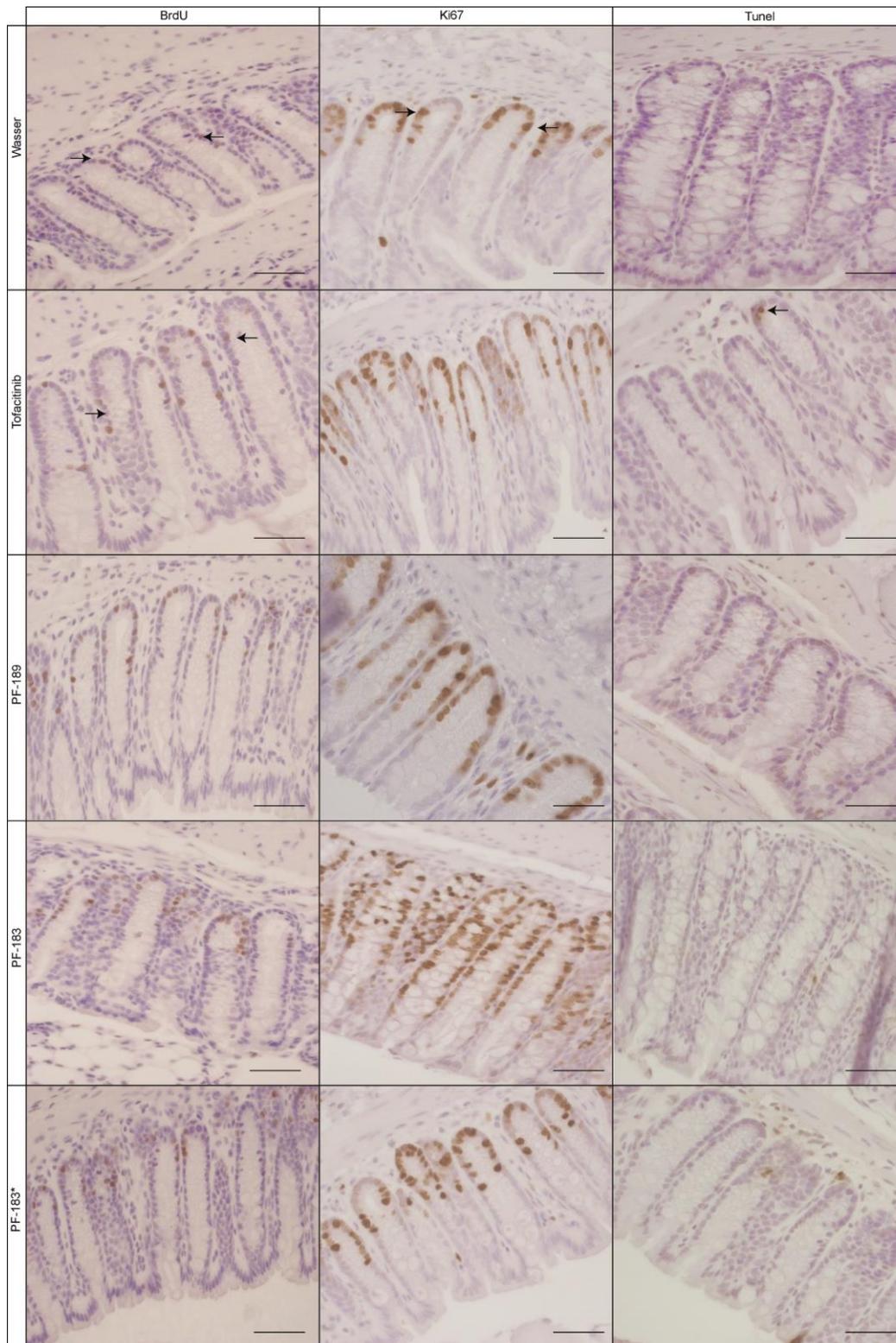


Abbildung 5-45: Histologische Färbungen des Kolons nach Behandlung mit Tofacitinib, PF-189 und PF-183
 Autoklaviertes Leitungswasser wurde 10 Tage verabreicht. Tofacitinib, PF-189 und PF-183 und DPBS wurden C57BL/6J Mäusen über 9 Tage rektal appliziert. In Paraffin eingebettetes Kolon wurde mit dem Proliferationsmarker BrdU und Ki67 gefärbt und die apoptotischen Zellen mittels TDT markiert. Positive Zellen sind braun eingefärbt. Die Bilder wurden mittels Transmissionsmikroskop ausgewertet und sind repräsentativ für 8 Mäuse pro Behandlung. Maßstabsbalken entsprechen 100 µm. BrdU: Bromdesoxyuridin, Ki67: Ki67, Tunel: *terminal desoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling*.

5.4.5 Wirkung von Tofacitinib, PF-189 und PF-183 auf eine akute DSS-Kolitis

Nachdem die Funktionalität der Amidoxim-Prodrugs bestätigt wurde, sollte nun die Wirksamkeit von PF-189 und PF-183 auf eine intestinale Entzündung in einem Modell einer akuten DSS-induzierten (*dextran sodium sulfate*) Kolitis bestimmt werden. Zusätzlich sollte mit der Applikation einer geringeren Konzentration von PF-183 getestet werden, ob eine selektive Inhibition des JAK3-Proteins die Entwicklung und das Fortschreiten einer intestinalen Entzündung hemmt.

Zuerst wurden zur Beurteilung des Krankheitsverlaufes und der Wirkung der einzelnen Substanzen die Gewichtskurven der Mäuse betrachtet (Abbildung 5-45). Die Induktion einer akuten Kolitis mittels DSS zeigte einen beginnenden Gewichtsverlust nach 4 Tagen (Abbildung 5-45).

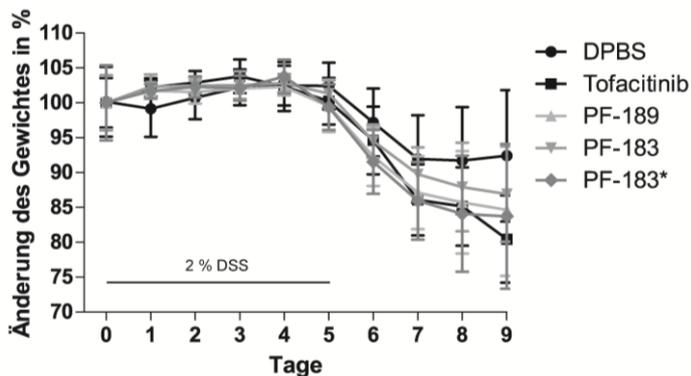


Abbildung 5-46: Gewichtskurve während der Induktion einer akuten Kolitis und simultaner Behandlung mit Tofacitinib, PF-189 und PF-183

2 % DSS wurden über 5 Tage im Trinkwasser verabreicht. Tofacitinib, PF-189 und PF-183 und DPBS wurden C57BL/6J Mäusen über 9 Tage rektal appliziert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n = 8$ pro Gruppe. DPBS: Dulbecco's Phospho buffered saline.

Zum besseren Vergleich der einzelnen Behandlungen mit DPBS wurden die Grafiken einzeln dargestellt. Die Behandlung mit Tofacitinib zeigte im Vergleich zu DPBS einen signifikanten Unterschied (Abbildung 5-46 A). Die Tiere, die mit Tofacitinib behandelt wurden, verloren stark an Gewicht (Abbildung 5-47 A). Die Gewichtsabnahmen nach Behandlung mit PF-189, PF-183 oder PF-183* waren im Vergleich zu DPBS nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 5-46 B, C, D).

Die Behandlung mit den Amidoxim-Prodrugs zeigte keine Zunahme des Gewichtes gegenüber der Behandlung mit DPBS. Jedoch verlief die Behandlung mit Tofacitinib viel schlechter als mit den Amidoxim-Prodrugs. Sie zeigen somit eine Überlegenheit gegenüber Tofacitinib.

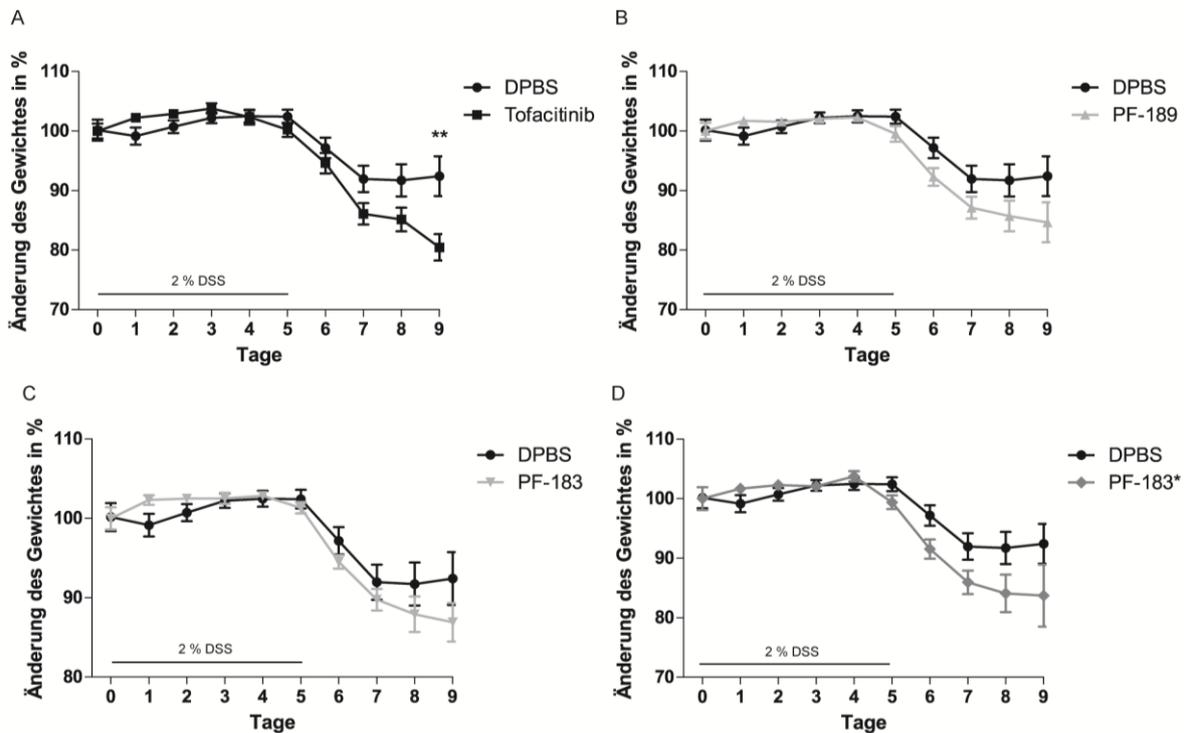


Abbildung 5-47: Gewichtscurven nach Induktion einer akuten Kolitis nach Behandlung mit Tofacitinib, PF-189 und PF-183 im Vergleich zur wirkstofffreien Lösung

2 % DSS wurden über 5 Tage im Trinkwasser verabreicht. Tofacitinib, PF-189 und PF-183 wurden C57BL/6J Mäusen über 9 Tage rektal appliziert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n=8$ pro Gruppe. (DPBS, Tofacitinib: 30 mg/kg KG, PF-189: 30 mg/kg KG, PF-183: 30 mg/kg KG, PF-183*: 0,1 mg/kg KG). Zur Bestimmung der Signifikanz wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt **= $p < 0,01$, DPBS: Dulbecco's Phospho buffered saline.

Hier sollten die Amidoxim-Prodrugs PF-189 und PF-183 direkt mit der Behandlung mit Tofacitinib verglichen werden. Dabei führte die Behandlung mit einer Konzentration von 30 mg/kg KG im direkten Vergleich mit Tofacitinib zu einem geringeren Gewichtsverlust (Abbildung 5-48 A, B). Nur die Gabe von 0,1 mg/kg KG PF-183 bewirkte keinen signifikanten Gewichtsverlust im Vergleich mit Tofacitinib (Abbildung 5-47 C). Die Hälfte der Tiere, die mit 0,1 mg/kg KG PF-183 behandelt wurden, erreichten bereits einen Tag vor dem Ende des Experimentes das Abbruchgewicht und mussten vorzeitig aus dem Experiment genommen werden. Dies geschah nur bei dieser Behandlungsgruppe.

Im direkten Vergleich wurde deutlich, dass PF-189 und PF-183 bei einer Konzentration von (30 mg/kg KG) einen positiven Effekt auf die akute induzierte DSS-Kolitis ausübten, während geringe Konzentrationen an PF-183 zu einer Verschlimmerung des Krankheitsbildes führten.

122 Ergebnisse

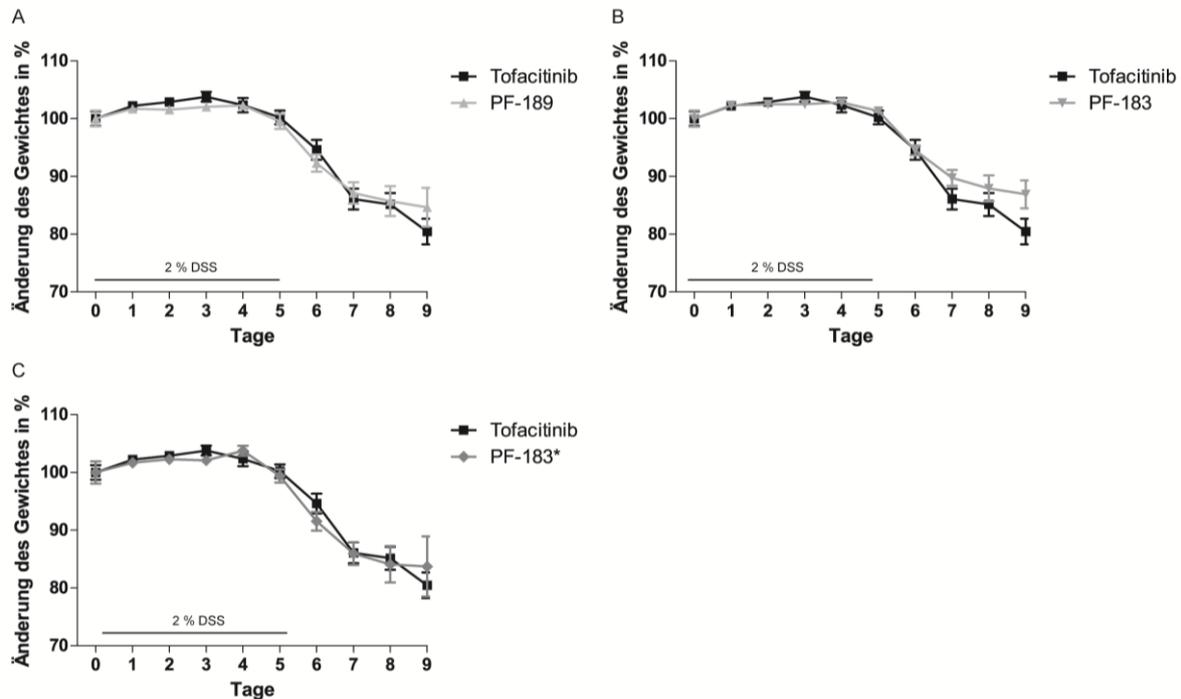


Abbildung 5-48: Gewichtskurven nach Induktion einer akuten DSS-Kolitis nach Behandlung mit PF-189, PF-183 und PF-183* im Vergleich zu Tofacitinib

2 % DSS wurden über 5 Tage im Trinkwasser verabreicht. Tofacitinib, PF-189 und PF-183 und DPBS wurden C57BL/6J Mäusen über 9 Tage rektal appliziert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n=8$ pro Gruppe. (DPBS, Tofacitinib: 30 mg/kg KG, PF-189: 30 mg/kg KG, PF-183: 30 mg/kg KG, PF-183*: 0,1 mg/kg KG).

Zusätzlich sollte für die Auswertung, aufgrund der vorherigen *in vitro* Studien in humanen HT-29 Zellen (s. Kap. 5.2.1.5), die Inhibition der Phosphorylierung von STAT3 bestimmt werden.

p-STAT3 ist während einer Entzündung sowohl bei CU und MC Patienten als auch bei einer akuten induzierten DSS-Kolitis vermehrt aktiviert [243]. Durch Behandlung der Tiere mit den jeweiligen Substanzen sollte die Phosphorylierung von STAT3 im Kolon gehemmt sein. Hierfür wurden aus dem distalen Bereich des Kolons Proteinlysate gewonnen und die Level von p-STAT3 mittels Western Blot Analyse bestimmt (Abbildung 5-48 A). Während im Kolon der Kontrolltiere (Wasser) kein phosphoryliertes STAT3 detektiert wurde, konnte bei den DSS-behandelten Tieren aller Gruppen ein deutlicher Anstieg der Phosphorylierung von STAT3 nachgewiesen werden (Abbildung 5-48 A). Die Applikation der einzelnen Substanzen bewirkte in einigen, aber nicht in allen DSS-behandelten Tieren eine Inhibition des p-STAT3-Signales. Nennenswert ist hierbei jedoch auch die Heterogenität der

Phosphorylierungslevel von STAT3 in den DSS-behandelten Tieren, die lediglich DPBS als Kontrolle appliziert bekamen (Abbildung 5-48 A).

Somit konnte eine erhöhte Phosphorylierung von STAT3 detektiert werden, jedoch konnte diese durch die Behandlung sowohl mit den Amidoxim-Prodrugs als auch mit Tofacitinib nicht inhibiert werden.

Des Weiteren sollte ermittelt werden, ob sich die lokale Entzündung im Kolon zu einer systemischen Entzündung entwickelt hat. Es wäre zu erwarten, dass nur Tofacitinib systemisch eine Entzündung inhibiert.

Murines CXCL1 bzw. KC ist ein Zytokin aus der Familie der CXC-Chemokine und dient der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in entzündetes Gewebe [244]. Dieser Marker wird verwendet zur Beurteilung der Entwicklung einer systemischen Entzündung. Die Induktion der Kolitis durch DSS zeigte keine signifikant erhöhten Werte von CXCL1 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Wasser) (Abbildung 5-48 B). Durch die Behandlung mit Tofacitinib, PF-189 und PF-183 konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied der CXCL1-Level zur Kontrollgruppe (DPBS) nachgewiesen werden (Abbildung 5-48 C). Interessanterweise erhöhte die Applikation von 0,1 mg/kg KG PF-183 den CXCL1-Wert.

Zusammenfassend zeigte der CXCL1-Wert an, dass sich eine systemische Entzündung bei der Behandlung mit geringen Konzentrationen von PF-183 entwickelt hatte, während die Behandlung mit Tofacitinib, PF-189 und PF-183 in höheren Konzentrationen zu keinen erhöhten Werten von CXCL-1 führte. Die erhöhten CXCL1-Werte der mit PF-183* behandelten Mäuse könnten eine mögliche Erklärung für den schweren Verlauf der DSS-Kolitis sein.

124 Ergebnisse

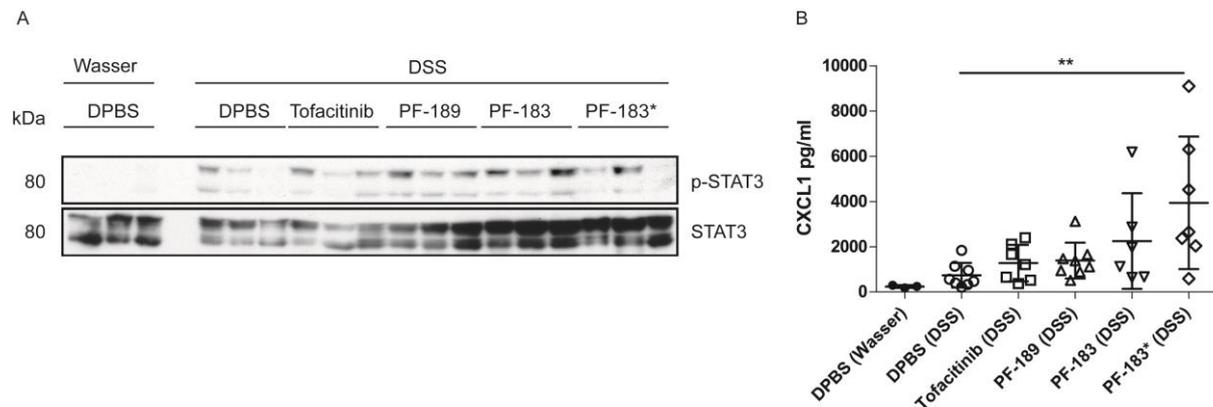


Abbildung 5-49: Bestimmung von p-STAT3 und CXCL1 nach Induktion einer akuten Kolitis und Behandlung mit Tofacitinib, PF-189 und PF-183

Kontrollgruppe (Wasser) erhielt autoklaviertes Leitungswasser über 10 Tage. 2 % DSS wurden über 5 Tage im Trinkwasser verabreicht. Tofacitinib, PF-189 und PF-183 und DPBS wurden C57BL/6J Mäusen über 9 Tage rektal appliziert. A: Aus distalen Kolonstücken wurden Proteinlysate gewonnen und die einzelnen Proteine mittels Western Blot Analyse bestimmt. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung dienten die unphosphorylierten Proteine. Dargestellt sind Proben von n=3 Mäusen pro Behandlung. B: Plasma der Mäuse wurde mittels KC-ELISA vermessen und die Absorption bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung, DPBS (normal) n=3, DPBS n=8, Tofacitinib n=7, PF-189 n=8, PF-183 n=6 und PF-183* n=7. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. **= p < 0,01. DPBS: Dulbecco's Phospho buffered saline, kDa: Kilodalton, DSS: dextran sodium sulfate, STAT: signal transducer and activator of transcription, CXCL: C-X-C motif ligand.

Weiterhin wurde die Inhibition durch die einzelnen Substanzen im Hinblick auf die mRNA-Level von Zytokinen, wie IL-6 oder IFN- γ , die mit einer Kolitis assoziiert sind, betrachtet [55].

Die mRNA-Level von *Il-6* konnten während einer akuten DSS-Kolitis nachgewiesen werden (Abbildung 5-49 A). Die Behandlung mit Tofacitinib führte tendenziell zu erhöhten mRNA-Level von *Il-6* im Kolon, jedoch führte die Behandlung mit PF-189 zu einer signifikanten Erniedrigung der mRNA-Level an *Il-6* im Vergleich zu Tofacitinib und tendenziell verglichen mit DPBS. Die Behandlung mit PF-183 und PF-183* führte zu keiner verminderten Expression von *Il-6*.

IL-22 und IL-23 sind Zytokine, die von Th2-Zellen nach Aktivierung durch Zytokine wie IL-6 sezerniert werden. Somit sind sie T-Zellen spezifische Zytokine. Die mRNA-Level von *Il-22* und *Il-23* waren nach den unterschiedlichen Behandlungen nicht verändert.

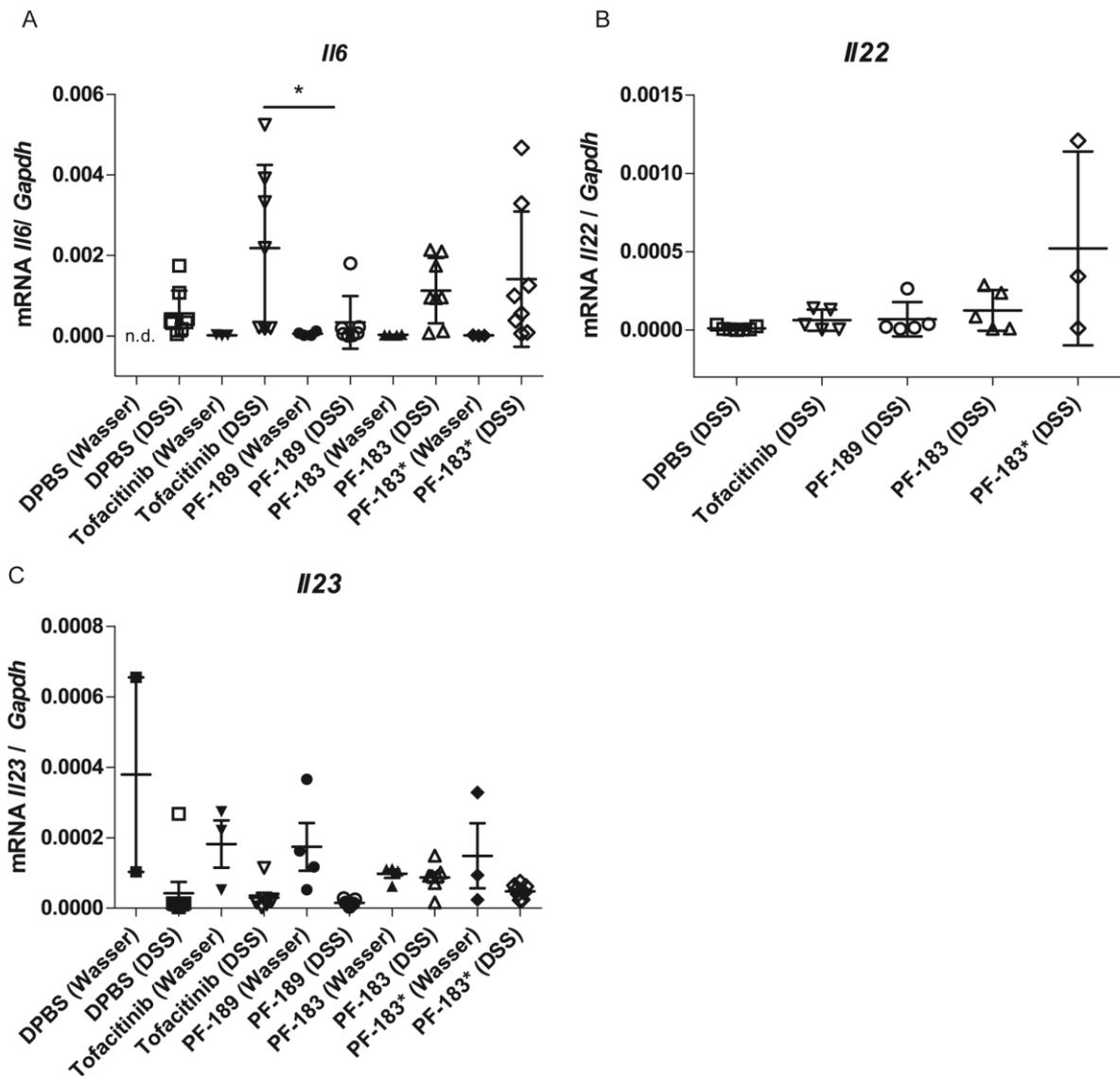


Abbildung 5-50: Expression von *Il-6*, *Il-22* und *Il-23* nach Induktion einer Kolitis und Behandlung mit Tofacitinib, PF-189 und PF-183

2 % DSS wurden über 5 Tage im Trinkwasser verabreicht. Tofacitinib, PF-189 und PF-183 und DPBS wurden C57BL/6J Mäusen über 9 Tage rektal appliziert. Aus distalen Kolonstücken wurde mRNA gewonnen. Der Isolation schloss sich die cDNA-Synthese mittels reverser Transkription an. Mit der cDNA wurde eine qPCR durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. DPBS n=8, Tofacitinib n=7, PF-189 n=7, PF-183 n=8 und PF-183* n=8. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. *= $p < 0,05$. DPBS: Dulbecco's Phospho buffered saline, DSS: *dextran sodium sulfate*, IL: Interleukin.

STAT3 fungiert als Transkriptionsfaktor für Gene, wie *Reg3b* und *Reg3g*, die als antimikrobielle Peptide fungieren [245]. Somit können Expressionslevel von *Reg3b* und *Reg3g* ein Anhaltspunkt für die transkriptionelle Aktivität von STAT3 sein und die Aktivierung des Immunsystems. Während einer DSS-Kolitis sind die mRNA-Level von *Reg3b* erhöht (Abbildung 5-51 A). Jedoch wurden keine Unterschiede aufgrund der verschiedenen Behandlungen deutlich, wobei die mRNA Expression von *Reg3b* und

126 Ergebnisse

Reg3g nach der Behandlung mit PF-183 erhöht war. Hier könnten vermehrt antimikrobielle Peptide gebildet werden zur Abwehr der invasiven Bakterien im Kolon.

Die Analyse der Expressionslevel von *S100a8* und *S100a9* sollte zusätzlich der Bestimmung des Entzündungsgrades im Kolon dienen, da dieser von neutrophilen Granulozyten sezernierte Proteinkomplex während einer akuten und chronischen Entzündung verstärkt vorliegt [246]. Die mRNA-Level beider Gene waren während der Kolitis deutlich erhöht. Eine Behandlung mit Tofacitinib, PF-183 oder PF-183* sorgte jedoch nicht für verminderte Expressionslevel dieser Entzündungsmarker (Abbildung 5-50 B, C), während PF-189 die Expressionslevel der mRNA beider Marker senkte.

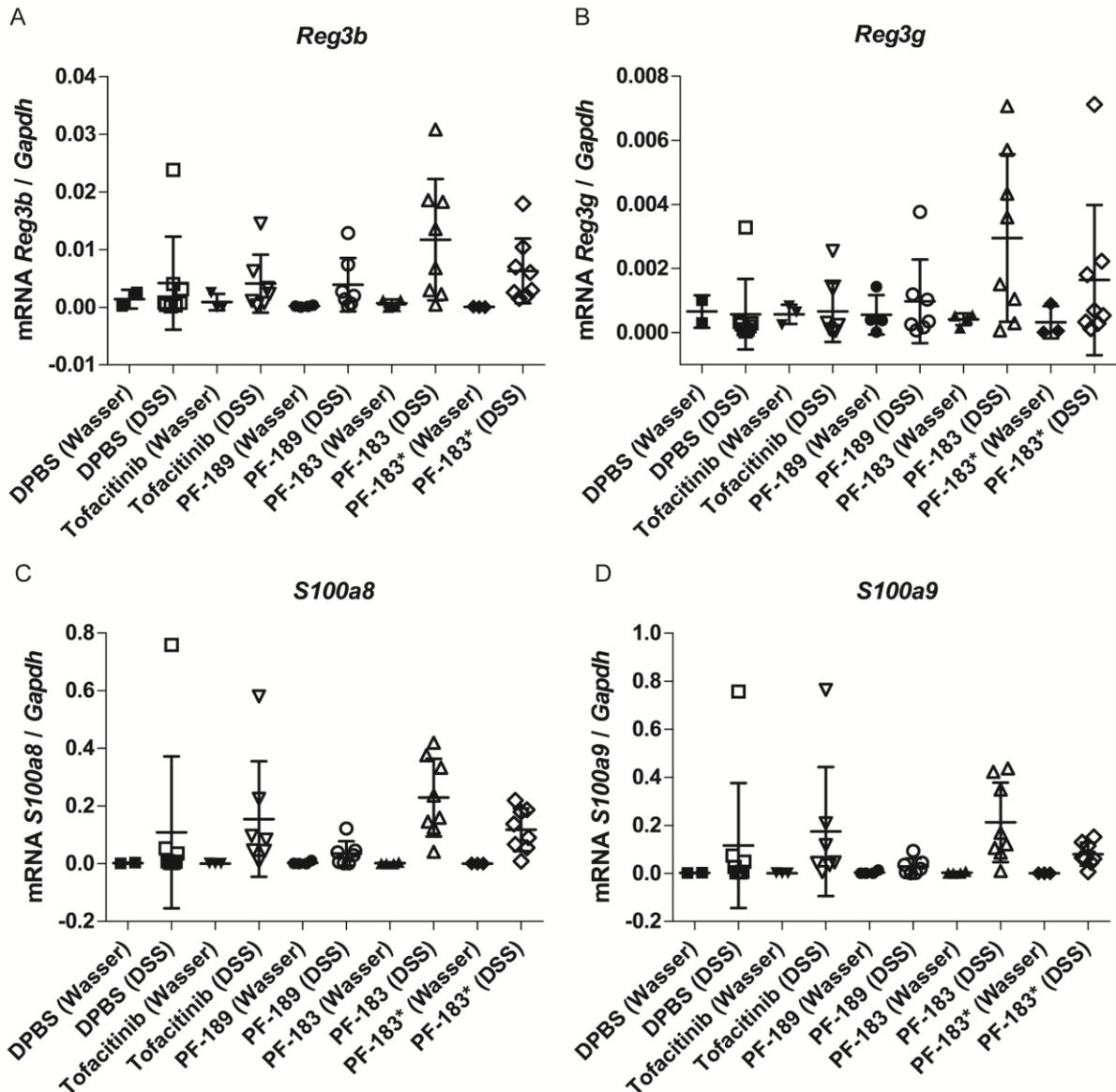


Abbildung 5-51: Expression von *Reg3b*, *Reg3g* und *S100a8a/S100a9* im Kolon nach Behandlung mit Tofacitinib, PF-189 und PF-183

2 % DSS wurden über 5 Tage im Trinkwasser verabreicht. Tofacitinib, PF-189 und PF-183 und DPBS wurden C57BL/6J Mäusen über 9 Tage rektal appliziert. Aus distalen Kolonstücken wurde mRNA gewonnen. Der Isolation schloss sich die cDNA-Synthese mittels reverser Transkription an. Mit der cDNA wurde eine qPCR durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen. DPBS n=8, Tofacitinib n=7, PF-189 n=7, PF-183 n=8 und PF-183* n=8, DPBS: Dulbecco's Phospho buffered saline, DSS: dextran sodium sulfate, Reg: regenerating islet-derived protein, S100a: S100 calcium-binding protein.

5.4.6 Histologie des Kolons

Ein weiterer wichtiger Parameter für den Verlauf einer akuten DSS-induzierten Kolitis ist die Bestimmung der Veränderung der Kolonlänge. Während einer Entzündung kommt es zur Zerstörung des Epithels [247]. Im Verlauf der Wundheilung wird Fibrin ausgeschüttet, welches zu einer Verkürzung des Kolons führt.

Zur besseren Beurteilung der Kolonlänge wurden hier die Kontrollgruppen aufgenommen, die kein DSS erhielten (s. Kap. 5.4.4). Diese sind in Abbildung 5-51 A als (Wasser) dargestellt. Eine signifikante Verkürzung des Kolons nach Induktion einer akuten DSS-Kolitis war deutlich erkennbar (Abbildung 5-51 A). Nur PF-189 zeigte keine signifikante Verkürzung.

In Abbildung 5-51 B sind nur die Tiere mit der akuten DSS-induzierten Kolitis dargestellt. Dabei konnte keine Veränderung der Kolonlänge durch die unterschiedlichen Behandlungen erkannt werden.

Die Induktion einer akuten DSS-Kolitis zeigte eine verkürzte Kolonlänge, jedoch konnte die Behandlung mit den einzelnen Substanzen die Verkürzung nicht verhindern.

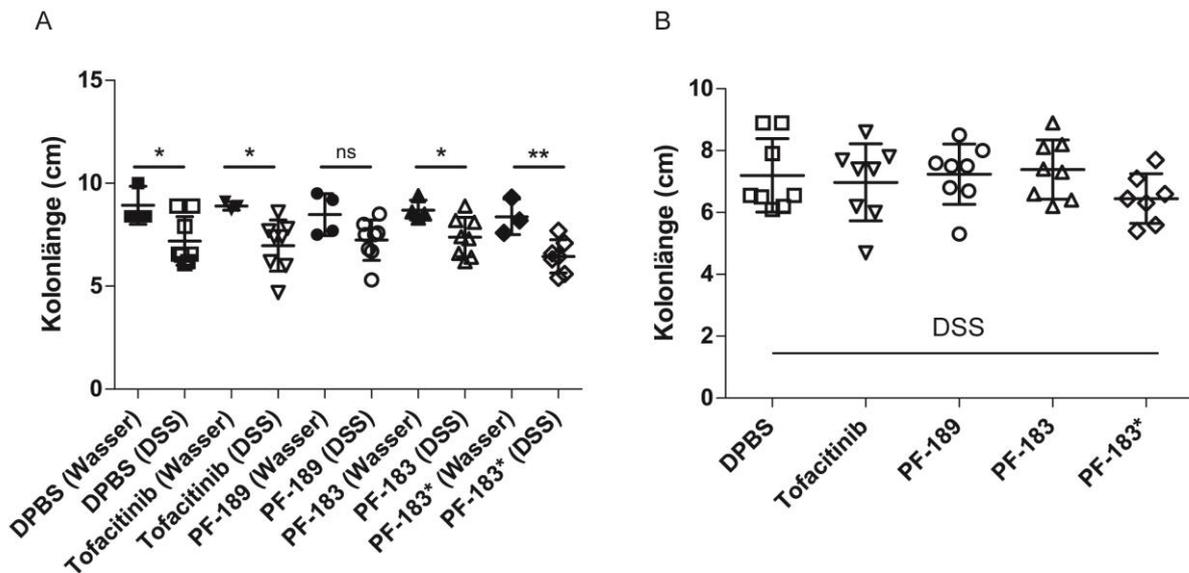


Abbildung 5-52: Verkürzung der Kolonlänge nach Induktion einer akuten DSS-Kolitis trotz Behandlung mit Tofacitinib, PF-189 und PF-183

A: Autoklaviertes Leitungswasser wurde über 10 Tage verabreicht. 2 % DSS wurden über 5 Tage im Trinkwasser verabreicht. Tofacitinib, PF-189 und PF-183 und DPBS wurden C57BL/6J Mäusen über 9 Tage rektal appliziert (Wasser). B: 2 % DSS wurden über 5 Tage im Trinkwasser verabreicht. Tofacitinib, PF-189 und PF-183 und DPBS wurden C57BL/6J Mäusen über 9 Tage rektal appliziert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n=8$ pro Gruppe. (DPBS, Tofacitinib: 30 mg/kg KG, PF-189: 30 mg/kg KG, PF-183: 30 mg/kg KG) und $n=7$ (PF-183*: 0,1 mg/kg KG). Zur Bestimmung der Signifikanz wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$. DPBS: Dulbecco's Phospho buffered saline, DSS: *dextran sodium sulfate*.

Weiterhin wurde zur Beurteilung des Schweregrades der DSS-induzierten Kolitis auch der histologische Index des Kolons als weiterer Parameter hinzugezogen. Der Index gibt eine Aussage über die Kryptenstruktur, Infiltration von Immunzellen und Bildung von Ulzerationen an. Je höher dieser Index ist, umso schlimmer ist die Zerstörung des intestinalen Epithels. Die Behandlung mit den einzelnen Substanzen führte zu keiner Erniedrigung des histologischen Indexes im Vergleich zur DPBS Gruppe (Abbildung 5-52).

Die einzelnen Substanzen führten somit zu keiner Verbesserung der Struktur des intestinalen Epithels.

130 Ergebnisse

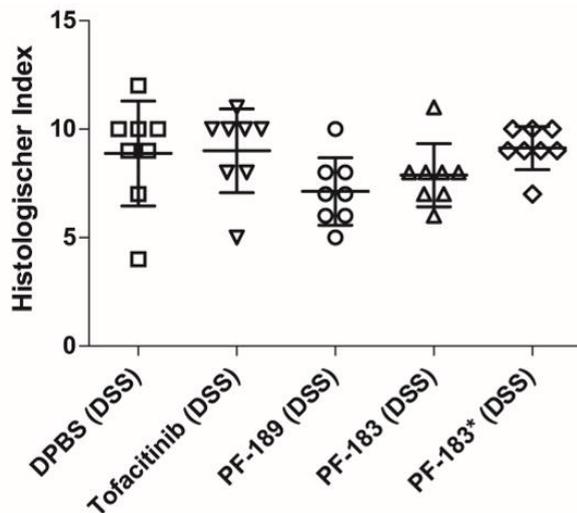


Abbildung 5-53: Histologischer Index bestimmt im Kolon von C57BL/6J Mäusen mit einer akuten DSS-induzierten Kolitis nach Behandlung mit Tofacitinib, PF-189 und PF-183

2 % DSS wurden über 5 Tage im Trinkwasser verabreicht. Tofacitinib, PF-189 und PF-183 und DPBS wurden C57BL/6J Mäusen über 9 Tage rektal appliziert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n=8$ pro Gruppe. (DPBS, Tofacitinib: 30 mg/kg KG, PF-189: 30 mg/kg KG, PF-183: 30 mg/kg KG) und $n=7$ (PF-183*: 0,1 mg/kg KG). DPBS: Dulbecco's Phospho buffered saline.

Die Funktionalität von STAT3 auf die Wundheilung und Proliferation der Zellen wurde in Kap. 5.2.2 beschrieben. Nun sollte nachgewiesen werden, ob die gezielte Inhibition des JAK/STAT-Signalweges in intestinalen Epithelzellen eine Auswirkung auf die Proliferation von IECs hat.

Hierfür wurde die Anzahl der Zellen bestimmt, die zum Zeitpunkt des Todes der Mäuse noch aktiv waren und die allgemeine Anzahl der proliferierenden Zellen. Zur Bestimmung der proliferierenden Zellen, die kurz vor dem Tod der Mäuse noch aktiv waren, wurde 90 min vor Tötung der Tiere BrdU (Brom-desoxyuridin) i.p. gespritzt. Es wurde die Anzahl BrdU-positiver Zellen von 100 Krypten unter dem Mikroskop bestimmt (Abbildung 5-53 A). Es waren keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl BrdU-positiver Zellen durch die unterschiedlichen Behandlungen nachweisbar.

Zur Bestimmung aller proliferierenden Zellen wurde Ki67 in IECs bestimmt (Abbildung 5-53 B). Die Behandlung mit PF-189 und PF-183 zeigte eine signifikant höhere Anzahl an proliferierenden Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die Amidoxim-Prodrugs und Tofacitinib hatten keinen negativen Einfluss auf die Proliferation der IECs.

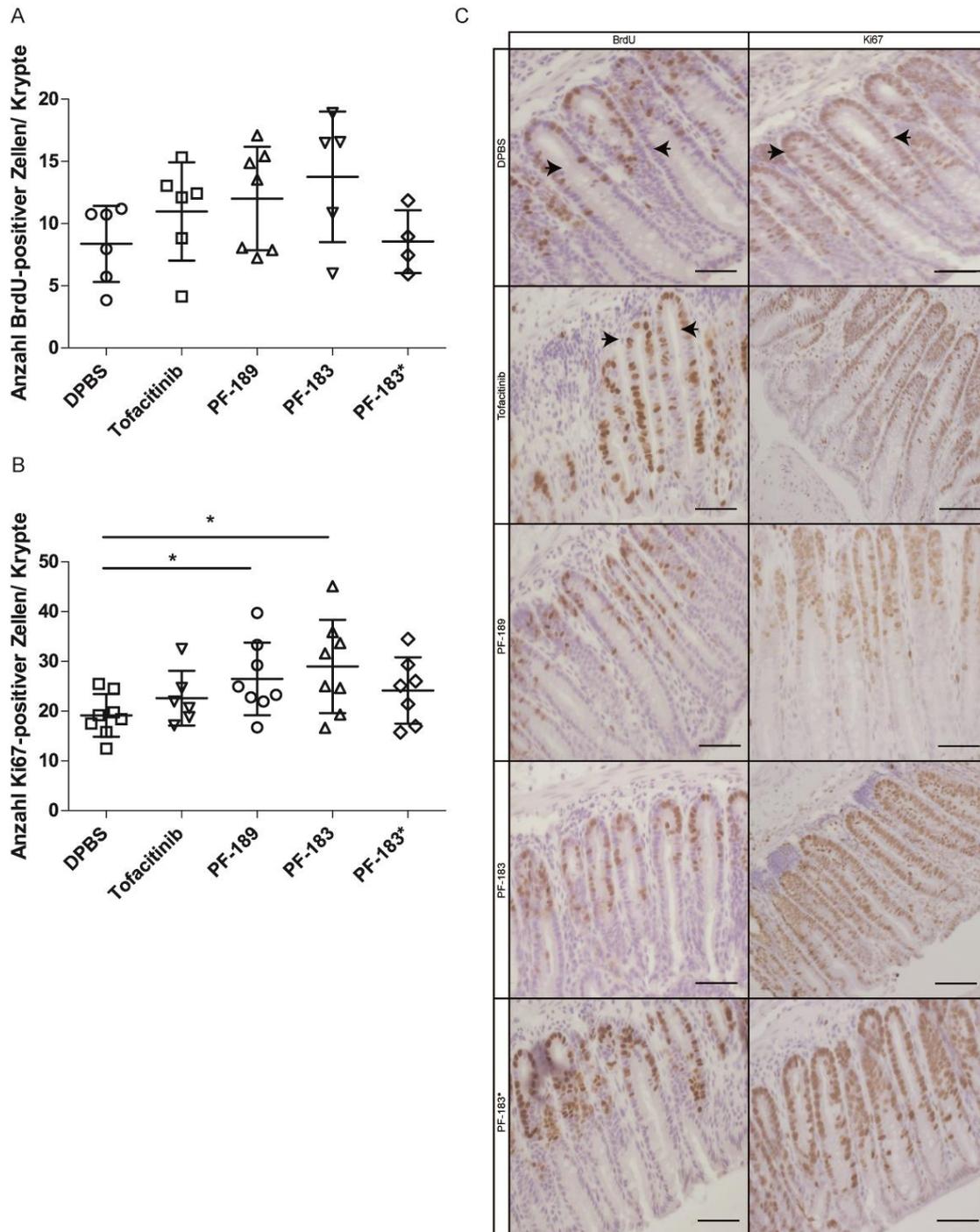


Abbildung 5-54: Bestimmung der proliferierenden Zellen im Kolon nach Induktion einer akuten DSS-Kolitis und Behandlung mit Tofacitinib, PF-189 und PF-183

2 % DSS wurden über 5 Tage im Trinkwasser verabreicht. Tofacitinib, PF-189 und PF-183 und DPBS wurden C57BL/6J Mäusen über 9 Tage rektal appliziert. A: Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von DPBS n=6, Tofacitinib: 30 mg/kg KG n= 6, PF-189: 30 mg/kg KG n= 7, PF-183: 30 mg/kg KG n= 5, PF-183*: 0,1 mg/kg KG n=4, B: Mittelwerte \pm Standardabweichungen von DPBS n=8, Tofacitinib: 30 mg/kg KG n=6, PF-189: 30 mg/kg KG n=8, PF-183: 30 mg/kg KG n=8, PF-183*: 0,1 mg/kg KG n=7, C: In Paraffin eingebetetes Kolon wurde mit den Proliferationsmarkern BrdU und Ki 67 gefärbt. Positive Zellen sind braun gefärbt. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. * = $p < 0,05$, Maßstabsbalken entsprechen 100 μm . DPBS: Dulbecco's Phospho buffered saline, BrdU: Bromdesoxyuridin, Ki67: Kiel67.

132 Ergebnisse

Zur Bestimmung apoptotischer Zellen im Kolon wurden DNA-Fragmente markiert, die durch Apoptose in den Zellen entstanden sind (Abbildung 5-55). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen Behandlungen nachgewiesen werden. Nichtsdestrotz induzierte Tofacitinib tendenziell eine höhere Anzahl apoptotischer Zellen.

IFN- γ , als Apoptoseinduktor, zeigte allgemein geringe Expressionslevel im Kolon (Abbildung 5-53 B). Durch die Behandlung mit den einzelnen Substanzen konnten keine signifikanten Unterschiede detektiert werden.

Insgesamt spielte die Apoptose während der akuten DSS-induzierten Kolitis eine geringe Rolle.

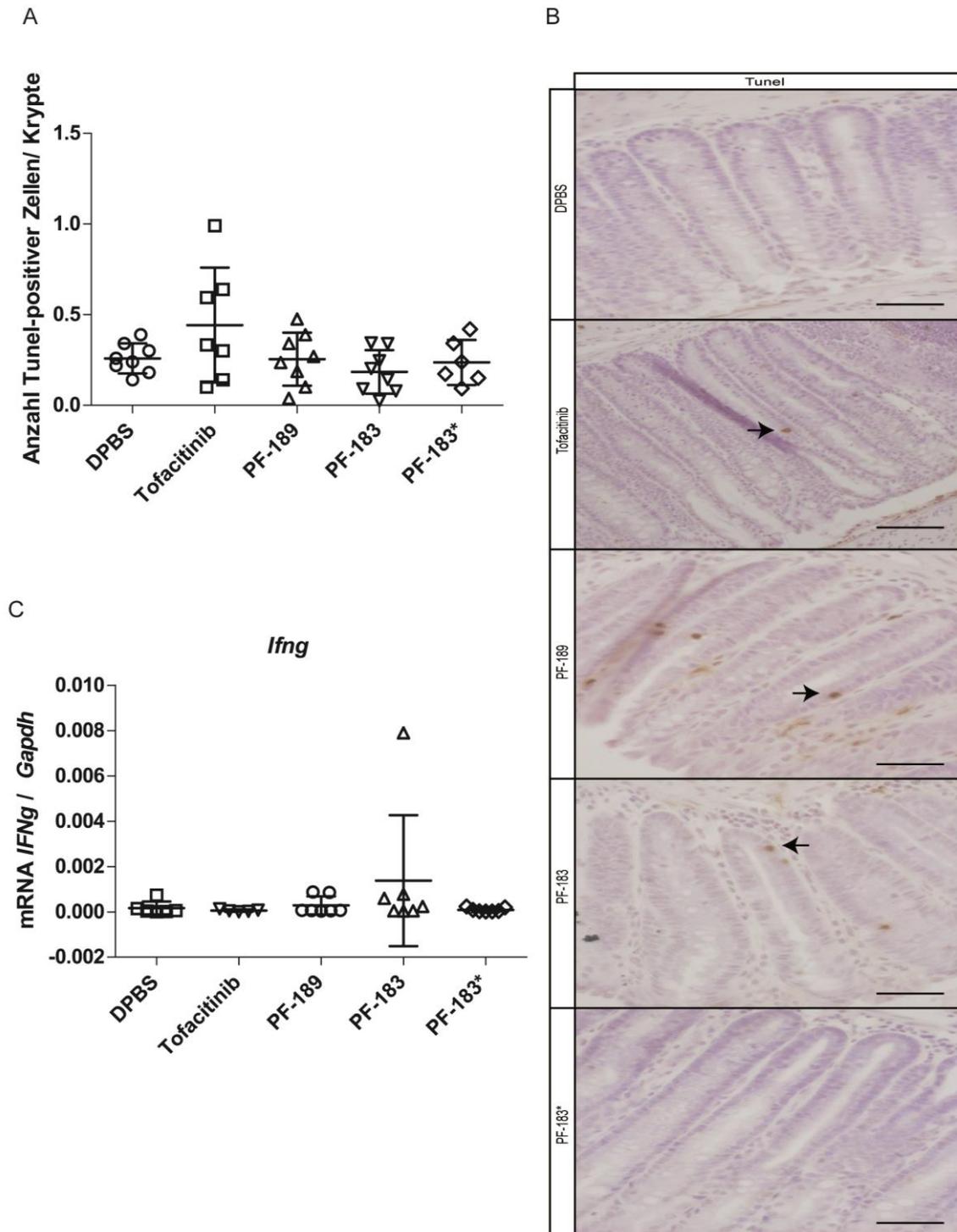


Abbildung 5-55: Bestimmung der apoptotischen Zellen und *Ifng* mRNA-Level im Kolon nach Induktion einer akuten DSS-Kolitis und Behandlung mit Tofacitinib, PF-189 und PF-183

A: 2 % DSS wurden über 5 Tage im Trinkwasser verabreicht. Tofacitinib, PF-189 und PF-183 und DPBS wurden C57BL/6J Mäusen über 9 Tage rektal appliziert. B: Im Kolon wurden die apoptotischen Zellen mittels TDT markiert. Positive Zellen sind braun gefärbt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von DPBS n=7, Tofacitinib: 30 mg/kg KG n=7, PF-189: 30 mg/kg KG n=8, PF-183: 30 mg/kg KG n=8, PF-183*: 0,1 mg/kg KG n=6 Maßstabsbalken entsprechen 100 μ m. DPBS: Dulbecco's Phospho buffered saline, IFN: Interferon, TUNEL: *terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling*.

5.4.7 HPLC-Analytik zum Nachweis von Tofacitinib, PF-189/PF-192 und PF-183/PF-185 nach einer akuten induzierten DSS-Kolitis

Die Bestimmung der Konzentrationen von Tofacitinib, PF-189/PF-192 und PF-183/PF-185 sollte ebenfalls in der Kontrollgruppe (Wasser) (Gruppe 1-5) und den DSS-behandelten Tieren (Gruppe 6-10) erfolgen. Einerseits sollte ermittelt werden, ob PF-189/PF-192 und PF-183/PF-185 eine andere Kinetik aufweisen als das Tofacitinib und möglicherweise in den Organen akkumulieren und andererseits ob sie unter entzündlichen Bedingungen zu Amidinen reduziert werden. Die letzte Gabe der Substanzen erfolgte 24 h vorher und insgesamt wurden die Substanzen neun Mal verabreicht. Für die Analyse wurden die HPLC-Methoden aus Kap. 4.7.2.4 und 4.7.2.5 verwendet. Für Tofacitinib wurde die Methode aus Kap. 4.7.2.4 verwendet.

5.4.7.1 Kalibrierung und Wiederfindung

Für die Bestimmung von Tofacitinib musste die Kalibrierung und Wiederfindung mit der neuen Methode erneut durchgeführt werden. Die Kalibriergerade wurde mit 6 Konzentrationen in einem Bereich von 0,5 -100 μM durchgeführt. Dabei war sie linear ($R^2=0,9997$) und die Richtigkeit in diesem Bereich betrug $91 \pm 11,3 \%$. Mithilfe der Kalibriergerade wurde eine Wiederfindung im selben Konzentrationsbereich in muriner Leber ermittelt. Dabei betrug die Wiederfindung $91 \pm 10,3 \%$ mit einer Linearität von $R^2=0,9972$. Die Bestimmungsgrenze betrug 1 μM .

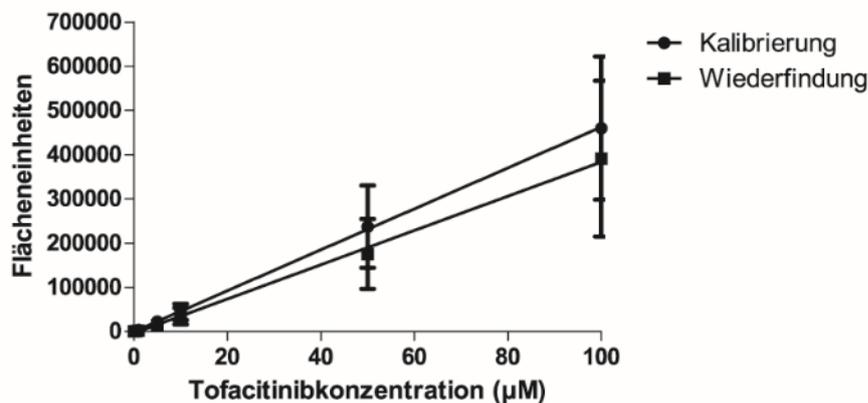


Abbildung 5-56: Kalibrierung und Wiederfindung von Tofacitinib

Die Kalibrierung erfolgte mit Tofacitinib in einem Konzentrationsbereich von 0,5-100 μM . Für die Wiederfindung wurden die Standardkonzentrationen verwendet und in muriner Leber aufgearbeitet. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen zweier unabhängig voneinander durchgeführten Messungen. μM : Mikromolar.

5.4.7.2 Konzentrationen von Tofacitinib, PF-189 und PF-183 in Leber, Niere, Kolon

In diesem Abschnitt wurden die Konzentrationen der einzelnen Substanzen nach der Induktion der akuten DSS-Kolitis bestimmt. Die Bestimmung diente zusätzlich dem Nachweis, dass die Amidoxim-Prodrugs auch nach 24 h nicht in der Leber oder Niere akkumulieren und somit nicht systemisch aufgenommen wurden. Nach Aufarbeitung der Organe, wie in Kap. 4.7.1.3 beschrieben, wurden die Konzentrationen von Tofacitinib, PF-189/PF-192 und PF-183/PF-185 mit Hilfe der HPLC bestimmt (s. Kap.4.7.2.4, 4.7.2.5). Weder PF-189/PF-192 und PF-183/PF-185 noch Tofacitinib konnten in Leber, Niere oder Kolon nachgewiesen werden.

6 Diskussion

Die Behandlung mit Tofacitinib, als einer der ersten JAK-Inhibitoren, führt in der klinischen Anwendung am Menschen zu schweren Nebenwirkungen. Es treten zum Beispiel Infektionen des respiratorischen Traktes, Entwicklung von Tuberkulose, Kopfschmerzen und erhöhte Kreatininwerte auf [189, 192, 248]. Erhöhte Kreatininwerte im Plasma treten erst auf, wenn eine 50 %-ige Einschränkung der glomerulären Filtration bei einer Niereninsuffizienz vorliegt [249]. Eine mögliche Begründung für das Auftreten der aufgeführten Nebenwirkungen könnte die Bildung von Cyanid während der ersten Phase der Biotransformation sein. Die Strukturformel von Tofacitinib weist eine Nitril-Gruppe mit α -Wasserstoffatomen auf. Diese stellen ein optimales Ziel für CYP450-Enzyme dar [195]. Nach der Hydroxylierung zum Cyanhydrin würde dieses in den entsprechenden Aldehyd und Cyanid zerfallen. Der Aldehyd könnte durch Aldehyd-Dehydrogenasen zur Carbonsäure oxidiert werden (s. Abbildung 5-1). Die Carbonsäure ist als Metabolit identifiziert worden, ohne eine Diskussion über die Abspaltung von Cyanid zu führen. Aus diesem Grund war das Ziel der vorliegenden Arbeit zu klären, ob Cyanid enzymatisch abgespalten wird und ob es verantwortlich für das Auftreten der beschriebenen Nebenwirkungen von Tofacitinib sein könnte.

6.1 Beurteilung der Analytik zum Nachweis von Cyanid

Die modifizierte UV-spektroskopische Methode zur Quantifizierung von Cyanid zeigte eine optimale Linearität und eine ausreichend hohe Wiederfindung (Abbildung 5-2). Die entwickelte Analytik war somit für den Nachweis des gebildeten Cyanids geeignet. Die unterschiedlichen Wiederfindungen zwischen der humanen und porcinen Probe könnten durch eine Adsorption von Tofacitinib oder Cyanid an den Proteinen entstehen.

6.2 Cyanid ist ein Metabolit von Tofacitinib

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach Inkubation mit porcinen oder humanen Lebermikrosomen eine Cyanidabspaltung auftrat (s. Kap. 5.1.3.). Weitere Untersuchungen bestätigten, dass CYP450-Enzyme für die Oxidation verantwortlich waren. Es wurde jedoch auch deutlich, dass die gebildete Cyanidmenge um das 66-fache geringer war, als die Mengen, die in den Intoxikationsstudien am Kaninchen nachgewiesen wurden [250].

Zur Identifizierung der für die Umsetzung verantwortlichen Isoenzyme wurden Inkubationen mit rekombinanten CYP450-Isoenzymen durchgeführt. Dabei wurde die Beteiligung der Enzyme CYP3A4, CYP2D6 und CYP2C9 identifiziert. Interessanterweise sind diese Isoenzyme hauptsächlich an der Metabolisierung von Tofacitinib beteiligt [195].

Zusätzlich konnte der Mechanismus durch die Verwendung des JAK-Inhibitors PF-069 bestätigt werden. Es wurde nachgewiesen, dass der Austausch des α -Wasserstoffatoms gegen einen Cyclopropylrest die Bildung von Cyanid inhibierte. Somit kann die Abspaltung von Cyanid durch die Blockade des α -Wasserstoffatoms verhindert werden. Die Modifizierung des Grundgerüsts von Tofacitinib, wie bei PF-068, führte zu einer verminderten Abspaltung von Cyanid. Möglicherweise passt das Substrat durch die Veränderung nicht mehr optimal in die Bindungstaschen der Enzyme. Um diese Hypothese endgültig bestätigen zu können, müssten noch weitere Verbindungen mit modifizierten Grundgerüsten getestet werden.

Bei einer akuten Intoxizität mit Cyanid kommt es zur Inhibition der Cytochrom-c-Oxidase, wodurch in der Zelle vorhandener Sauerstoff nicht mehr verwertet werden kann [251]. Dabei kann schon eine Aufnahme von 0,5-3,5 mg/kg KG (KG: Körpergewicht) Cyanid zum Tode führen [252]. Kleine Mengen an Cyanid verursachen Kopfschmerzen, Schwindel und Schleimhautirritationen [253]. In einer Studie mit einer Langzeitgabe von 36,5 mg Cyanid pro Tag, wodurch eine chronische Intoxizität simuliert wurde, wiesen Kaninchen eine Veränderung der Leber- und Nierenwerte auf [250]. Während die Aktivität der alkalischen Phosphatase und der Alanin-Aminotransferase in der Leber gesenkt war, waren die Aktivitäten im Serum erhöht. Zusätzlich konnten erhöhte Werte der Harnsäure und des Kreatinins im Serum

138 Diskussion

der Tiere nachgewiesen werden. Des Weiteren kann eine chronische Intoxizität mit Cyanid zu neurologischen Störungen führen [254]. Afrikanische Stämme zeigten nach einer konstanten Einnahme der cyanidhaltigen Cassava-Pflanze Degenerationen des Sehnervs, Nerventaubheit und Störungen der Bewegungskoordination [255]. Nach jahrelanger Gabe von Tofacitinib sollten Patienten deshalb auf mögliche neurologische Störungen hin untersucht werden.

Für die Arzneimitteltherapie mit Tofacitinib sind Erkenntnisse über die Bildung von Cyanid in Abhängigkeit der verwendeten Substratkonzentration von großer Bedeutung. Dies betrifft vor allem bei Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion, da die glomeruläre Filtration aufgrund der erhöhten Kreatininwerte sowohl durch Cyanid als auch Tofacitinib beeinträchtigt wird [248, 250]. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass bei steigender Konzentration von Tofacitinib mehr Cyanid gebildet wird. Darüber hinaus können geringe Mengen an Cyanid mittels der Rhodanid-Synthetase durch Übertragung eines Schwefelatoms und der Bildung von Thiocyanat entgiftet werden [256]. Hohe Konzentrationen an Thiocyanat wirken goitrogen, da Thiocyanat die Hemmung der Iodaufnahme hemmt und so zu einer Vergrößerung der Schilddrüse führt [257]. Die dafür notwendigen Konzentrationen an Cyanid, die durch Tofacitinib gebildet wurden, waren allerdings geringer.

Anhand der gewonnenen Erkenntnisse dieser Studie kann demnach ein möglicher Zusammenhang zwischen einem Teil der Nebenwirkungen (s. Abbildung 6-1) und der Abspaltung von Cyanid nach längerer Einnahme von Tofacitinib nicht ganz ausgeschlossen werden. Auch könnte eine mögliche Schilddrüsenvergrößerung durch die Bildung von Thiocyanat aus Cyanid möglich sein. Für eine Langzeittherapie mit Tofacitinib sollten trotzdem mögliche Folgen durch die Cyanidbildung berücksichtigt werden.

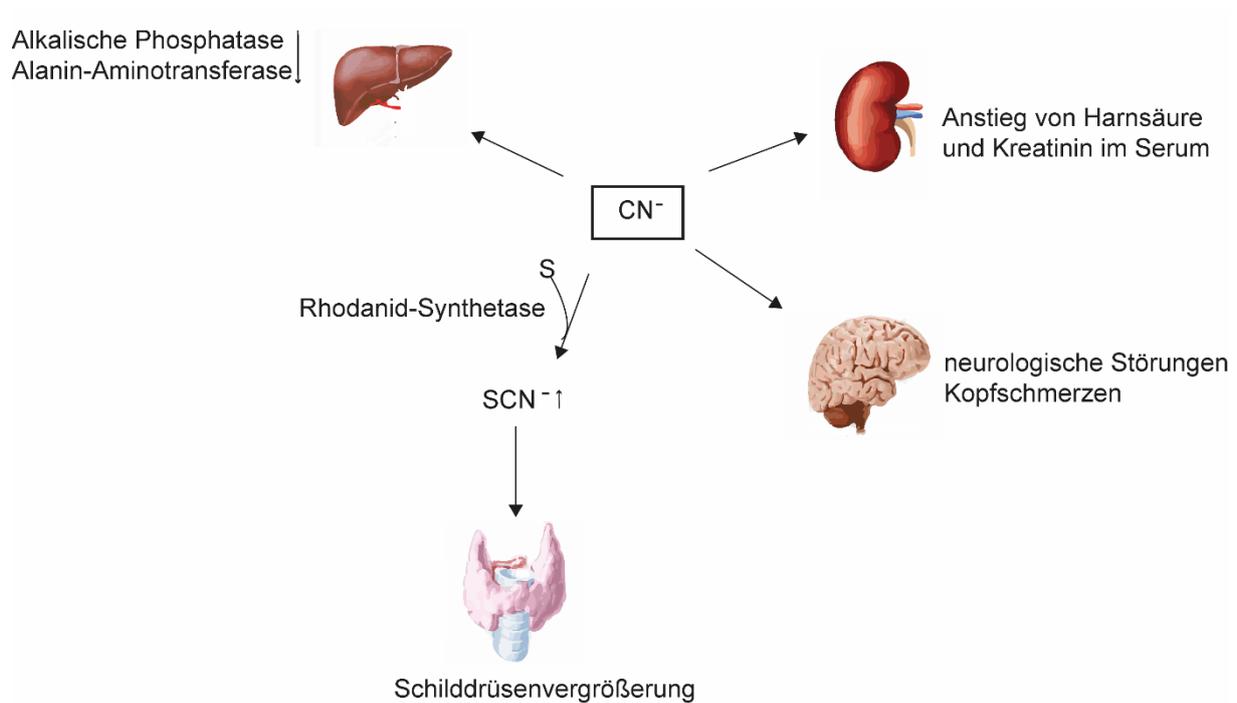


Abbildung 6-1: Folgen einer chronischen Intoxifikation mit Cyanid

Nach Abspaltung von Cyanid wird es durch die Rhodanid-Synthetase zum Thiocyanat detoxifiziert. Thiocyanat wirkt als Goitrogen und fördert die Entwicklung einer Schilddrüsenvergrößerung. Wird Cyanid nicht umgewandelt, so kann es zu Leber- und Nierenschäden führen. Zusätzlich sorgen große Mengen an Cyanid zur Bildung von Kopfschmerzen und neurologischen Paresen. S: Schwefel, CN: Cyanid, SCN: Thiocyanat

6.3 *In vitro* Charakterisierung von Tofacitinib, PF-189 und PF-183

Der JAK-Inhibitor Tofacitinib führte in einer Studie mit Colitis Ulcerosa Patienten zu einer Remission der Krankheitssymptome, aber auch zu Tofacitinib-spezifischen Nebenwirkungen [173]. Diese Nebenwirkungen umfassten neben einer Veränderung der neutrophilen Granulozyten auch Infektionen im respiratorischen Trakt, die Entwicklung einer Tuberkulose oder Anämien [189, 190, 192].

Nach vorheriger Bestimmung der Konzentration an gebildetem Cyanid wurde deutlich, dass Cyanid nicht überwiegend am Auftreten dieser Nebenwirkungen beteiligt sein kann, sondern eher die unselektive Inhibition der JAK-Proteine in allen Zellen. Um diese unselektive systemische Inhibition zu verhindern, wurden die Amidoxim-Prodrugs PF-189 und PF-183 synthetisiert. Amidoxim-Prodrugs sollten nach Diffusion durch die Zellmembran mithilfe der mitochondrialen Amidoxim reduzierenden Komponente (mARC) zu einem Amidin mit JAK-inhibitorischen Eigenschaften reduziert werden. Amidine liegen bei physiologischen pH-Werten protoniert vor, wodurch sie nicht mehr durch die Diffusion die Membran passieren

können und in der Zelle verbleiben. Die Anwendung dieses Konzeptes und die zusätzliche rektale Applikation sollten die systemische Aufnahme der JAK-Inhibitoren verhindern und die durch die JAK-Inhibition induzierten Nebenwirkungen minimieren. Für die neuen Amidoxim-Prodrugs waren jedoch noch keine Daten bezüglich der Toxizität auf kolorektale Adenokarzinomzellen oder die Wirkung auf JAK/STAT-Signalwege, induziert durch verschiedene Zytokine, bekannt. Aus diesem Grund sollte zuerst eine *in vitro* Charakterisierung der einzelnen Verbindungen erfolgen.

6.3.1 Physiologische Relevanz der verwendeten Konzentrationen

Zu Beginn wurden die optimalen Konzentrationen für die einzelnen Experimente ermittelt. Für *in vitro* Studien lag die optimale Konzentration bei 10 μM . Bei dieser Konzentration konnte eine vollständige Inhibition des JAK/STAT-Signalweges beobachtet werden. Diese Bedingung musste erfüllt sein, da für nachfolgende *in vivo* Untersuchungen 30 mg/kg KG gewählt wurden. Diese Konzentrationen wurden schon in anderen Mausstudien mit Tofacitinib verwendet [258, 259]. Zusätzlich mussten nicht physiologische Konzentrationen von Zytokinen verwendet werden, um die Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges in Karzinomzelllinien zu gewährleisten, da es sich bei Karzinomzellen um immortalisierte Krebszellen handelt, die robuster und langlebiger sind. Die verwendeten Konzentrationen konnten bedenkenlos für weitere Experimente eingesetzt werden, da 10 μM Tofacitinib, PF-189 und PF-183 auch in Organoiden, einem 3-D-Modell des murinen Dünndarmes, keinen Einfluss auf die Entwicklung und Differenzierung der Stammzellen des Dünndarmes hatten.

Normalerweise erhalten Patienten 5 bis 10 mg Tofacitinib pro Tag, was einer Plasmakonzentration von 39,7-79,4 ng/ml und einer Molarität von 72-144 nM entspricht [195]. Die in dieser Arbeit verwendete Konzentration von 10 μM entspricht somit nicht der Konzentration von Tofacitinib nach 5 bis 10 mg Gabe (im Folgenden als physiologische Konzentration bezeichnet). Jedoch erwies sich die Konzentration von 1-10 μM Tofacitinib in einer Studie mit humanen CD4⁺ T-Zellen als unbedenklich für Primärzellen und am effektivsten für die Inhibition der Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 [260].

6.3.2 Tofacitinib, PF-189 und PF-183 zeigen keinen Einfluss auf die Zellviabilität von HT-29 Zellen

Zur Charakterisierung der neuen Substanzen erwies sich die Zelllinie HT-29 als geeignetes Modell. Diese Zelllinie exprimiert JAK1, JAK2, JAK3 und Tyk2 (Abbildung 5-8), somit alle vier Mitglieder der JAK-Familie. Die Bestimmung der Zellviabilität mittels MTS-Assay ermöglicht eine Aussage über die metabolische Aktivität von Zellen und über eine Beeinträchtigung des endoplasmatischen Retikulums. Es konnte keine Beeinträchtigung der Viabilität von HT-29 Zellen in einem Konzentrationsbereich von 0,1-100 μM nachgewiesen werden (s. Kap. 5.2.1.3). Erst ab einer Konzentration von 500 μM konnte bei allen drei Substanzen und zu den verschiedenen Zeitpunkten eine verminderte Zellviabilität durch die Substanzen beobachtet werden. Dies ist jedoch eine Konzentration, die keine physiologische Relevanz hat. Dieses Ergebnis wurde an humanen Lymphozyten als weiteren Zelltyp im Konzentrationsbereich von 0,1-100 μM Tofacitinib bestätigt [261].

6.3.3 Tofacitinib, PF-189 und PF-183 induzieren keine Apoptose von HT-29 Zellen bei niedrigen Konzentrationen

Neben dem Einfluss auf die Zellviabilität, sollten die neuen Substanzen im Vergleich mit Tofacitinib *in vitro* hinsichtlich einer möglichen Induktion von Apoptose untersucht werden. Sollten die Amidoxim-Prodrugs Apoptose oder Nekrose in diesem Modell auslösen, wären sie für weitere Untersuchungen nicht geeignet, da sie später im Tiermodell den Verlauf einer akuten induzierten DSS-Kolitis negativ beeinflussen würden. Die Apoptose beschreibt den physiologischen Untergang der Zelle, während sich Nekrose erst nach irreversiblen Veränderungen im Zellkern oder Zytoplasma durch Einwirken von Toxinen, Hitze oder chemischen Substanzen manifestiert und dadurch den pathologischen Untergang der Zelle einleitet [262].

Tofacitinib und die Amidoxim-Prodrugs führten weder zur Apoptose noch Nekrose in Konzentrationen, die nahe dem physiologischen Bereich waren. Erst ab einer Konzentration von 100 μM PF-183 konnten nekrotische Zellen und eine Caspase-abhängige Induktion des Zelltodes durch Bildung des PARP-Spaltproduktes nachgewiesen werden. Somit schädigt PF-183 die DNA der Zellen bei nicht-physiologischen Konzentrationen. Dieses Ergebnis wurde durch eine andere Studie mit Tofacitinib bestätigt [261].

6.3.4 Tofacitinib, PF-189 und PF-183 als potentielle Inhibitoren von Zytokin-vermittelten JAK/STAT-Signalwegen

CED zeichnet sich durch eine erhöhte Sekretion von inflammatorischen Zytokinen, wie IL-6, hylL-6, IFN- γ , IL-22, IL-4 aus [56, 263]. Diese Zytokine binden an spezifische Rezeptoren und führen so zur Aktivierung verschiedener JAK- und STAT-Proteine. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Inhibition der Phosphorylierung von STAT1, 3 und 6 genauer untersucht.

IL-6, hylL-6 und IL-22 induzieren sowohl die Phosphorylierung von STAT1 als auch von STAT3, während IFN- γ lediglich zur Phosphorylierung von STAT1 führt. Mehrere Studien identifizierten sowohl in Tiermodellen als auch in humanen Proben STAT1 als einen Haupttranskriptionsfaktor zur Induktion von Apoptose [133, 264],. wohingegen IL-4 die Phosphorylierung von STAT6 induziert [239].

STAT3 und STAT6 stellen gewebsspezifische Transkriptionsfaktoren dar. So sind sie in intestinalen Epithelzellen (IEC) für die Proliferation und Differenzierung relevant, während ihre Aktivierung in Immunzellen zur Proliferation von Immunzellen führt, was zur Progression einer Entzündung führen kann [239, 265].

Der JAK/STAT-Signalweg hat eine zentrale Bedeutung in der Entstehung und dem Verlauf von CED. Die Inhibition dieses Signalweges durch die Amidoxim-Prodrugs würde somit eine neue Therapiemöglichkeit für die Behandlung von CED darstellen.

6.3.4.1 Inhibition des IL-6-vermittelten JAK/STAT-Signalweges

IL-6, als ein Vertreter der IL-6-R-Familie, ist zellspezifisch ein proinflammatorisches oder antiinflammatorisches Zytokin, das sowohl in MC als auch in CU Patienten erhöht ist [266]. Es wird hauptsächlich durch Makrophagen, Fibroblasten, dendritische Zellen und CD4+T-Zellen der *Lamina propria* sezerniert [56]. Wenn IL-6 nach Sekretion auf Immunzellen wirkt, führt es zur Aktivierung von Th1- und Th17-Zellen, die weitere proinflammatorische Zytokine, wie IFN- γ und IL-1 β , ausschütten, wodurch es zur Progression der Entzündungsreaktion kommt. Außerdem induziert es die Bildung der Akute-Phase-Proteine, die wiederum das Komplementsystem aktivieren. Im Gegensatz dazu hat IL-6 eine antiinflammatorische Wirkung in IECs. Hier aktiviert es die Phosphorylierung von STAT3, welches wichtig für das Überleben und die Proliferation der IECs ist. So zeigten *Il-6*^{-/-} Mäuse, gekennzeichnet durch eine erhöhte

Infiltration der Immunzellen und einen stärkeren Verlust der Kryptenstruktur des intestinalen Epithels, einen signifikant schlechteren Krankheitsverlauf bei einer DSS-induzierten Kolitis als die Wildtyp Mäuse [267]. Die Aktivierung des Signalweges durch IL-6 muss daher differenziert betrachtet werden, weil seine Wirkung abhängig davon ist, auf welchen Zelltyp es wirkt [268].

In vitro konnte die Inhibition der Aktivierung der IL-6 oder hyperIL-6-vermittelten Phosphorylierung von STAT3 und STAT1 durch Tofacitinib, PF-189 und PF-183 sowohl in Modellen intestinaler Epithelzellen (Abbildung 5-15) als auch in Immunzellen (Abbildung 5-20) demonstriert werden. Eine Aktivierung des Signalweges ohne vorherige Stimulation mit Zytokin konnte basal nicht nachgewiesen werden. Erst nach Stimulation mit IL-6 oder hyperIL-6 wurde eine Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 nachweisbar. Die Amidoxim-Prodrugs könnten somit eine protektive Wirkung auf die Progression einer Entzündung und Aktivierung des Immunsystems haben. Die vorliegende Studie demonstrierte, dass sowohl PF-189 als auch PF-183 trotz ihrer Modifikationen die Kapazität besitzen, die Phosphorylierung von STAT3 und STAT1 in den IECs und Immunzellen zu inhibieren. Hierbei ist es jedoch wichtig zu differenzieren, da durch diese Inhibition eine mögliche IL-6-vermittelte Apoptose, aber auch die Proliferation gehemmt werden können. Somit sollte in den nachfolgenden *in vivo* Studien überprüft werden, welchen Effekt die getesteten Substanzen während einer akuten DSS-induzierten Kolitis im intestinalen Epithel der Maus haben.

Ähnlich wie in der vorliegenden Studie, konnte eine Inhibition des IL-6-vermittelten JAK/STAT-Signalweges durch Tofacitinib in humanen CD4⁺T-Zellen nachgewiesen werden [260].

6.3.4.2 Inhibition des IFN- γ -vermittelten JAK/STAT-Signalweges

IFN- γ gehört zu den Typ II Interferonen und bindet an den IFN-Gammarezeptor Typ II [113]. Dieser Rezeptor besteht aus zwei Subtypen, IFN-GR1 und IFN-GR2, und ist assoziiert mit JAK1 und JAK2. Die Bindung von IFN- γ führt zur Phosphorylierung von STAT1 und der Induktion von Apoptose [56, 116]. Zusätzlich wird die bakterielle Immunabwehr durch die verstärkte Expression von Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC) I und II auf T-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen, wie Makrophagen, hochreguliert. Die Proliferation von T-Zellen wird gesteigert [269]. IFN- γ wird vor allem in T-Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK) gebildet. In IECs bewirkt IFN- γ eine erhöhte Expression von MHC II, um die Anzahl Antigen-präsentierender Zellen zu erhöhen und somit die Immunantwort zu verstärken [270]. Des Weiteren ist es für epitheliale Zellen potenziell toxisch und kann die Barriere zerstören [271]. Es konnten sowohl erhöhte Konzentrationen an IFN- γ als auch erhöhte Aktivitäten an STAT1 in Patienten mit CED gefunden werden [133, 272], weshalb eine erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen während einer DSS-induzierten Kolitis zu erwarten ist [273]. In dieser Studie sollte bestimmt werden, ob Tofacitinib und die Amidoxim-Prodrugs diesen Signalweg ausreichend inhibieren.

In vitro zeigten nur Tofacitinib und PF-183 eine Inhibition der Phosphorylierung von STAT1 (Abbildung 5-16). Auch in dieser Studie war keine basale Phosphorylierung von STAT1 detektierbar. Erst nach Stimulation mit IFN- γ konnte die Phosphorylierung von STAT1 nachgewiesen werden. In *in vivo* Studien ist eine erhöhte Apoptose der Zellen in den Mäusen, die PF-189 appliziert bekommen, zu erwarten.

Die gewonnenen Ergebnisse mit Tofacitinib werden durch die Studie mit murinen CD4+T-Zellen unterstützt. Die CD4+T-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Tofacitinib vorab inkubiert und anschließend mit IFN- γ für 30 min stimuliert. Eine deutliche Abnahme der Spiegel an phosphoryliertem STAT1 wurden beobachtet [260].

6.3.4.3 Inhibition des IL-22-vermittelten JAK/STAT-Signalweges

IL-22, ein Vertreter der IL-10-R-Familie, wird von Th2-Zellen sezerniert und zählt zu den antiinflammatorischen Zytokinen, die nur auf Oberflächenzellen, wie den IECs, wirken [274]. Durch die Aktivierung von STAT3 durch IL-22 in IECs kommt es zu einer gesteigerten Proliferationsrate und Differenzierung der Zellen [245]. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von IL-22-abhängigen Genen in Patienten mit MC deutlich höher ist als in CU Patienten. Dabei wird es vermehrt ausgeschüttet, um die Regeneration des intestinalen Epithels zu induzieren[275].

In vitro führte die Behandlung mit Tofacitinib und den Amidoxim-Prodrugs zu einer Inhibition der Phosphorylierung von STAT1 (Abbildung 5-17). Aufgrund der Inhibition der IL-6-vermittelten Phosphorylierung von STAT3 wäre auch die Inhibition der IL-22-vermittelten Phosphorylierung von STAT3 zu erwarten. Jedoch konnte nur nach Behandlung mit Tofacitinib, jedoch nicht mit den Amidoxim-Prodrugs eine Inhibition nachgewiesen werden. Vermutlich ist die IL-22-vermittelte Phosphorylierung von STAT3 stärker als die IL-6-vermittelte, so dass die Amidoxim-Prodrugs diese nicht inhibieren konnten. Die Inhibition mittels Tofacitinib wurde in dieser Arbeit erstmalig gezeigt.

Die IL-22-vermittelte Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges muss anhand der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Aktivierungen von STAT1 und STAT3 differenziert betrachtet werden. Die Aktivierung von STAT3 durch IL-22 führt zu einer vermehrten Proliferation der IECs. Diese wird durch die Substanzen nicht inhibiert. STAT1 wiederum induziert Apoptose in IECs. Durch die Inhibition von p-STAT1 wird somit die Zerstörung der intestinalen Barrierefunktion verhindert. Die Amidoxim-Prodrugs könnten im Vergleich zum Tofacitinib somit *in vivo* positiv auf die Regenerierung der intestinalen Epithelzellen wirken.

6.3.4.4 Inhibition des IL-4-vermittelten JAK/STAT-Signalweges

IL-4 gehört zur IL-2-R-Familie und aktiviert JAK1 und JAK3, wodurch die Phosphorylierung von STAT6 induziert wird [166]. IL-4 wird von Th2-Zellen sezerniert und spielt eine Rolle in der Proliferation von T- und B-Zellen [161]. Über STAT6 vermittelt IL-4 auch eine proliferative Wirkung auf IECs [240].

In der vorliegenden Studie wurde *in vitro* in HT-29 Zellen eine vollständige Inhibition durch Tofacitinib und eine zeitabhängige Inhibition durch PF-183 nachgewiesen. In Immunzellen inhibierte zusätzlich PF-189 die Phosphorylierung von STAT6 (Abbildung 5-18). Erstaunlicherweise wiesen sowohl PF-189 als auch PF-183 einen stärkeren inhibitorischen Effekt in Immunzellen (THP-1, Jurkat) auf, als in IECs (HT-29) (Abbildung 5-20). Möglicherweise ist der inhibitorische Effekt in Immunzellen stärker. Sie könnten somit die Aktivierung der Immunzellen und die Sekretion von Zytokinen durch Immunzellen in der *Lamina propria in vivo* durch Inhibition des JAK/STAT-Signalweges verringern und einen geringeren inhibitorischen Effekt auf die intestinalen Epithelzellen ausüben.

Die Inhibitionsdaten dieser vorliegenden Studie können durch Goreschi *et al.* bestätigt werden [260]. Es wurden CD3+T-Zellen aus humanem Vollblut isoliert, welches vorher mit Tofacitinib inkubiert und anschließend mit IL-4 stimuliert wurde. Durchflusszytometrische Messungen zeigten eine deutliche Abnahme der IL-4-induzierten Phosphorylierung von STAT6 nach Behandlung mit Tofacitinib.

6.3.4.5 Inhibition des JAK/STAT-Signalweges in Organoiden

Bevor die Substanzen in einer akuten DSS-induzierten Kolitis getestet werden sollten, wurden sie zunächst in Organoiden untersucht. Diese stellen Mikrodärme dar, die der physiologischen Anatomie entsprechen [241]. Durch die Erhaltung regenerativer Prozesse, wie der Erneuerung des Epithels durch die Ausdifferenzierung von Stammzellen, stellt dies ein optimales Modell für *in vitro* Untersuchungen des JAK/STAT-Signalweges dar. Die IL-22-vermittelte Phosphorylierung von STAT3 war stärker als die IFN- γ -vermittelte STAT1-Phosphorylierung (Abbildung 5-33), obwohl in HT-29 Zellen die Aktivierung durch IFN- γ stark war. Ein Grund für diese Ergebnisse könnte sein, dass es sich bei den Organoiden um ein Modell der intestinalen Epithelzellen handelt. Der IL-22-Rezeptor ist ein Oberflächenrezeptor und befindet sich mit einer hohen Dichte auf intestinalen Epithelzellen, weshalb die IL-22-vermittelte

Phosphorylierung der STAT-Proteine in diesem Modell stärker ist. Die Rezeptordichte für IFN- γ ist geringer, wodurch weniger IFN- γ an den Rezeptor bindet und zu einer geringen Aktivierung von STAT1 führt. Wie bereits für die HT-29 Zelllinie konnte die Inhibition nach längerer Inkubation mit Tofacitinib und PF-183 auch in diesem Modell erfolgreich nachgewiesen werden. Die Substanzen wirken somit auch in einem komplexen, aus einem Zellverband bestehenden Modell und sind demnach für *in vivo* Studien geeignet.

Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass Tofacitinib und PF-183 bei allen in der vorliegenden Studie getesteten Zytokinen eine höhere inhibitorische Kapazität als PF-189 aufweisen. Eine mögliche Erklärung könnte die schlechtere Selektivität von PF-189 gegenüber JAK3 sein (Abbildung 5-24). Um die gleiche Inhibition von JAK3 zu erreichen, benötigt man die 600-fache bzw. 55-fache Menge an PF-189 als an Tofacitinib bzw. PF-183. Die Selektivitätsstudien konnten diese Erklärung untermauern. PF-189 zeigte bei der hylL-6 bzw. IL-4-vermittelten JAK1-, JAK2- und Tyk2- bzw. JAK3-Aktivierung eine geringe inhibitorische Kapazität bei niedrigen Konzentrationen verglichen mit Tofacitinib oder PF-183 (Abbildung 5-25). Das Ersetzen der Nitril-Gruppe gegen eine Amidoxim-Gruppe scheint demnach die inhibitorische Kapazität zu beeinflussen. Die IC_{50} -Werte für Tofacitinib betragen 1,6 nM. Das Amidin von PF-189 weist aber einen IC_{50} -Wert von 654 nM auf, was zu einer starken Abnahme der inhibitorischen Kapazität führt.

Strukturanalysen ergaben, dass die Nitril-Gruppe in die phosphatbindende glycinreiche Region (*p-Loop*) ragt [237]. Möglicherweise ist aufgrund der Amidin-Gruppe die Bindung von PF-192 in der ATP-Tasche nicht ausreichend stark oder die positive Ladung des Amidins wird dort abgestoßen, sodass es schnell durch ATP verdrängt werden kann. PF-185, das Amidin von PF-183, wurde mit einem veränderten Grundgerüst synthetisiert, um dadurch eine erhöhte Selektivität gegenüber JAK3 zu schaffen [276]. Laufer *et al.* zeigten hierbei, dass die Amidin-Gruppe die Selektivität erhöht, in dem es das Aspartat 912 in der ATP-Bindetasche bindet, welches nur in JAK3-Proteinen gefunden wurde.

In der vorliegenden Studie konnte in HT-29 zusätzlich gezeigt werden, dass PF-183 selektiver als Tofacitinib ist, da es erst bei hohen Konzentrationen die

148 Diskussion

hyIL-6-vermittelte Aktivierung von JAK1, JAK2 und Tyk2 hemmt (Abbildung 5-25). Die Selektivität in HT-29 Zellen gegenüber JAK3 ist jedoch mit der Selektivität von Tofacitinib vergleichbar, da beide bei gleichen Konzentrationen die IL-4-vermittelte Aktivierung von JAK1 und JAK3 inhibierten (Abbildung 5-26). Bei Kinase-Assays gegen JAK3 konnten jedoch höhere IC_{50} -Werte von PF-183 verglichen mit Tofacitinib bestimmt werden. In der Arbeitsgruppe von Laufer konnten IC_{50} -Werte für Tofacitinib gegen JAK3 von 1,6 nM, für PF-183 von 21,1 nM und für das korrespondierende Amidin 12,2 nM bestimmt werden. PF-183 ist für eine Behandlung von Vorteil, da es bei geringen Konzentrationen JAK3 inhibiert, aber nicht JAK1,2 und Tyk2 und somit zu einer Verringerung der Nebenwirkungen führt.

6.3.5 PF-183 führt zu einer längeren Inhibition als PF-189

Die Bestimmung der Kinetik der neuen Amidoxim-Prodrugs diente der Untersuchung, ob PF-189 und PF-183 kompetitive Inhibitoren gegenüber JAK-Proteinen sind. Eine kompetitive Inhibition liegt vor, wenn der Inhibitor durch das Substrat des Enzyms verdrängt werden kann und somit die Inhibition aufgehoben wird.

In der vorliegenden Studie konnte in ersten *in vitro* Versuchen gezeigt werden, dass alle drei Substanzen kompetitive Inhibitoren sind (Abbildung 5-21, 5-22). Jedoch besitzt PF-183 eine längere Inhibitionskapazität gegenüber allen vier JAK-Proteinen verglichen mit Tofacitinib und PF-189. Diese Erkenntnisse geben erste Hinweise für neue Therapieansätze. Zurzeit wird Tofacitinib täglich oral in Konzentrationen von 5-10 mg /Tag verabreicht. Diese Konzentrationen genügen bereits zum Auftreten schwerer Nebenwirkungen. PF-183 könnte zur selektiven Inhibition von JAK3 in geringeren Konzentrationen verabreicht werden, wodurch es trotz längerer Inhibition zur verringerten Manifestation von Nebenwirkungen führen könnte.

6.4 Induktion einer akuten *dextran sodium sulfate*-Kolitis

Nachdem die neuen Substanzen *in vitro* erfolgreich auf ihre inhibitorische Kapazität getestet wurden, sollten sie in einem DSS-Kolitis-Modell in der Maus untersucht werden. Tofacitinib führte zur Remission der Krankheitssymptome in CU-Patienten, weshalb die JAK-Inhibitoren PF-189 und PF-183 ebenfalls in diesem Krankheitsbild untersucht werden sollten [174]. Des Weiteren wurde getestet, ob eine selektive JAK3-Inhibition auch einen Vorteil bei CED hat.

Das bekannteste Tiermodell zur Untersuchung der experimentellen Kolitis ist die Induktion einer akuten Entzündung im Kolon durch Gabe von DSS (*dextran sodium sulfate*) [277]. Durch die Gabe des negativ geladenen Polysaccharides im Trinkwasser kommt es zur Zerstörung des intestinalen Epithels, wodurch die Permeabilität erhöht wird und Bakterien in die *Lamina propria* eindringen können. Der Krankheitsverlauf ist durch zwei Phasen gekennzeichnet. Nach ca. 5 Tagen kommt es zur Entwicklung der Entzündung, gezeichnet durch eine starke Gewichtsabnahme, rektalen Blutungen und Durchfall. Nach ungefähr sieben Tagen tritt die zweite Phase auf, in der es zur Regeneration durch Zunahme des Gewichtes und Verfestigung des Stuhles kommt. Die Ursache für die Entwicklung der Entzündung im Kolon, sowie der Mechanismus der Zerstörung des intestinalen Epithels, sind noch unklar. Laroui *et al.* postulierte eine Bildung von Nanolipokomplexen mit mittelkettigen Triglyceriden im Kolon, wodurch die Phospholipidmembran zerstört wird und die Permeabilität steigt [230].

6.4.1 Die Behandlung mit Tofacitinib, PF-189 und PF-183 führte zum Gewichtsverlust

Die Induktion der akuten DSS-Kolitis in der C57BL/6J Maus konnte erfolgreich durchgeführt werden. Die Mäuse hatten an Gewicht verloren, das Kolon hatte sich verkürzt und histologisch konnte ein Verlust der Kryptenstruktur beobachtet werden (Abbildung 5-46). Diese sind charakteristische Parameter, die während einer akuten induzierten DSS-Kolitis beobachtet werden können [247].

Durch die Behandlungen der Mäuse mit Tofacitinib, PF-189, PF-183 und PF-183* konnte keine Verbesserung der Parameter festgestellt werden. Interessanterweise führte die Behandlung mit Tofacitinib einen Tag vor dem Ende des Experimentes zu einer signifikanten Reduktion des Gewichtes (Abbildung 5-47 A), was für eine drastische Verschlechterung des Krankheitsverlaufes spricht. Während die

150 Diskussion

Behandlung mit PF-189 und PF-183 weder eine signifikante Verschlechterung noch eine Verbesserung hervorrief (Abbildung 5-47 B, C). Es konnte eine tendenzielle Überlegenheit der Amidoxim-Prodrugs in höheren Konzentrationen gegenüber Tofacitinib festgestellt werden. Ein möglicher Grund für die schlechteren Ergebnisse mit Tofacitinib ist die systemische Verteilung von Tofacitinib, so dass es nicht im Kolon wirkt, sondern schnell in die Leber und Niere gelangt, metabolisiert und ausgeschieden wird. Die systemische Verteilung von Tofacitinib konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden (Abbildung 5-37). Die Amidoxim-Prodrugs wurden nur im Kolon nachgewiesen, so dass davon auszugehen ist, dass sie länger als Tofacitinib im Kolon wirksam waren. Durch ihre lokale Applikation konnten sie sowohl in den IECs als auch in den Immunzellen der *Lamina propria* wirken. Womöglich führt diese Eigenschaft zu einer geringeren Schwere des Krankheitsverlaufes. Das Versagen von Tofacitinib während einer akuten DSS-induzierten Kolitis konnte auch von De Vries *et al.* bestätigt werden [258]. Die orale Gabe von Tofacitinib in einer Konzentration von 30 mg/kg KG führte zu keiner Verbesserung der Kryptenstruktur, des histologischen Indexes und bewirkte keine Gewichtszunahme der C57BL/6J Mäuse. Ähnlich wie PF-189 und PF-183 konnte der von De Vries *et al.* verwendete selektive JAK1-Inhibitor keine Verbesserung der klinischen Parameter in einer akuten Kolitis hervorrufen.

6.4.2 PF-189 induzierte die Reduktion von S100a8, S100a9 und IL-6

Der Kalzium-bindende Proteinkomplex S100A8/S100A9, auch Calprotectin genannt, wird als Biomarker während der CED gemessen [278]. Es kann Kalzium-Ionen, aber auch Zink- und Mangan-Ionen binden, wodurch es in der Lage ist, antibakteriell zu wirken. Die Sekretion dieses Proteinkomplexes wird durch IL-1, TNF- α oder NF- κ B induziert [246, 279]. Die Ausschüttung von S100A8/S100A9 konnte auch mit der gesteigerten Sekretion von IL-22 in Verbindung gebracht werden [280].

Steigt die Expression dieses Komplexes vor allem im Stuhl eines CED Patienten, so ist das ein Zeichen für eine Ansammlung von Neutrophilen Granulozyten, aktivierten Monozyten und Makrophagen im Darm und somit für einen Entzündungsprozess [281-283]. Die Reduktion dieses Proteinkomplexes signalisiert wiederum eine Remission der Entzündung und eine beginnende Wundheilung [284].

In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass nur PF-189 zu einer Verminderung der mRNA-Level sowohl von *S100a8* als auch von *S100a9* führte (Abbildung 5-51). Ein Grund könnte die mangelnde Selektivität von PF-189 sein. Da die Ausschüttung des Proteinkomplexes durch TNF- α oder IL-22 JAK-abhängig induziert wird, hemmt PF-189 die Sekretion, weil es alle JAK-Proteine inhibiert und womöglich andere Kinasen hemmen könnte [285-287]. Bei den Mäusen, die mit PF-189 behandelt wurden, hatte vermutlich die Wundheilung aufgrund der Abnahme des Proteinkomplexes begonnen. Die Behandlung mit Tofacitinib und PF-183 zeigte dagegen keinen Einfluss auf die mRNA-Level dieses Proteinkomplexes. Tofacitinib ist wegen der systemischen Verteilung im Kolon nicht wirksam und PF-183 ist vermutlich zu selektiv.

Weiterhin zeigte lediglich PF-189 während der akuten DSS-induzierten Kolitis eine verminderte Expression der mRNA von *Il-6*. PF-189 als unselektiver Inhibitor hemmte es vermutlich auch den IL-17-vermittelten JAK/STAT-Signalweg, der die Ausschüttung von IL-6 induziert. Bei der Behandlung mit Tofacitinib konnten erhöhte *Il-6*-Level detektiert werden. IL-6 wird zum Beispiel durch IL-17 induziert und vermehrt in Makrophagen, Fibroblasten, dendritische Zellen und CD4+T-Zellen der *Lamina propria* gebildet [56, 288]. IL-17 induziert die Aktivierung von JAK1, 2, 3 und Tyk2 [289]. PF-189 hat vermutlich die Ausschüttung von IL-6 durch die Inhibition des IL-17-vermittelten JAK/STAT-Signalweges in Immunzellen inhibiert und zeigt somit eine Überlegenheit gegenüber Tofacitinib und PF-183.

6.4.2.1 Einfluss geringer PF-183 Konzentrationen auf den Verlauf der akuten DSS-induzierten Kolitis

Die Behandlung mit Tofacitinib wies einen positiven Einfluss auf die Entzündung in CU-Patienten auf. Tofacitinib inhibiert vor allem JAK1 und JAK3, weshalb die selektive Inhibition von JAK3 durch eine geringe Konzentration von PF-183 getestet wurde.

Die Behandlung mit geringen Konzentrationen an PF-183 führte zu extremen Gewichtsabnahmen. Vier Tiere mussten frühzeitig aus den Versuchen genommen werden, da sie 20 % des Ursprungsgewichtes verloren hatten. Eines dieser Tiere musste sogar zwei Tage vor dem Ende aus dem Experiment genommen werden. Gründe für das vorzeitige Abbrechen konnten mithilfe des CXCL-1-ELISAs ermittelt werden. Die akute DSS-induzierte Kolitis beschränkt sich zu Beginn hauptsächlich auf

das Kolon und kann sich später systemisch ausbreiten. CXCL-1 dient als klassischer Marker für eine Entzündung. Im Plasma der mit 0,1 mg/kg KG PF-183 behandelten Mäuse wurden erhöhte CXCL-1-Werte nachgewiesen (Abbildung 5-49). Das bedeutet, die Entzündung hatte sich systemisch verteilt, weshalb die Tiere früher aus dem Experimenten genommen werden mussten. Auch die Verkürzung des Kolons dieser Gruppe verglichen mit den anderen Gruppen war signifikant höher (Abbildung 5-52). Eine Hypothese für diesen schlechteren Krankheitsverlauf wäre, dass die Gabe einer geringeren Konzentration von PF-183 eine selektivere Inhibition von JAK3 hervorrief, was zu einer spezifischen Inhibition der Signaltransduktion von IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21 zur Folge haben könnte (Abbildung 6-2). Durch Kumra *et al.* konnte gezeigt werden, dass die IL-2-vermittelte JAK3/STAT5-Aktivierung relevant für die Zellmigration und damit auch für die Wundheilung der IECs ist [128]. Dabei wurde ein sogenannter Scratch-Assay mit HT-29 Cl-19A Zellen durchgeführt und es konnte nachgewiesen werden, dass die IL-2-vermittelte Wundheilung über JAK3 aktiviert wurde. Außerdem wurden in einer weiteren Studie STAT5^{ΔIEC} Mäuse generiert, die eine Deletion des STAT5-Gens in den IECs aufwiesen. Diese Tiere waren anfälliger für eine DSS-induzierte Kolitis, verbunden mit einer verspäteten Induktion der Wundheilung [290]. Auch die IL-4-vermittelte JAK3-Aktivierung in IECs ist von großer Bedeutung für die Proliferation [240]. Mc Gee *et al.* zeigten in IEC-6, einer intestinalen Epithelzelllinie von Ratten, dass die Stimulation mit IL-4 über die Aktivierung von STAT6 durch JAK1 und JAK3 zu einer gesteigerten Zellproliferation führte. Zusätzlich konnte Mishra *et al.* in einer *Jak3*-defizienten Maus demonstrieren, dass der Verlust von *Jak3* einerseits zu einer Reduktion der Expression bestimmter Differenzierungsmarker in IECs führte und andererseits die vollständige Architektur des intestinalen Epithels, einschließlich der Muzinschicht, beeinträchtigt [127]. So zeigten *Jak3*^{-/-} Mäuse eine erhöhte Infiltration der Immunzellen, einen stärkeren Verlust der Kryptenstruktur des intestinalen Epithels sowie einen signifikant schlechteren Krankheitsverlauf bei einer DSS-induzierten Kolitis als die Wildtyp-Mäuse.

Die selektive JAK3-Inhibition ist somit während einer akuten DSS-induzierten Kolitis für die Regeneration des intestinalen Epithels von Nachteil. Obwohl man vermuten würde, dass eine JAK3-Inhibition in Immunzellen einen positiven Effekt auf den Verlauf der Kolitis hat, da auch die IL-2- oder IL-4-vermittelte Aktivierung des JAK3-Proteins

zur Proliferation der Immunzellen der *Lamina propria* führt. Zusätzlich wies die orale Gabe von Tofacitinib gute Ergebnisse in der CU-Studie auf, was dafürspricht, dass eine JAK3-Inhibition wichtig für die Verminderung der Entzündung ist [174]. In diesem Modell der DSS-Kolitis ist jedoch die STAT5- oder STAT6-vermittelte Regeneration des Epithels für die Verbesserung der Symptome und den Krankheitsverlauf entscheidend, als die erhöhte Aktivität der Immunzellen.

Ein weiterer Aspekt der gezielten JAK3-Inhibition durch geringe Konzentrationen an PF-183 ist, dass andere JAK-Proteine nicht gehemmt werden. Dadurch können Zytokine, wie IL-6 oder IL-22 weiterhin den JAK/STAT-Signalweg aktivieren und zur Progression der Entzündung führen. Das könnte die Entwicklung der systemischen Entzündung nur bei der niedrig dosierten Gabe von PF-183 in der vorliegenden Arbeit erklären.

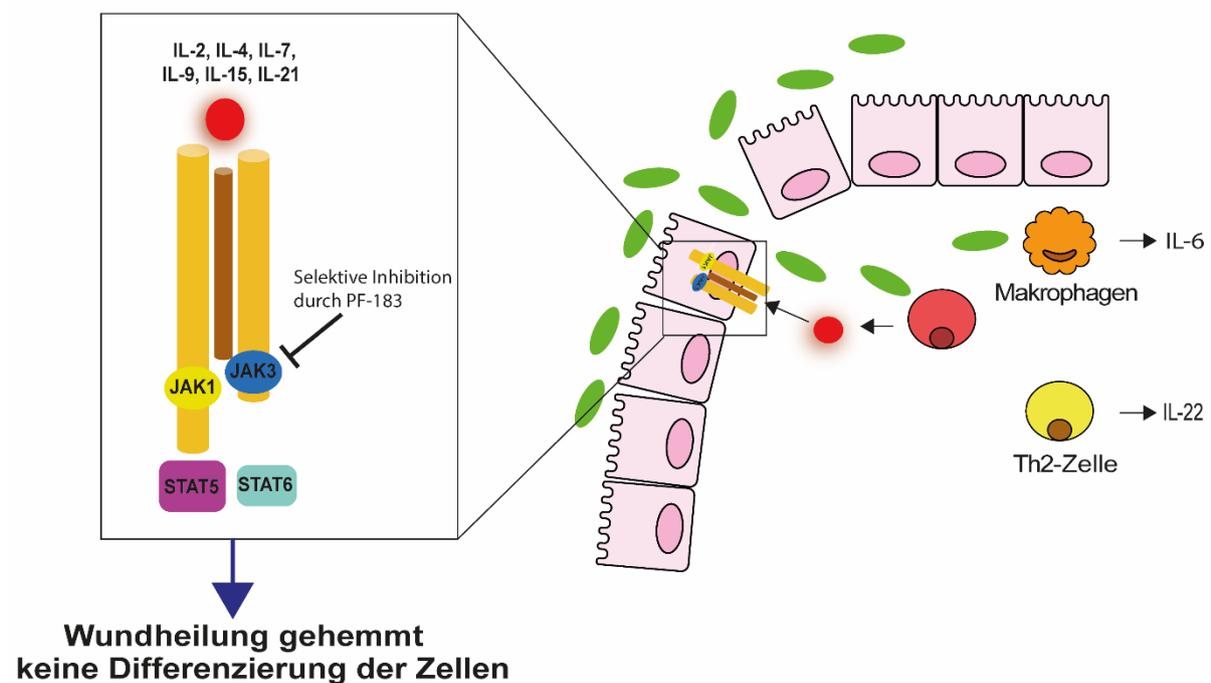


Abbildung 6-2: Mögliche Erklärung der Folgen selektiver Inhibition von JAK3 durch geringe Konzentrationen an PF-183

Die Grafik stellt einen hypothetischen Mechanismus zur Klärung der Frage dar, weshalb die mit PF-183* behandelten Mäuse einen schlechteren Krankheitsverlauf aufwiesen und eine systemische Entzündung entwickelten. Durch Zerstörung der intestinalen Schutzbarriere kommt es zu einem verstärkten Einstrom von Bakterien, wodurch es zur Aktivierung von Immunzellen in der *Lamina propria* kommt. T-Zellen sezernieren daraufhin IL-2, welches an den IL-2R bindet. Durch die selektive Inhibition durch PF-183* ist nur JAK3 inhibiert, was zu einer verminderten Differenzierung und Proliferation der IECs führt. Währenddessen schütten weitere Immunzellen Zytokine aus. Die JAKs an deren Rezeptoren sind nicht gehemmt. Es kommt zu einer gesteigerten Immunantwort. JAK: Januskinase, STAT: *signal transducer and activator of transcription*, Th: T-Helfer, IL: Interleukin,

6.5 Einfluss von Tofacitinib, PF-189 und PF-183 auf die Wundheilung

Im physiologischen Zustand befinden sich die IECs in einem Gleichgewicht zwischen Zellmigration, -proliferation und -differenzierung. Kommt es zu einer Verletzung, so verändern die benachbarten Zellen ihre Form und migrieren in den geschädigten Bereich. Dort kommt es einerseits durch vermehrte Proliferation der Enterozyten zur Wiederherstellung des Zellverbandes, andererseits jedoch auch durch die verstärkte Differenzierung zur Rekonstitution des Barrierschutzes [291]. STAT3 ist ein bedeutender Transkriptionsfaktor für die Wundheilung, da er an der Proliferation und Migration gewebespezifischer Zellen beteiligt ist [265]. In den IECs ist vor allem die IL-22-vermittelte Aktivierung von STAT3 an der Wundheilung beteiligt. Die IL-6-vermittelte Phosphorylierung von STAT3 spielt dabei eine untergeordnete Rolle [245]. Ein weiterer für die Wundheilung relevanter Transkriptionsfaktor ist, wie in Kap. 6.3.4.4 beschrieben, STAT6.

CED führt zu einer massiven Schädigung des intestinalen Gewebes, weshalb eine Therapie, bei der die Wundheilung nicht negativ beeinflusst wird, notwendig ist. Deshalb sollten Tofacitinib und die neuen Amidoxim-Prodrugs in *in vitro* Studien auf ihre inhibitorische Kapazität bezüglich der Wundheilung getestet werden. Später kann basierend auf diesen Erkenntnissen eine mögliche Aussage über die *in vivo* Wundheilung gemacht werden.

6.5.1 PF-189 und PF-183 inhibierten die Wundheilung *in vivo* aber nicht *in vitro*

Es wurde ein Scratch-Assay verwendet, welches ein Modell für die *in vitro* Zellmigration darstellt [292]. Für die IL-22-vermittelte Wundheilung wurden zwei Versuchsanordnungen gewählt, dabei wurden die HT-29 Zellen entweder 24 h oder 72 h stimuliert und gleichzeitig inhibiert. Weder Tofacitinib noch die beiden neuen Substanzen beeinträchtigten bei der 24-stündigen Inkubation die Wundheilung (Abbildung 5-27 A). Obwohl die Phosphorylierung von STAT3 durch Tofacitinib inhibiert wurde, konnte keine verminderte Zellmigration beobachtet werden. Nach dauerhafter Stimulation von 72 h und gleichzeitiger Inhibition wurde eine verminderte Zellmigration nach der Behandlung mit Tofacitinib und PF-189 nachgewiesen (Abbildung 5-28). Dabei konnte nach längerer Stimulation mit IL-22 eine signifikant höhere Zellmigration als nach 24-stündiger Stimulation beobachtet werden. Vermutlich

ist bei kurzer IL-22-vermittelten Phosphorylierung von STAT3 die Zellmigration nicht abhängig von STAT3, während STAT3 erst nach längerer Aktivierung eine wichtige Rolle in der Zellmigration spielt. PF-183 führte bei beiden Ansätzen zu keiner Inhibition der Zellmigration, jedoch inhibierte es nicht die Phosphorylierung von STAT3.

Weiterhin wurde ein JAK3/STAT6-aktivierendes Zytokin betrachtet, um die STAT6 abhängige Wundheilung zu bestimmen. Die IL-4-vermittelte STAT6-Phosphorylierung führte zu einer signifikanten Erhöhung der Zellmigration, die jedoch durch Tofacitinib inhibiert wurde (Abbildung 5-27 B). PF-189 und PF-183 hemmten die Phosphorylierung von STAT6 nicht, jedoch auch nicht die Zellmigration.

Somit wurde für das *in vivo* Experiment erwartet, dass PF-183 keinen negativen Einfluss auf die Induktion der Wundheilung ausüben wird, während Tofacitinib diese verstärkt hemmt.

Die Markierung der Zellen mittels BrdU und Ki67 dient der Bestimmung proliferierender Zellen. Die Anzahl BrdU-positiver Zellen zeigte keinen Unterschied zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen (Abbildung 5-54 A). Die Anzahl Ki67-positiver Zellen war nach der Behandlung mit PF-189 und PF-183 signifikant erhöht (Abbildung 5-54 B). Betrachtet man jedoch den histologischen Index (Abbildung 5-53), der die Wundheilung miteinbezieht, war kein Unterschied zwischen den einzelnen Verbindungen festzustellen. Die Markierung mit Ki67 färbt alle proliferierenden Zellen, auch Stammzellen. Tofacitinib, PF-189 und PF-183 induzierten in Organoiden die mRNA-Expression von Stammzellmarkern *Ascl2*, *Lgr5* und *Olfm4*. Stammzellen differenzieren dann zu Becherzellen oder Paneth-Zellen. Diese Zellen haben keinen großen Einfluss auf die Wundheilung. Deshalb konnte keine verbesserte Regeneration des intestinalen Epithels in der akuten DSS-induzierten Kolitis nachgewiesen werden.

Die Spiegel an phosphoryliertem STAT3 waren in Tieren, die eine DSS-induzierte Kolitis hatten, erhöht, jedoch konnte nur in einigen Mäusen die Inhibition durch Tofacitinib, PF-189 und PF-183 nachgewiesen werden (Abbildung 5-49). Möglicherweise wurde einerseits durch die inhomogene Aufnahme des Trinkwassers, wodurch unterschiedliche Mengen an DSS in das Kolon gelangten, die Entzündung nicht gleichmäßig induziert. Andererseits wurden die Kolonproben nach 24-stündiger Applikation gesammelt. Dadurch waren bei einigen Mäusen die Substanzen schon

156 Diskussion

abgebaut worden. Die Theorie wird durch die *in vitro* Kinetik der Substanzen untermauert. Auch Suzuki *et al.* bestätigten durch ihre Beobachtungen die hohen Phosphorylierungslevel von STAT3 während einer akuten induzierten DSS-Kolitis [243].

Durch Expressionsanalysen der erhöhten mRNA-Level von *Reg3b* und *Reg3g* konnte die erhöhte Transkription von STAT3 nach Behandlung mit PF-183 nachgewiesen werden. *Reg3b* und *Reg3g* sind Gene, deren Transkription durch die Phosphorylierung von STAT3 aktiviert wird [293]. Sie sind antimikrobiell wirksam und werden vermehrt nach Aktivierung von STAT3 ausgeschüttet. Die Behandlung mit PF-183 zeigte tendenziell erhöhte Werte an mRNA-Level von *Reg3b* und *Reg3g*, jedoch schwankte die Standardabweichung, so dass keine Signifikanz bestimmt werden konnte. Der Grund hierfür ist, dass vier der behandelten Tiere geringe und die anderen vier erhöhten Expressionslevel aufwiesen. Ein sogenannter „Cage-Effekt“ kann ausgeschlossen werden, da die Tiere nicht in einem Käfig gehalten wurden. Somit inhibiert PF-183 nicht die Freisetzung der antimikrobiell wirksamen Peptide, die zur Abwehr der invasiven Bakterien in der *Lamina propria* notwendig sind.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die Amidoxim-Prodrugs zwar im *in vitro* Modell zu keiner Inhibition der Zellmigration führten, jedoch *in vivo* keine Regeneration des intestinalen Epithels induzierten. Auch Tofacitinib versagte in diesem Modell komplett, obwohl es in CU-Patienten zu einer Remission der Krankheitssymptome führte [174].

Eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen *in vitro* und *in vivo* könnte die Komplexität der Inhibition von STAT3 in den intestinalen Epithelzellen sein. *In vitro* wurde der Effekt von PF-189 und PF-183 auf die Zellmigration höchstens 72 h bestimmt, während *in vivo* die Inhibition über neun Tage stattfand. Nach 72 h konnte man schon eine Inhibition durch PF-189 sehen. Bei längerer Inkubation mit PF-183 hätte man wahrscheinlich auch einen Effekt auf die Wundheilung gesehen. Eine Inhibition von STAT3 in intestinalen Epithelzellen führte zu einer verminderten Proliferation und Regenerierung des intestinalen Epithels. Diese Ergebnisse konnten durch die Untersuchungen an *Stat3^{ΔIEC}* Mäusen, in denen die Deletion in den IECs generiert wurde, untermauert werden [245]. In diesen Mäusen wurde eine akute DSS-induzierte

Kolitis durchgeführt und sie zeigten einen verschlechterten Krankheitsverlauf, gezeichnet durch eine rapide Gewichtsabnahme, eine zerstörte Kryptenstruktur mit einer erhöhten Anzahl apoptotischer Zellen.

Außerdem wurde *in vitro* nur der Einfluss der Inhibition auf ein STAT-Protein untersucht. *In vivo* spielt die Inhibition mehrerer STAT-Proteine, wie STAT5 oder STAT6 eine Rolle. Die Relevanz von STAT5 und STAT6 für die Differenzierung von IECs wurde bereits in Kap. 6.3.4.4 umfassend diskutiert. Somit könnte die gezielte Inhibition über längere Zeit von STAT3, STAT5 und STAT6 ein Faktor für die fehlende Induktion der Wundheilung sein.

6.5.2 Tofacitinib führte zu einer erhöhten Anzahl apoptotischer Zellen

Bevor die Apoptose *in vivo* untersucht werden sollte, wurde sie *in vitro* durch IFN- γ induziert und die inhibitorische Kapazität von Tofacitinib und den Amidoxim-Prodrugs getestet. Es konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass die IFN- γ -vermittelte STAT1-Phosphorylierung zur Apoptose führt (Abbildung 5-31). Weiterhin konnte *in vitro* demonstriert werden, dass nur Tofacitinib die IFN- γ -vermittelte STAT1-Phosphorylierung inhibierte und somit den Zelltod verhinderte. Dieser Zelltod war auch Caspase-abhängig, welches durch die Bildung des Spaltproduktes von PARP verdeutlicht wurde.

In vivo konnte jedoch in den mit Tofacitinib behandelten Tieren eine erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen gemessen werden, während die Behandlung mit PF-189 und PF-183 zu keiner Induktion der Apoptose führte. Hier ist eine deutliche Diskrepanz zwischen den *in vitro* und *in vivo* Daten festzustellen. Eine gezielte Wirkung im Kolon sorgte somit zu einer verminderten Phosphorylierung von STAT1 und zu einer verminderten Apoptose.

Die Induktion der Apoptose durch STAT1 wurde auch in *Stat1*^{-/-} Mäusen bestätigt [134]. In einem 3-Methylcholanthren-Modell zur Induktion von Tumoren konnte nachgewiesen werden, dass die Induktion IFN- γ -vermittelt war, da in INF γ ^{-/-} Mäuse ein schnelleres Wachsen von Tumoren zu beobachten war. Zusätzlich zeigten die STAT1^{-/-} Mäuse im selben Modell die gleiche Anfälligkeit und Entwicklung von Tumoren. Somit ist die IFN- γ -vermittelte STAT1-Phosphorylierung für die Induktion der Apoptose

notwendig. Des Weiteren wiesen Horino *et al.* eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen während einer akuten DSS-induzierten Kolitis nach [273].

6.5.3 Bestätigung des Prodrug-Prinzips

Die Bestimmung der oralen Bioverfügbarkeit von Tofacitinib nach rektaler Applikation ergab keinen messbaren Vorteil zur intraperitonealen bzw. oralen Gabe. Als oral zugelassener JAK-Inhibitor verteilt sich Tofacitinib in allen Organen [195]. In der vorliegenden Arbeit konnte trotz rektaler Gabe die Distribution ebenfalls in Leber und Niere beobachtet werden (Abbildung 5-37). Die Ergebnisse der Verteilung und Absorption von Tofacitinib demonstrieren einerseits, dass die rektale Gabe von Tofacitinib längerfristig zum Auftreten Tofacitinib-spezifischer Nebenwirkungen führen könnte und andererseits die erfolgreiche Applikation mittels viskoser Klistiers. Die entwickelte HPLC-Methode zur Quantifizierung und Qualifizierung von Tofacitinib zeigte eine gute Linearität. Die Wiederfindung gibt an, wie viel Wirkstoff nach Aufarbeitung wiedergefunden werden konnte. In diesem Fall war diese über 90 % und demnach optimal zur Bestimmung von Tofacitinib in den Organen. Die Richtigkeit gibt die Abweichung des Messwertes vom wahren Wert an. Diese lag ebenfalls über 90 %.

Der Einsatz eines Amidoxim-Prodrugs, welches nach Aufnahme und Reduktion in das Amidin protoniert vorliegt und somit nicht mehr die IECs verlassen kann, zeigte erfolgsversprechende Ergebnisse. Nach 90-minütiger Applikation der Substanzen konnten diese weder in der Leber noch in der Niere nachgewiesen werden (Abbildung 5-42). Jedoch konnten sie im Kolon quantifiziert werden, wobei sich Tofacitinib nach dieser Zeit bereits systemisch verteilt hatte. Während nur noch das Amidin PF-192 bestimmt werden konnte, wurde sowohl PF-183 als auch das Amidin PF-185 detektiert. Eine mögliche Erklärung ist hier, dass das Kolon nach Entnahme nicht ausreichend gespült wurde und PF-183 ebenfalls quantifiziert wurde. PF-189 kann aufgrund der längeren Aufarbeitung in ein nicht untersuchtes Zwischenprodukt zerfallen sein, so dass es nicht mehr quantifiziert werden konnte. Möglicherweise wiesen die Prodrugs eine andere Kinetik als Tofacitinib auf, jedoch konnten sie auch nach 24-stündiger Applikation nicht mehr quantifiziert werden. Die Bestimmung der Kinetik *in vitro* zeigte, dass Tofacitinib und PF-192 nach einer Stunde und PF-183 nach sechs Stunden nicht mehr wirksam waren und womöglich abgebaut wurden

(Abbildung 5-23, 5-24). Dies könnte eine Erklärung für das Fehlen der Substanzen in Leber, Niere und Kolon sein.

Die Mangelnde Stabilität von PF-189 wurde durch Stabilitätsuntersuchungen bestätigt (Abbildung 5-9). Die Stabilität von PF-183 konnte bei pH 7 und 9 mittels HPLC-Analytik nicht bestimmt werden. Die Substanz fiel bei den pH-Werten aus und lag als Suspension vor. Für die Untersuchungen mittels HPLC-Analytik wurden die Proben vor der Befüllung der Vials gemischt, um eine fein verteilte Suspension zu erhalten, jedoch standen die Proben länger bis sie anschließend vermessen wurden. Währenddessen sedimentierte der Feststoff und die Injektion in die HPLC erfolgte dann inhomogen. Trotzdem zeigte die Messung der Kinetik und der inhibitorischen Kapazität in HT-29 Zellen, dass PF-183 über 72 h stabil für die Inhibition im jeweiligen Zellmedium vorlag.

Schon am Amidoxim-Derivat des Pentamidins konnte Clement *et al.* zeigen, dass dieses nach Injektion in Ratten zum Pentamidin reduziert wird [294]. Zusätzlich konnte durch dieses Prinzip die Bioverfügbarkeit des Pentamidins erhöht werden.

Für die Bestimmung von PF-189/PF-192 wurde dieselbe HPLC-Methode, wie zur Bestimmung von Tofacitinib verwendet. Trotzdem ist die Wiederfindung von PF-189 als auch von PF-192 geringer. Der Grund für diese Diskrepanz ist die Wellenlänge, bei der gemessen wurde. Das Amidoxim und Amidin weisen ein Absorptionsmaximum bei 210 nm bis 240 nm auf. In diesem Bereich konnte jedoch nicht gemessen werden, da auch Proteine bei 190 nm bis 230 nm absorbierten und somit zu einer Überdeckung der Amidoxim- oder Amidin-Signale führen konnten. Zusätzlich ist es möglich, dass PF-192 als Amidin bei physiologischen pH-Werten positiv geladen vorlag und an das Protein band, so dass eine geringe Menge an Amidin ebenfalls präzipitierte.

Die geringe Wiederfindung von PF-185 und PF-183 lässt sich auch mit der Verwendung einer Wellenlänge bei der nicht das Absorptionsmaximum der Substanzen liegt, erklären. Ihr Maximum befand sich bei 210 nm bis 230 nm. Bei 250 nm ist keine Absorption zu sehen, weshalb die Stärke des Signals gering war. Zusätzlich ließ sich das Amidin in keinem Lösungsmittel lösen und lag als Suspension vor. Dies könnte dazu führen, dass in der Lösung das Molekül nicht homogen verteilt vorlag und somit nicht gleichmäßig aufgenommen werden konnte.

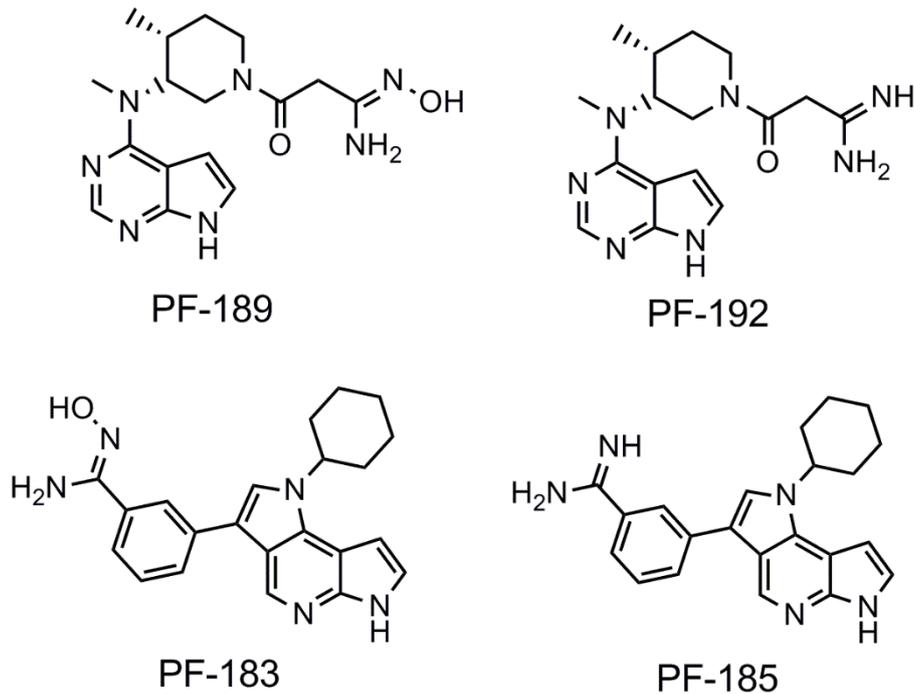


Abbildung 6-3: Amidoxim-Prodrugs (PF-189, PF-183) und die korrespondierenden Amidine (PF-192, PF-185)

6.5.4 Amidoxim-Prodrugs zeigen keinen Effekt auf eine akute DSS-Kolitis

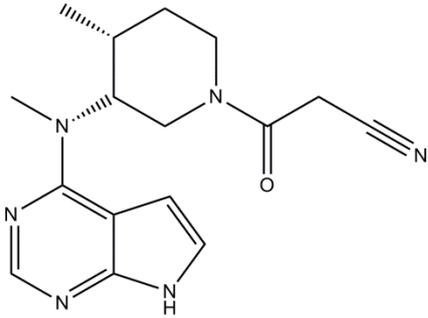
Obwohl die Amidoxim-Prodrugs vielversprechende Resultate in *in vitro* Experimenten aufwiesen und die Funktionalität des Konzeptes nachgewiesen wurde, konnten sie in dem hier verwendeten Modell der DSS-induzierten Kolitis keine Verbesserung des Krankheitsbildes hervorrufen. Erstaunlicherweise zeigte jedoch auch Tofacitinib in diesem Modell keinen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf, obwohl es erfolgreich in einer CU-Studie angewendet wurde [174]. Da die Referenzsubstanz schon nicht positiv wirkte, ist ein Mangel der Wirksamkeit der modifizierten JAK-Inhibitoren keine Überraschung. Durch die Akkumulation der Prodrugs im Kolon konnten diese jedoch eine geringe Verbesserung des Krankheitsverlaufes hervorrufen.

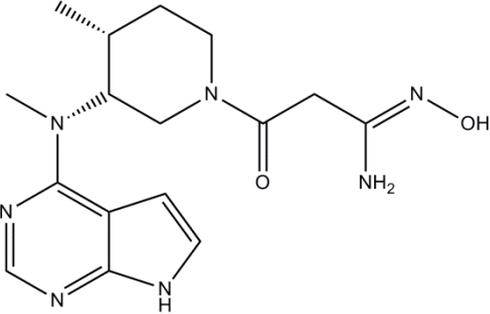
Die Bestimmung der Expression der einzelnen JAK- und STAT-Proteine in den Abschnitten des murinen Darmes ergab, dass vor allem STAT3 eine große Rolle im Kolon spielt. Da STAT3 sowohl für die Proliferation der IECs als auch der Immunzellen relevant ist, ließe sich vermuten, dass die Inhibition zu einem Rückgang der Entzündung führt. Es wurde jedoch deutlich, dass die Regeneration des intestinalen Epithels wichtiger für den Krankheitsverlauf ist, als die Inhibition der Aktivierung des

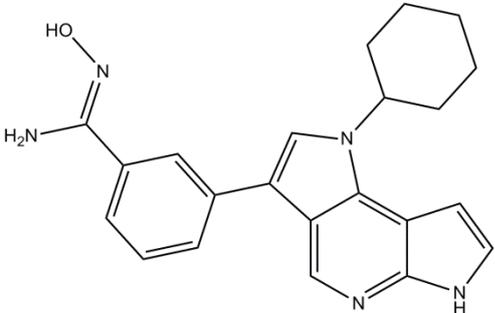
Immunsystems. Die Aktivierung des Immunsystems bzw. die Inhibition des JAK/STAT-Signalweges in Immunzellen ist von untergeordneter Bedeutung, weshalb die gezielte Gabe und Wirkung der Amidoxim-Prodrugs im Kolon leider keine ausreichende Therapie dieses Modells darstellt. Eine optimale Therapie beinhaltet die Inhibition des JAK/STAT-Signalweges in Immunzellen, jedoch nicht in intestinalen Epithelzellen.

6.5.5 Zusammenfassung der *in vitro* und *in vivo* Daten von Tofacitinib, PF-189 und PF-183

Tabelle 6-1: Tabellarische Darstellung der *in vitro* und *in vivo* Daten der vorliegenden Arbeit

Verbindung	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
<p>Tofacitinib</p> 	<p>Toxikologisch:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ keine Beeinträchtigung der Zellmigration ▪ keine Apoptose <p>JAK/STAT-Signalweg (HT-29):</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Inhibition der IL-6-vermittelten Aktivierung von JAK1, JAK2 und Tyk2 und p-STAT1 und p-STAT3 ▪ Inhibition der IFN-γ-vermittelten Aktivierung von JAK 1 und JAK2 und p-STAT1 ▪ Inhibition der IL-22-vermittelten Aktivierung von JAK 1 und Tyk2 und p-STAT1/p-STAT3 ▪ Inhibition der IL-4-vermittelten Aktivierung von JAK1/JAK3 und p-STAT6 ▪ Selektivität gegen JAK1/JAK3 <p>JAK/STAT-Signalweg (Jurkat, THP-1):</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Inhibition der IL-6-vermittelten Aktivierung von JAK1, JAK2, Tyk2 und p-STAT3 ▪ Inhibition der IL-4-vermittelten Aktivierung von JAK1, JAK3 und p-STAT6 	<p>DSS-Kolitis:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ signifikanter Einbruch der Gewichte ▪ erhöhte mRNA-Level von <i>Il-6</i>, <i>S100a8/S100a9</i> → kein Einfluss auf Immunzellen ▪ keine Verbesserung des histologischen Indexes und der Wundheilung ▪ Induktion der Apoptose

Verbindung	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
	<p>Wundheilung:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Inhibition der STAT3- und STAT6-vermittelten Zellmigration <p>STAT1-induzierte Apoptose:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Inhibition der IFN-γ-vermittelten Apoptose 	
<p>PF-189</p>  <p>The chemical structure of PF-189 consists of a piperidine ring substituted with a methyl group and a 7H-indolizino[1,2-b]pyridine moiety. The piperidine nitrogen is connected via a carbonyl group to a propyl chain, which is further substituted with an amino group and a hydroxylamine group.</p>	<p>Toxikologisch:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ keine Beeinträchtigung der Zellmigration ▪ keine Apoptose <p>JAK/STAT-Signalweg (HT-29):</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Inhibition der IL-6-vermittelten Aktivierung von JAK1, JAK2 und Tyk2 und p-STAT1 und p-STAT3 ▪ Inhibition der IL-22-vermittelten Aktivierung von JAK1 und Tyk2 und p-STAT1 <p>JAK/STAT-Signalweg (Jurkat, THP-1):</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Inhibition der IL-6-vermittelten Aktivierung von JAK1, JAK2, Tyk2 und p-STAT3 ▪ Inhibition der IL-4-vermittelten Aktivierung von JAK1, JAK3 und p-STAT6 <p>Wundheilung:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Inhibition der STAT3-vermittelten Zellmigration 	<p>DSS-Kolitis:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ keine Verschlechterung der DSS-Kolitis ▪ Gewichtsabnahmen entsprechen der unbehandelten Gruppe ▪ Inhibition des JAK/STAT-Signalweges in Immunzellen durch verringerte mRNA-Level von <i>Il-6</i> und <i>S100a8/S100a9</i> ▪ Induktion proliferierender Zellen ▪ keine Induktion der Apoptose

Verbindung	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
	<p>STAT1-induzierte Apoptose:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Inhibition der IFN-γ-vermittelten Apoptose 	
<p>PF-183</p> 	<p>Toxikologisch:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ keine Beeinträchtigung der Zellmigration ▪ keine Apoptose <p>JAK/STAT-Signalweg (HT-29):</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Inhibition der IL-6-vermittelten Aktivierung von JAK1, JAK2 und Tyk2 und p-STAT1 und p-STAT3 ▪ Inhibition der IFN-γ-vermittelten Aktivierung von JAK 1 und JAK2 und p-STAT1 <p>JAK/STAT-Signalweg (HT-29):</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Inhibition der IL-22-vermittelten Aktivierung von JAK 1 und Tyk2 und p-STAT1/ ▪ Inhibition der IL-4-vermittelten Aktivierung von JAK1/JAK3 und p-STAT6 ▪ bessere Selektivität gegen JAK1/JAK3 als Tofacitinib ▪ langandauernde Inhibition über 8 h 	<p>DSS-Kolitis:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ keine Verschlechterung der DSS-Kolitis ▪ Gewichtsabnahmen entsprechen der unbehandelten Gruppe ▪ Induktion proliferierender Zellen ▪ Induktion der Sekretion antimikrobiell wirksamer Peptide <p>DSS-Kolitis:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ keine Induktion der Apoptose

Verbindung	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
	JAK/STAT-Signalweg (Jurkat, THP-1): <ul style="list-style-type: none"> ▪ Inhibition der IL-6-vermittelten Aktivierung von JAK1, JAK2, Tyk2 und p-STAT3, und der IL-4-vermittelten Aktivierung von JAK1, JAK3/ p-STAT6 	

6.6 Ausblick

Obwohl Tofacitinib in einer CU-Studie zur Remission der Symptome führte, konnte die Behandlung in diesem Modell der DSS-induzierten Kolitis keine erfolgsversprechenden Resultate erzielen [174]. Diese Ergebnisse schließen die Wirkung der Amidoxim-Prodrugs *in vivo* nicht aus, da offenbar das falsche Modell gewählt wurde.

Eine mögliche Anwendung der Amidoxim-Prodrugs in der Behandlung von Darmkrebs ist vorstellbar. Ein STAT3-abhängiges Wachstum von Tumoren im Kolon wurde durch Bollrath *et al.* demonstriert [295]. Mäuse mit einer Deletion des STAT3-Gens in den intestinalen Epithelzellen wiesen in einem Kolitis-induzierten Krebsmodell eine geringere Anzahl an Tumoren im Darm auf. In diesem Modell wird die Entwicklung von Krebs im Kolon durch eine Entzündung des intestinalen Epithels induziert. Die Mäuse erhalten hierfür DSS im Trinkwasser und Azoxymethan intraperitoneal, wodurch es zur Entstehung von Tumoren kommt [296]. Dabei konnte bestimmt werden, dass die Bildung der Tumore von der Aktivierung des STAT3-Proteins abhängig ist. Die Amidoxim-Prodrugs reichern sich nach der Bildung des positiv geladenen Amidins in den Zellen an und können dadurch die Phosphorylierung des STAT3 inhibieren. Dabei wäre es vorstellbar, die Wirkstoffe durch die rektale Applikation gezielt in das Kolon zu befördern, wodurch sie eine Therapiemöglichkeit in der Kolitis-induzierten Krebsentwicklung darstellen.

Merciris *et al.* zeigten in ihrer Arbeit eine Verbesserung der klinischen Parameter durch einen selektiven JAK1-Inhibitor in einer chronischen DSS-Kolitis [297]. Möglicherweise

166 Diskussion

stellt die akute DSS-induzierte Kolitis nicht das optimale Modell dar, da auch De Vries *et al.* keine Verbesserung der klinischen Parameter bei der Behandlung mit einem JAK1-Inhibitor erzielen konnte [258].

In einem anderen Modell wurden Mäuse generiert, deren Enterozyten vermehrt IL-15 sezernieren [259]. Dies stellt ein pathologisches Modell der Zöliakie dar. IL-15 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das über die Aktivierung von JAK1 und JAK3 zur Phosphorylierung von STAT5 und damit zum Überleben von CD8+T-Zellen. Es spielt somit eine Rolle bei der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen, wie der Zöliakie [298]. In diesem Modell führte die Behandlung mit Tofacitinib, und somit eine Inhibition des JAK1/JAK3-STAT5-Signalweges, zu einer Verbesserung des Krankheitsbildes der Zöliakie. Aufgrund der hohen Selektivität von PF-183 gegenüber JAK3 könnte es für die Therapie der Zöliakie besonders geeignet sein.

Eine topische Anwendung der Amidoxim-Prodrugs könnte ebenfalls in der Psoriasis-Behandlung vielversprechend sein. Psoriasis ist eine chronische Entzündung der Haut, hervorgerufen durch die übermäßige Infiltration von T-Zellen und vermehrte Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen [299]. Die Zytokine, die eine Rolle in der Erkrankung spielen, aktivieren vor allem JAK1 und JAK3. Tofacitinib zeigte in einer Studie mit Psoriasis Patienten bereits eine erfolgreiche Remission der Symptome [300]. Ein anderer JAK3-Inhibitor wurde in Mäusen getestet, die eine Defizienz des Proteins CD18, auch Integrin- β -2 genannt, aufwiesen [301]. Menschen ohne dieses Protein leiden am sogenannten Leukozytenadhäsionsdefekt, wodurch es verstärkt zu Infektionen kommt [302]. In dem Modell der CD18-defizienten Mäuse entwickeln diese eine Entzündung der Haut. Nach oraler Gabe des JAK3-Inhibitors konnte eine Verminderung der Entzündung beobachtet werden. Somit könnte PF-183 nach topischer Applikation ebenfalls eine Verbesserung der Entzündung hervorrufen.

Die Inhibition des JAK/STAT-Signalweges führte zu einer Stimulation der Proliferation von Stammzellen in Haarfollikeln. Tofacitinib zeigte zusammen mit Ruxolitinib erfolgsversprechende Ergebnisse in einer Mausstudie [303]. Eine topische Gabe von Tofacitinib könnte höchstwahrscheinlich zu systemischen Nebenwirkungen führen, weshalb eine topische Applikation der Amidoxim-Prodrugs eine gezielte Wirkung am Ort garantiert.

7 Zusammenfassung

Zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) zählen unter anderem die beiden häufigsten Formen, Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (UC). Die Ursachen dieser entzündlichen Erkrankungen sind noch nicht vollständig geklärt, jedoch spielen neben Umwelteinflüssen auch genetische Faktoren eine wichtige Rolle. Genomweite Assoziationsstudien konnten *JAK2* und *STAT3* als Risikoloci identifizieren. Durch das Zusammenspiel dieser Faktoren kommt es zur Zerstörung der intestinalen Epithelschicht, wodurch Bakterien eindringen können und das Immunsystem aktivieren. Diese Aktivierung erfolgt unter anderem durch Zytokine, die durch den JAK/STAT-Signalweg eine Entzündung hervorrufen können.

Die Beteiligung der JAK-Proteine wurde nicht nur in CED, sondern auch in weiteren Entzündungserkrankungen, wie rheumatoider Arthritis oder Psoriasis festgestellt. Zur Familie der JAK-Proteine zählen JAK1, JAK2, JAK3 und Tyk2. Die Rolle der ubiquitär vorhandenen Proteine JAK1, JAK2 und Tyk2 in CED wurde bereits charakterisiert. Dagegen ist JAK3 hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert und somit ein mögliches Ziel für die Therapie entzündlicher Erkrankungen. Trotzdem wurde seine Rolle in CED bisher nicht hinreichend geklärt. Daher stellt die JAK-Inhibition für CED eine attraktive Therapiemöglichkeit dar.

Tofacitinib wurde 2012 als einer der ersten oral verfügbaren JAK-Inhibitoren zur Therapie der rheumatoiden Arthritis in den USA zugelassen. Eine Zulassung in Europa wurde aufgrund der schweren Nebenwirkungen nach Behandlung mit Tofacitinib abgelehnt.

Es sollte die Frage geklärt werden, ob es zu einer Cyanidabspaltung nach der Metabolisierung von Tofacitinib in der Leber kommt und ob es einen Zusammenhang zwischen der gebildeten Menge an Cyanid und den auftretenden Nebenwirkungen gibt. Da die Strukturformel von Tofacitinib eine Nitril-Gruppe mit einem α -Wasserstoffatom aufweist, ist eine Abspaltung von Cyanid möglich. Die verantwortlichen Enzyme waren CYP3A4, CYP2D6 und CYP2C9. Abschließend wurde durch den Austausch des α -Wasserstoffs gegen einen Cyclopropylrest der Mechanismus der Abspaltung vollständig geklärt. Die detektierte Menge an Cyanid nach Inkubationen mit humanen oder porcinen Lebermikrosomen war nicht

168 Zusammenfassung

ausreichend hoch, um einen Zusammenhang zwischen den Nebenwirkungen und der Abspaltung des Cyanids festzustellen. Die Nebenwirkungen von Tofacitinib entstehen vermutlich durch eine Inhibition des JAK/STAT-Signalweges in allen Zellen. Durch eine gezielte rektale Applikation und durch die Anwendung des Amidoxim-Prodrug-Prinzips sollte die systemische Verteilung von Tofacitinib verhindert werden. Hierfür wurden die Amidoxim-Prodrugs PF-189 und PF-183 synthetisiert. Mit diesem Prinzip sollte der Wirkstoff aufgrund seiner hohen Lipophilie in die Zelle diffundieren, wo es durch das mARC-Enzymsystem zu einem Amidin reduziert wird und aufgrund der positiven Ladung nicht mehr aus der Zelle diffundieren kann. Dieses Prinzip konnte sowohl auf die intestinalen Epithelzellen als auch auf Immunzellen innerhalb der *Lamina propria* übertragen werden. Im Gegensatz zu PF-189 weist PF-183 nach der Umsetzung zu einem Amidin eine höhere Selektivität gegen JAK3 auf.

Diese neuen Amidoxim-Prodrugs wurden zuerst *in vitro* in einem intestinalen Karzinomzellsystem charakterisiert. In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal der Einfluss der Inhibition des JAK/STAT-Signalweges in intestinalen Epithelzellen durch Tofacitinib nachgewiesen. Die Amidoxim-Prodrugs zeigten im Vergleich zur Referenzsubstanz Tofacitinib eine ausreichende inhibitorische Kapazität der JAK-Proteine und eine geringe Toxizität bei den physiologisch relevanten Konzentrationen. Auch zeigte PF-183 eine höhere Selektivität als PF-189 gegenüber JAK3 und eine länger andauernde Inhibition aller vier JAK-Proteine im Vergleich zu Tofacitinib und PF-189.

In der vorliegenden Studie wurde die *in vitro* Inhibition des JAK/STAT-Signalweges und der Einfluss von Tofacitinib und zwei Amidoxim-Prodrugs auf die STAT3- und STAT6-vermittelte Wundheilung getestet. Nur PF-183 zeigte weder eine STAT3- noch eine STAT6-Inhibition und sollte sich für die Behandlung eignen. Allerdings zeigte die Referenzsubstanz Tofacitinib gegenüber der IFN- γ -induzierten Apoptose einen höheren protektiven Effekt.

Die Amidoxim-Prodrugs wurden in einem DSS-Kolitis-Modell in der Maus auf ihre Wirkung getestet. Weder Tofacitinib noch, PF-189 und PF-183 zeigten im Vergleich zur DPBS-Gabe einen protektiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf. Nur PF-189 konnte mRNA-Expression von *IL-6*, *S100a8* und *S100a9* inhibieren.

Zusätzlich wurde die Funktion des Amidoxim-Prodrug-Prinzips *in vivo* bewiesen. Tofacitinib verteilte sich nach rektaler Gabe in Nieren, Leber und Kolon, während die beiden Amidoxim-Prodrugs weder in Leber noch in Niere detektiert wurden. Im Kolon konnte die enzymatische Katalyse der Amidoxime zum Amidin nachgewiesen werden.

Zusammenfassend wurde die Funktionsweise des Amidoxim-Prodrug-Prinzips bei PF-189 und PF-183 bewiesen. Allerdings zeigten weder Tofacitinib, noch die beiden neuen Substanzen eine protektive Wirkung auf eine akute induzierte DSS-Kolitis in der Maus nach rektaler Applikation.

Trotz der fehlenden protektiven Wirkung in dem getesteten System könnten Amidoxim-Prodrugs Therapiemöglichkeiten bei anderen Erkrankungen, wie Darmkrebs, darstellen.

8 Summary

Inflammatory bowel disease (IBD) includes the two common forms Crohn's disease (CD) and Ulcerative colitis (UC). The mechanisms of these inflammatory diseases are not yet fully understood. Besides environmental factors, genetics play an important role in the pathogenesis of IBD. Genom-wide association studies identified JAK2 and STAT3 as genetic risk loci for IBD. Furthermore, the intestinal homeostasis depends on the interaction between the function of the intestinal barrier, the intestinal microbiota and a regulated immune response. The disruption of the intestinal barrier causes a high invasion of the bacteria into the *Lamina propria*, which leads to an increased inflammatory response due to the activation of JAK/STAT-signaling by cytokines.

The role of JAK proteins has been recognized in IBD and other inflammatory diseases like rheumatoid arthritis or psoriasis. The JAK family consists of four members JAK1, JAK2, JAK3 and Tyk2. JAK1, JAK2 and Tyk2 are ubiquitously expressed proteins, whose function in IBD is already known. JAK3 is mainly expressed in hematopoietic cells, which offers a target for the treatment of inflammatory diseases. Nevertheless, the role of JAK3 proteins in IBD is not yet determined.

Tofacitinib was approved in 2012 in the US as the first orally available JAK-inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis. The approval in the EU was refused because of the severe side effects of Tofacitinib.

Due to the molecular structure of Tofacitinib, the dissociation of cyanide after biotransformation in the liver is possible, which could lead to these side effects. First of all, the mechanism of the formation should be identified and if the amount of cyanide is sufficient for the appearance of the symptoms. The responsible enzymes were CYP3A4, CYP2D6 and CYP2C9. Finally, the complete mechanism could be identified by exchanging the α -hydrogen atom for a cyclopropyl group. After incubation of Tofacitinib with human or porcine liver microsomes, the amount of cyanide was not high enough to cause the severe side effects. Probably, the cause of the side effects is the distribution of the drug and inhibition of the JAK/STAT-signaling in every cell. Targeted rectal application and the use of the amidoxime prodrug concept prevent the systemic distribution of drugs. Therefore, the amidoxime prodrugs PF-189 and PF-183 were synthesized. By using this concept, the lipophilic prodrug will diffuse into the cells

and be reduced by the mitochondrial amidoxime reducing component to an amidine, which is not able to pass the cell membrane due to the positive charge. This concept is applicable in both IECs and immune cells of the *lamina propria*. Due to the amidine group, the amidine of PF-183 has a higher selectivity against JAK3.

First of all, the new amidoxime prodrugs had to be characterized *in vitro* in a colon carcinoma cell line, where compared with Tofacitinib a sufficient inhibitor capacity for PF-189 and PF-183 and a slight toxicity could be detected. In addition, a higher selectivity of PF-183 against JAK3 and a prolonged inhibition of all four JAK proteins by PF-183 was demonstrated.

The present work investigated the role of the inhibition of the STAT3- and STAT6- induced wound healing by Tofacitinib, PF-189 and PF-183 for the first time. Only PF-183 had no influence on the migration of cells *in vitro*, therefore it might be the most promising compound for the therapy of DSS-induced colitis. However, the reference compound Tofacitinib was more efficient in inhibiting the apoptosis induced by IFN- γ .

In this investigation, amidoxime prodrugs were used for the treatment of an acute DSS-induced colitis in mice. Unfortunately, neither Tofacitinib nor amidoxime prodrugs showed a striking effect on the reconstitution of the intestinal epithelia cells when compared with the untreated mice, but in PF-189 treated mice a decreased expression of mRNA levels of *Il-6*, *S100a8* and *S100a9* could be detected.

Additionally, the concept of the amidoxime prodrugs could be proved *in vivo*. After rectal application, Tofacitinib could be determined in liver and kidney while the amidoxime prodrugs only distributed in the colon and were reduced to amidines by the mitochondrial amidoxime reducing component.

In summary, the concept of amidoxime prodrugs was successfully applied and showed a reliable inhibition of the JAK/STAT-signaling pathway *in vitro*, though the new compound could not prevent the development and progression of the DSS-induced colitis *in vivo*.

Despite these results, the prodrugs may present a possibility for the treatment of other diseases like colon cancer.

9 Literaturverzeichnis

1. Loftus C.G., Loftus E.V., Harmsen W.S., Zinsmeister A.R., Tremaine W.J., Melton L.J. and Sandborn W.J., *Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940–2000*. Inflammatory Bowel Diseases, 2007. **13**(3): p. 254-261.
2. Molodecky N.A., Soon S., Rabi D.M., Ghali W.A., Ferris M., Chernoff G., Benchimol E.I., Panaccione R., Ghosh S. and Barkema H.W., *Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review*. Gastroenterology, 2012. **142**(1): p. 46-54. e42.
3. Stonnington C.M., Phillips S., Melton L.R. and Zinsmeister A.R., *Chronic ulcerative colitis: incidence and prevalence in a community*. Gut, 1987. **28**(4): p. 402-409.
4. Brant S.R. and Nguyen G.C., *Is there a gender difference in the prevalence of Crohn's disease or ulcerative colitis?* Inflammatory Bowel Diseases, 2008. **14**: p. S2-S3.
5. Ott C., Obermeier F., Thielers S., Kemptner D., Bauer A., Schölmerich J., Rogler G. and Timmer A., *The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany: a prospective population-based study*. European Journal of Gastroenterology & Hepatology, 2008. **20**(9): p. 917-923.
6. Hanauer S.B., Sandborn W. and Gastroenterology P.P.C.o.t.A.C.o., *Management of Crohn's disease in adults*. The American Journal of Gastroenterology, 2001. **96**(3): p. 635-643.
7. Wilkins T., Jarvis K. and Patel J., *Diagnosis and management of Crohn's disease*. American family physician, 2011. **84**(12): p. 1365-1375.
8. Andersen N.N. and Jess T., *Has the risk of colorectal cancer in inflammatory bowel disease decreased*. World Journal of Gastroenterology, 2013. **19**(43): p. 7561-8.
9. Bouma G. and Strober W., *The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease*. Nature Reviews Immunology, 2003. **3**(7): p. 521-533.
10. Cho J.H., *The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease*. Nature Reviews Immunology, 2008. **8**(6): p. 458-466.
11. Xavier R. and Podolsky D., *Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 427-434.
12. Sartor R.B., *Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis*. Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology, 2006. **3**(7): p. 390-407.
13. Somerville K.W., Logan R., Edmond M. and Langman M., *Smoking and Crohn's disease*. British Medical Journal (Clinical Research Ed.), 1984. **289**(6450): p. 954-956.
14. Harries A., Baird A. and Rhodes J., *Non-smoking: a feature of ulcerative colitis*. British Medical Journal (Clinical Research Ed.), 1982. **284**(6317): p. 706-706.
15. Barreiro-de Acosta M., Castro A.A., Souto R., Iglesias M., Lorenzo A. and Dominguez-Muñoz J., *Emigration to western industrialized countries: A risk factor for developing inflammatory bowel disease*. Journal of Crohn's and Colitis, 2011. **5**(6): p. 566-569.
16. Desai H. and Gupte P., *Increasing incidence of Crohn's disease in India: is it related to improved sanitation?* Indian journal of gastroenterology: official journal of the Indian Society of Gastroenterology, 2004. **24**(1): p. 23-24.
17. Hou J.K., Abraham B. and El-Serag H., *Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature*. The American Journal of Gastroenterology, 2011. **106**(4): p. 563-573.
18. Hampe J., Heymann K., Krawczak M. and Schreiber S., *Association of inflammatory bowel disease with indicators for childhood antigen and infection exposure*. International Journal of Colorectal Disease, 2003. **18**(5): p. 413-417.

19. Jostins L., Ripke S., Weersma R.K., Duerr R.H., McGovern D.P., Hui K.Y., Lee J.C., Schumm L.P., Sharma Y. and Anderson C.A., *Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease*. Nature, 2012. **491**(7422): p. 119-124.
20. Hugot J.-P., Laurent-Puig P., Gower-Rousseau C., Olson J.M., Lee J.C., Beaugerie L., Naom I., Dupas J.-L., Van Gossum A. and Orholm M., *Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16*. 1996. **379**: p. 821-823.
21. Hugot J.-P., Chamaillard M., Zouali H., Lesage S., Cézard J.-P., Belaiche J., Almer S., Tysk C., O'Morain C.A. and Gassull M., *Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease*. Nature, 2001. **411**(6837): p. 599-603.
22. Girardin S.E., Boneca I.G., Viala J., Chamaillard M., Labigne A., Thomas G., Philpott D.J. and Sansonetti P.J., *Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(11): p. 8869-8872.
23. Anderson C.A., Massey D.C., Barrett J.C., Prescott N.J., Tremelling M., Fisher S.A., Gwilliam R., Jacob J., Nimmo E.R. and Drummond H., *Investigation of Crohn's disease risk loci in ulcerative colitis further defines their molecular relationship*. Gastroenterology, 2009. **136**(2): p. 523-529. e3.
24. Franke A., Balschun T., Karlsen T.H., Hedderich J., May S., Lu T., Schuldt D., Nikolaus S., Rosenstiel P. and Krawczak M., *Replication of signals from recent studies of Crohn's disease identifies previously unknown disease loci for ulcerative colitis*. Nature Genetics, 2008. **40**(6): p. 713-715.
25. Schmidt R. F. L.F., *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. Vol. 30. 2007, Heidelberg: Springer, 860-863.
26. Vaupel P. S.H.-G., Mutschler E., *Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Menschen*. Vol. 6. 2007: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 397-401.
27. Maddaus M.A., Wells C.L., Platt J.L., Condie R.M. and Simmons R.L., *Effect of T cell modulation on the translocation of bacteria from the gut and mesenteric lymph node*. Annals of Surgery, 1988. **207**(4): p. 387.
28. Kim Y.S. and Ho S.B., *Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress*. Current Gastroenterology Reports, 2010. **12**(5): p. 319-330.
29. Borriello S., *Microbial flora of the gastrointestinal tract*. Microbial Metabolism in the Digestive Tract, 1986: p. 2-16.
30. Tancrede C., *Role of human microflora in health and disease*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 1992. **11**(11): p. 1012-1015.
31. Salminen S., Bouley C., Boutron M.-C., Cummings J., Franck A., Gibson G., Isolauri E., Moreau M.-C., Roberfroid M. and Rowland I., *Functional food science and gastrointestinal physiology and function*. British Journal of Nutrition, 1998. **80**(S1): p. S147-S171.
32. Cummings J., Pomare E., Branch W., Naylor C. and Macfarlane G., *Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood*. Gut, 1987. **28**(10): p. 1221-1227.
33. Smith E.A. and Macfarlane G.T., *Enumeration of human colonic bacteria producing phenolic and indolic compounds: effects of pH, carbohydrate availability and retention time on dissimilatory aromatic amino acid metabolism*. Journal of Applied Bacteriology, 1996. **81**(3): p. 288-302.
34. Cummings J.H. and Englyst H.N., *Fermentation in the human large intestine and the available substrates*¹/₂. fuel, 1987. **9**: p. 11.
35. Taguchi H., Takahashi M., Yamaguchi H., Osaki T., Komatsu A., Fujioka Y. and Kamiya S., *Experimental infection of germ-free mice with hyper-toxigenic enterohaemorrhagic Escherichia coli O157: H7, strain 6*. Journal of Medical Microbiology, 2002. **51**(4): p. 336-343.
36. Peterson L.W. and Artis D., *Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis*. Nature Reviews Immunology, 2014. **14**(3): p. 141-153.

174 Literaturverzeichnis

37. Ovesen L., Bendtsen F., Tage-Jensen U., Pedersen N., Gram B. and Rune S., *Intraluminal pH in the stomach, duodenum, and proximal jejunum in normal subjects and patients with exocrine pancreatic insufficiency*. *Gastroenterology*, 1986. **90**(4): p. 958-962.
38. Zasloff M., *Antibiotic peptides as mediators of innate immunity*. *Current Opinion in Immunology*, 1992. **4**(1): p. 3-7.
39. Zasloff M., *Antimicrobial peptides of multicellular organisms*. *Nature*, 2002. **415**(6870): p. 389-395.
40. Fleming A. and Allison V., *Observations on a bacteriolytic substance ("lysozyme") found in secretions and tissues*. *British Journal of Experimental Pathology*, 1922. **3**(5): p. 252.
41. Hase K., Eckmann L., Leopard J.D., Varki N. and Kagnoff M.F., *Cell differentiation is a key determinant of cathelicidin LL-37/human cationic antimicrobial protein 18 expression by human colon epithelium*. *Infection and Immunity*, 2002. **70**(2): p. 953-063.
42. Larrick J.W., Hirata M., Balint R.F., Lee J., Zhong J. and Wright S.C., *Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein*. *Infection and Immunity*, 1995. **63**(4): p. 1291-1297.
43. Agerberth B., Charo J., Werr J., Olsson B., Idali F., Lindbom L., Kiessling R., Jörnvall H., Wigzell H. and Gudmundsson G.H., *The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and α -defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations*. *Blood*, 2000. **96**(9): p. 3086-3093.
44. Yang D., Chen Q., Schmidt A.P., Anderson G.M., Wang J.M., Wooters J., Oppenheim J.J. and Chertov O., *LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells*. *The Journal of Experimental Medicine*, 2000. **192**(7): p. 1069-1074.
45. Kawai T. and Akira S., *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. *Nature Immunology*, 2010. **11**(5): p. 373-384.
46. Palm N.W. and Medzhitov R., *Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity*. *Immunological Reviews*, 2009. **227**(1): p. 221-233.
47. Wolf J.L. and Bye W.A., *The membranous epithelial (M) cell and the mucosal immune system*. *Annual Review of Medicine*, 1984. **35**(1): p. 95-112.
48. Peterson L.W. and Artis D., *Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis*. *Nature Reviews Immunology*, 2014. **14**(3): p. 141-53.
49. Rogler G. and Andus T., *Cytokines in inflammatory bowel disease*. *World Journal of Surgery*, 1998. **22**(4): p. 382-389.
50. Parronchi P., Romagnani P., Annunziato F., Sampognaro S., Becchio A., Giannarini L., Maggi E., Pupilli C., Tonelli F. and Romagnani S., *Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease*. *The American Journal of Pathology*, 1997. **150**(3): p. 823.
51. Heller F., Florian P., Bojarski C., Richter J., Christ M., Hillenbrand B., Mankertz J., Gitter A.H., Bürgel N. and Fromm M., *Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution*. *Gastroenterology*, 2005. **129**(2): p. 550-564.
52. Kullberg M.C., Jankovic D., Feng C.G., Hue S., Gorelick P.L., McKenzie B.S., Cua D.J., Powrie F., Cheever A.W. and Maloy K.J., *IL-23 plays a key role in Helicobacter hepaticus-induced T cell-dependent colitis*. *The Journal of Experimental Medicine*, 2006. **203**(11): p. 2485-2494.
53. Brand S., *Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease*. *Gut*, 2009. **58**(8): p. 1152-1167.
54. Murphy K. T.P., Walport M., *Janeway Immunologie*. Vol. 7. 2009, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 408.

55. Neurath M.F., *Cytokines in inflammatory bowel disease*. Nature Reviews Immunology, 2014. **14**(5): p. 329-342.
56. Neurath M.F., *Cytokines in inflammatory bowel disease*. Nature Reviews Immunology, 2014. **14**(5): p. 329-342.
57. Mutschler E. G.G., Menzel S., Ruth P., Schmitdtko A., *Pharmakologie kompakt*: Vol. 1. 2016: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. 373.
58. Stange E., Riemann J., Von Herbay A., Lochs H., Fleig W., Schölmerich J., Kruis W., Porschen R., Bruch H.-P. and Zeitz M., *Diagnostik und Therapie der Colitis ulcerosa-Ergebnisse einer evidenzbasierten Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten*. Zeitschrift für Gastroenterologie, 2001. **39**(01): p. 19-20.
59. Su C.G., Wen X., Bailey S.T., Jiang W., Rangwala S.M., Keilbaugh S.A., Flanigan A., Murthy S., Lazar M.A. and Wu G.D., *A novel therapy for colitis utilizing PPAR- γ ligands to inhibit the epithelial inflammatory response*. Journal of Clinical Investigation, 1999. **104**(4): p. 383-389.
60. Rousseaux C., Lefebvre B., Dubuquoy L., Lefebvre P., Romano O., Auwerx J., Metzger D., Wahli W., Desvergne B. and Naccari G.C., *Intestinal antiinflammatory effect of 5-aminosalicylic acid is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor- γ* . The Journal of Experimental Medicine, 2005. **201**(8): p. 1205-1215.
61. Egan L.J., Mays D.C., Huntoon C.J., Bell M.P., Pike M.G., Sandborn W.J., Lipsky J.J. and McKean D.J., *Inhibition of interleukin-1-stimulated NF- κ B RelA/p65 phosphorylation by mesalamine is accompanied by decreased transcriptional activity*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(37): p. 26448-26453.
62. Nielsen O., Bukhave K., Elmgreen J. and Ahnfelt-Rønne I., *Inhibition of 5-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism in human neutrophils by sulfasalazine and 5-aminosalicylic acid*. Digestive Diseases and Sciences, 1987. **32**(6): p. 577-582.
63. Mutschler E. G.G., Kroemer H.K., Menzel S., Ruth P., *Mutschler Arzneimittelwirkungen*. Vol. 10. 2013, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 882.
64. Rhen T. and Cidlowski J.A., *Antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs*. New England Journal of Medicine, 2005. **353**(16): p. 1711-1723.
65. Preiß J., Bokemeyer B., Buhr H., Dignass A., Häuser W., Hartmann F., Herrlinger K., Kaltz B., Kienle P. and Kruis W., *Updated German clinical practice guideline on "Diagnosis and treatment of Crohn's disease" 2014*. Zeitschrift für Gastroenterologie, 2014. **52**(12): p. 1431.
66. Maltzman J.S. and Koretzky G.A., *Azathioprine: old drug, new actions*. The Journal of Clinical Investigation, 2003. **111**(8): p. 1122-1124.
67. Cronstein B.N., *The mechanism of action of methotrexate*. Rheumatic Disease Clinics of North America, 1997. **23**(4): p. 739-755.
68. Schreiber S.L. and Crabtree G.R., *The mechanism of action of cyclosporin A and FK506*. Immunology Today, 1992. **13**(4): p. 136-142.
69. Kelly P.A., Burckart G.J. and Venkataramanan R., *Tacrolimus: a new immunosuppressive agent*. American journal of health-system pharmacy, 1995. **52**(14): p. 1521-1535.
70. Podolsky D.K., *The current future understanding of inflammatory bowel disease*. Best practice & research Clinical gastroenterology, 2002. **16**(6): p. 933-943.
71. Sands B.E. and Kaplan G.G., *The role of TNF α in ulcerative colitis*. The Journal of Clinical Pharmacology, 2007. **47**(8): p. 930-941.
72. Eigler A., Sinha B., Hartmann G. and Endres S., *Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine*. Immunology Today, 1997. **18**(10): p. 487-492.
73. Antoni C. and Braun J., *Side effects of anti-TNF therapy: current knowledge*. Clinical and Experimental Rheumatology, 2002. **20**(6; SUPP/28): p. S-152.
74. Alberts B. B.D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., *Molekularbiologie der Zelle*. Vol. 4. 2012, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & co. KG, 1239-1240.

176 Literaturverzeichnis

75. Singh H., Grewal N., Arora E., Kumar H. and Kakkar A.K., *Vedolizumab: A novel anti-integrin drug for treatment of inflammatory bowel disease*. Journal of Natural Science, Biology, and Medicine, 2016. **7**(1): p. 4.
76. Dignass A., Van Assche G., Lindsay J., Lémann M., Söderholm J., Colombel J., Danese S., D'Hoore A., Gassull M. and Gomollón F., *The second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management*. Journal of Crohn's and Colitis, 2010. **4**(1): p. 28-62.
77. Stark G.R. and Darnell J.E., *The JAK-STAT pathway at twenty*. Immunity, 2012. **36**(4): p. 503-514.
78. Wilks A., Harpur A., Kurban R., Ralph S., Zürcher G. and Ziemiecki A., *Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase*. Molecular and Cellular Biology, 1991. **11**(4): p. 2057-2065.
79. Firmbach-Kraft I., Byers M., Shows T., Dalla-Favera R. and Krolewski J., *tyk2, prototype of a novel class of non-receptor tyrosine kinase genes*. Oncogene, 1990. **5**(9): p. 1329-1336.
80. Shuai K. and Liu B., *Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system*. Nature Reviews Immunology, 2003. **3**(11): p. 900-911.
81. Liongue C., O'Sullivan L.A., Trengove M.C. and Ward A.C., *Evolution of JAK-STAT pathway components: mechanisms and role in immune system development*. PLoS ONE, 2012. **7**(3): p. e32777.
82. Pellegrini S. and Dusanter-Fourt I., *The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs)*. European Journal of Biochemistry, 1997. **248**(3): p. 615-633.
83. Yamaoka K., Saharinen P., Pesu M., Holt 3rd V., Silvennoinen O. and O'Shea J.J., *The janus kinases (Jaks)*. Genome Biology, 2004. **5**(12): p. 253.
84. Kawamura M., McVicar D.W., Johnston J.A., Blake T.B., Chen Y.-Q., Lal B.K., Lloyd A.R., Kelvin D.J., Staples J.E. and Ortaldo J.R., *Molecular cloning of L-JAK, a Janus family protein-tyrosine kinase expressed in natural killer cells and activated leukocytes*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994. **91**(14): p. 6374-6378.
85. Johnston J.A., Kawamura M., Kirken R.A., Chen Y.-Q., Blake T.B., Shibuya K., Ortaldo J.R., McVicar D.W. and O'Shea J.J., *Phosphorylation and activation of the Jak-3 Janus kinase in response to interleukin-2*. Nature, 1994. **370**(6485): p. 151-153.
86. Haan C., Is' harc H., Hermanns H.M., Schmitz-Van de Leur H., Kerr I.M., Heinrich P.C., Grötzinger J. and Behrmann I., *Mapping of a region within the N terminus of Jak1 involved in cytokine receptor interaction*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(40): p. 37451-37458.
87. Zhao Y., Wagner F., Frank S.J. and Kraft A.S., *The amino-terminal portion of the Jak2 protein kinase is necessary for binding and phosphorylation of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor β chain*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(23): p. 13814-13818.
88. Luo H., Rose P., Barber D., Hanratty W.P., Lee S., Roberts T.M., D'Andrea A.D. and Dearolf C.R., *Mutation in the Jak kinase JH2 domain hyperactivates Drosophila and mammalian Jak-Stat pathways*. Molecular and Cellular Biology, 1997. **17**(3): p. 1562-1571.
89. Saharinen P. and Silvennoinen O., *The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of Jak2 and Jak3 tyrosine kinases and for cytokine-inducible activation of signal transduction*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(49): p. 47954-47963.
90. Clark J.D., Flanagan M.E. and Telliez J.-B., *Discovery and Development of Janus Kinase (JAK) Inhibitors for Inflammatory Diseases: Miniperspective*. Journal of Medicinal Chemistry, 2014. **57**(12): p. 5023-5038.
91. Ross J.A., Rodriguez G. and Kirken R.A., *Analysis of Janus Tyrosine Kinase Phosphorylation and Activation*. Methods in Molecular Biology, 2013. **967**: p. 3-20.

92. Greenlund A.C., Morales M.O., Viviano B.L., Yan H., Krolewski J. and Schreiber R.D., *Stat recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process*. *Immunity*, 1995. **2**(6): p. 677-687.
93. Heim M.H., *The Jak-STAT pathway: cytokine signalling from the receptor to the nucleus*. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 1999. **19**(1-4): p. 75-120.
94. Schindler C., Shuai K., Prezioso V.R. and Darnell J.E., *Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor*. *Science*, 1992. **257**(5071): p. 809-813.
95. Akira S., *Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice*. *Stem Cells*, 1999. **17**(3): p. 138-146.
96. Chen X., Vinkemeier U., Zhao Y., Jeruzalmi D., Darnell J.E. and Kuriyan J., *Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA*. *Cell*, 1998. **93**(5): p. 827-839.
97. Horvath C.M., Wen Z. and Darnell J., *A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain*. *Genes & Development*, 1995. **9**(8): p. 984-994.
98. Zhong Z., Wen Z. and Darnell J., *Stat3 and Stat4: members of the family of signal transducers and activators of transcription*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994. **91**(11): p. 4806-4810.
99. Kisseleva T., Bhattacharya S., Braunstein J. and Schindler C., *Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges*. *Gene*, 2002. **285**(1): p. 1-24.
100. Levy D.E. and Darnell Jr J., *Stats: transcriptional control and biological impact*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2002. **3**(9): p. 651.
101. Rodig S.J., Meraz M.A., White J.M., Lampe P.A., Riley J.K., Arthur C.D., King K.L., Sheehan K.C., Yin L. and Pennica D., *Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses*. *Cell*, 1998. **93**(3): p. 373-383.
102. Gaffen S.L., LAi S.Y., Xu W., Gouilleux F., Groner B., Goldsmith M.A. and Greene W.C., *Signaling through the interleukin 2 receptor beta chain activates a STAT-5-like DNA-binding activity*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995. **92**(16): p. 7192-7196.
103. Roy B., Bhattacharjee A., Xu B., Ford D., Maizel A.L. and Cathcart M.K., *IL-13 signal transduction in human monocytes: phosphorylation of receptor components, association with Jaks, and phosphorylation/activation of Stats*. *Journal of Leukocyte Biology*, 2002. **72**(3): p. 580-589.
104. Parrish-Novak J., Dillon S.R., Nelson A., Hammond A., Sprecher C., Gross J.A., Johnston J., Madden K., Xu W. and West J., *Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function*. *Nature*, 2000. **408**(6808): p. 57-63.
105. Kondo M., Takeshita T., Higuchi M., Nakamura M., Sudo T., Nishikawa S.-L. and Sugamura K., *Functional participation of the IL-2 receptor gamma chain in IL-7 receptor complexes*. *Science*, 1994. **263**(5152): p. 1453-1454.
106. Carson W.E., Giri J.G., Lindemann M., Linett M.L., Ahdieh M., Paxton R., Anderson D., Eisenmann J., Grabstein K. and Caligiuri M.A., *Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor*. *Journal of Experimental Medicine*, 1994. **180**(4): p. 1395-1403.
107. Heinrich P.C., Behrmann I., Müller-Newen G., Schaper F. and Graeve L., *Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway*. *Biochemical Journal*, 1998. **334**(2): p. 297-314.
108. Hirano T., Akira S., Taga T. and Kishimoto T., *Biological and clinical aspects of interleukin 6*. *Immunology Today*, 1990. **11**: p. 443-449.
109. Houssiau F.A., Devogelaer J.P., Damme J.V., Deuxchaisnes C.N.D. and Snick J.V., *Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides*. *Arthritis & Rheumatism*, 1988. **31**(6): p. 784-788.

178 Literaturverzeichnis

110. Atreya R., Mudter J., Finotto S., Müllberg J., Jostock T., Wirtz S., Schütz M., Bartsch B., Holtmann M. and Becker C., *Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo*. Nature Medicine, 2000. **6**(5): p. 583-588.
111. Goumas F.A., Holmer R., Egberts J.H., Gontarewicz A., Heneweer C., Geisen U., Hauser C., Mende M.M., Legler K. and Röcken C., *Inhibition of IL-6 signaling significantly reduces primary tumor growth and recurrences in orthotopic xenograft models of pancreatic cancer*. International Journal of Cancer, 2015. **137**(5): p. 1035-1046.
112. Sexl V., Kovacic B., Piekorz R., Moriggl R., Stoiber D., Hoffmeyer A., Liebming R., Kudlacek O., Weisz E. and Rothhammer K., *Jak1 deficiency leads to enhanced Abelson-induced B-cell tumor formation*. BLOOD-NEW YORK-, 2003. **101**(12): p. 4937-4943.
113. Pfeffer L.M., Dinarello C.A., Herberman R.B., Williams B.R., Borden E.C., Borden R., Walter M.R., Nagabhushan T.L., Trotta P.P. and Pestka S., *Biological properties of recombinant α -interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons*. Cancer Research, 1998. **58**(12): p. 2489-2499.
114. Liu Y.-J., *IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors*. Annu. Rev. Immunol., 2005. **23**: p. 275-306.
115. Boehm U., Klamp T., Groot M. and Howard J., *Cellular responses to interferon- γ* . Annual Review of Immunology, 1997. **15**(1): p. 749-795.
116. Bromberg J.F., Horvath C.M., Wen Z., Schreiber R.D. and Darnell J.E., *Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(15): p. 7673-7678.
117. Metz D.H., *The Mechanism of Action of Interferon*. Review. Cell, 1975. **6**(4): p. 429-439.
118. Neubauer H., Cumano A., Müller M., Wu H., Huffstadt U. and Pfeffer K., *Jak2 deficiency defines an Essential Developmental checkpoint in Definitive Hematopoiesis*. Cell, 1998. **93**(3): p. 397-409.
119. Parganas E., Wang D., Stravopodis D., Topham D.J., Marine J.-C., Teglund S., Vanin E.F., Bodner S., Colamonici O.R. and Van Deursen J.M., *Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors*. Cell, 1998. **93**(3): p. 385-395.
120. Watling D., Guschin D., Müller M., Silvennoinen O., Witthuhn B.A., Quelle F.W., Rogers N.C., Schindler C., Stark G.R. and Ihle J.N., *Complementation by the protein tyrosine kinase JAK2 of a mutant cell line defective in the interferon- α and γ ; signal transduction pathway*. Nature, 1993. **366**: p. 166-170.
121. Levine R.L., Wadleigh M., Cools J., Ebert B.L., Wernig G., Huntly B.J., Boggon T.J., Wlodarska I., Clark J.J. and Moore S., *Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis*. Cancer cell, 2005. **7**(4): p. 387-397.
122. Zhao R., Xing S., Li Z., Fu X., Li Q., Krantz S.B. and Zhao Z.J., *Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(24): p. 22788-22792.
123. Park S.Y., Saijo K., Takahashi T., Osawa M., Areas H., Hirayama N., Miyake K., Nakauchi H., Shirasawa T. and Saito T., *Developmental defects of lymphoid cells in Jak3 kinase-deficient mice*. Immunity, 1995. **3**(6): p. 771-782.
124. Bunting K.D., Sangster M.Y., Ihle J.N. and Sorrentino B.P., *Restoration of lymphocyte function in Janus kinase 3-deficient mice by retroviral-mediated gene transfer*. Nature Medicine, 1998. **4**(1): p. 58-64.
125. Urschel S., Schmidt S., Hoffmann F., Chedville G., Fischer A., Roos R., Schwarz K., Wintergerst U. and Belohradsky B., *Somatische Gentherapie bei X-chromosomal vererbtem schwerem kombiniertem Immundefekt (X-SCID)*. Monatsschrift Kinderheilkunde, 2003. **151**(8): p. 869-874.

126. Pesu M., Candotti F., Husa M., Hofmann S.R., Notarangelo L.D. and O'Shea J.J., *Jak3, severe combined immunodeficiency, and a new class of immunosuppressive drugs*. Immunological Reviews, 2005. **203**(1): p. 127-142.
127. Mishra J., Verma R.K., Alpini G., Meng F. and Kumar N., *Role of Janus kinase 3 in mucosal differentiation and predisposition to colitis*. Journal of Biological Chemistry, 2013. **288**(44): p. 31795-31806.
128. Kumar N., Mishra J., Narang V.S. and Waters C.M., *Janus kinase 3 regulates interleukin 2-induced mucosal wound repair through tyrosine phosphorylation of villin*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(42): p. 30341-30345.
129. Karaghiosoff M., Neubauer H., Lassnig C., Kovarik P., Schindler H., Pircher H., McCoy B., Bogdan C., Decker T. and Brem G., *Partial impairment of cytokine responses in Tyk2-deficient mice*. Immunity, 2000. **13**(4): p. 549-560.
130. Shimoda K., Kato K., Aoki K., Matsuda T., Miyamoto A., Shibamori M., Yamashita M., Numata A., Takase K. and Kobayashi S., *Tyk2 plays a restricted role in IFN α signaling, although it is required for IL-12-mediated T cell function*. Immunity, 2000. **13**(4): p. 561-571.
131. Durbin J.E., Hackenmiller R., Simon M.C. and Levy D.E., *Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease*. Cell, 1996. **84**(3): p. 443-450.
132. Meraz M.A., White J.M., Sheehan K.C., Bach E.A., Rodig S.J., Dighe A.S., Kaplan D.H., Riley J.K., Greenlund A.C. and Campbell D., *Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway*. Cell, 1996. **84**(3): p. 431-442.
133. Schreiber S., Rosenstiel P., Hampe J., Nikolaus S., Groessner B., Schottelius A., Kühbacher T., Hämling J., Fölsch U. and Seegert D., *Activation of signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 in human chronic inflammatory bowel disease*. Gut, 2002. **51**(3): p. 379-385.
134. Kaplan D.H., Shankaran V., Dighe A.S., Stockert E., Aguet M., Old L.J. and Schreiber R.D., *Demonstration of an interferon γ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(13): p. 7556-7561.
135. Park C., Li S., Cha E. and Schindler C., *Immune response in Stat2 knockout mice*. Immunity, 2000. **13**(6): p. 795-804.
136. Takeda K., Noguchi K., Shi W., Tanaka T., Matsumoto M., Yoshida N., Kishimoto T. and Akira S., *Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(8): p. 3801-3804.
137. Shen Y., Devgan G., Darnell J.E. and Bromberg J.F., *Constitutively activated Stat3 protects fibroblasts from serum withdrawal and UV-induced apoptosis and antagonizes the proapoptotic effects of activated Stat1*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(4): p. 1543-1548.
138. Bromberg J.F., Wrzeszczynska M.H., Devgan G., Zhao Y., Pestell R.G., Albanese C. and Darnell J.E., *Stat3 as an oncogene*. Cell, 1999. **98**(3): p. 295-303.
139. Lovato P., Brender C., Agnholt J., Kelsen J., Kaltoft K., Svejgaard A., Eriksen K.W., Woetmann A. and Ødum N., *Constitutive STAT3 activation in intestinal T cells from patients with Crohn's disease*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(19): p. 16777-16781.
140. Musso A., Dentelli P., Carlino A., Chiusa L., Repici A., Sturm A., Fiocchi C., Rizzetto M., Pegoraro L. and Sategna-Guidetti C., *Signal transducers and activators of transcription 3 signaling pathway. An Essential Mediator of Inflammatory Bowel Disease and Other Forms of Intestinal Inflammation*. Inflammatory Bowel Diseases, 2005. **11**(2): p. 91-98.
141. Takeda K., Kaisho T., Yoshida N., Takeda J., Kishimoto T. and Akira S., *Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice*. The Journal of Immunology, 1998. **161**(9): p. 4652-4660.

180 Literaturverzeichnis

142. Alonzi T., Newton I.P., Bryce P.J., Di Carlo E., Lattanzio G., Tripodi M., Musiani P. and Poli V., *Induced somatic inactivation of STAT3 in mice triggers the development of a fulminant form of enterocolitis*. *Cytokine*, 2004. **26**(2): p. 45-56.
143. Takeda K., Clausen B.E., Kaisho T., Tsujimura T., Terada N., Förster I. and Akira S., *Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils*. *Immunity*, 1999. **10**(1): p. 39-49.
144. Powrie F., *T cells in inflammatory bowel disease: protective and pathogenic roles*. *Immunity*, 1995. **3**(2): p. 171-174.
145. Neurath M.F., Finotto S. and Glimcher L.H., *The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity*. *Nature Medicine*, 2002. **8**(6): p. 567-573.
146. Li Y., de Haar C., Peppelenbosch M.P. and van der Woude C.J., *New insights into the role of STAT3 in IBD*. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2012. **18**(6): p. 1177-1183.
147. Afanasyeva M., Wang Y., Kaya Z., Stafford E.A., Dohmen K.M., Akha A.A.S. and Rose N.R., *Interleukin-12 receptor/STAT4 signaling is required for the development of autoimmune myocarditis in mice by an interferon- γ -independent pathway*. *Circulation*, 2001. **104**(25): p. 3145-3151.
148. Jacobson N.G., Szabo S.J., Weber-Nordt R.M., Zhong Z., Schreiber R.D., Darnell J. and Murphy K.M., *Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat) 3 and Stat4*. *The Journal of Experimental Medicine*, 1995. **181**(5): p. 1755-1762.
149. Thierfelder W.E., van Deursen J.M., Yamamoto K., Tripp R.A., Sarawar S.R., Carson R.T., Sangster M.Y., Vignali D., Doherty P.C. and Grosveld G.C., *Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells*. *Nature*, 1996. **382**(6587): p. 171-174.
150. Kaplan M.H., Sun Y.-L., Hoey T. and Grusby M.J., *Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice*. *Nature*, 1996. **382**: p. 174-177.
151. Wakao H., Gouilleux F. and Groner B., *Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response*. *European Molecular Biology Organization Journal*, 1994. **13**(9): p. 2182.
152. Liu X., Robinson G.W., Gouilleux F., Groner B. and Hennighausen L., *Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995. **92**(19): p. 8831-8835.
153. Liu X., Robinson G.W., Wagner K.-U., Garrett L., Wynshaw-Boris A. and Hennighausen L., *Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis*. *Genes & Development*, 1997. **11**(2): p. 179-186.
154. Udy G.B., Towers R.P., Snell R.G., Wilkins R.J., Park S.-H., Ram P.A., Waxman D.J. and Davey H.W., *Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997. **94**(14): p. 7239-7244.
155. Nakajima H., Liu X.-W., Wynshaw-Boris A., Rosenthal L.A., Imada K., Finbloom D.S., Hennighausen L. and Leonard W.J., *An indirect effect of Stat5a in IL-2-induced proliferation: a critical role for Stat5a in IL-2-mediated IL-2 receptor α chain induction*. *Immunity*, 1997. **7**(5): p. 691-701.
156. Han X., Osuntokun B., Benight N., Loesch K., Frank S.J. and Denson L.A., *Signal transducer and activator of transcription 5b promotes mucosal tolerance in pediatric Crohn's disease and murine colitis*. *The American Journal of Pathology*, 2006. **169**(6): p. 1999-2013.
157. Han X., Ren X., Jurickova I., Groschwitz K., Pasternak B.A., Xu H., Wilson T., Hogan S. and Denson L., *Regulation of intestinal barrier function by signal transducer and activator of transcription 5b*. *Gut*, 2009. **58**(1): p. 49-58.

158. Takeda K., Tanaka T., Shi W., Matsumoto M., Minami M., Kashiwamura S.-i., Nakanishi K., Yoshida N., Kishimoto T. and Akira S., *Essential role of Stat6 in IL-4 signalling*. Nature, 1996. **380**: p. 627-630.
159. Takeda K., Kamanaka M., Tanaka T., Kishimoto T. and Akira S., *Impaired IL-13-mediated functions of macrophages in STAT6-deficient mice*. The Journal of Immunology, 1996. **157**(8): p. 3220-3222.
160. Kopf M., Le Gros G., Bachmann M., Lamers M.C., Bluethmann H. and Köhler G., *Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses*. Nature, 1993. **362**: p. 245-248.
161. Fort M.M., Cheung J., Yen D., Li J., Zurawski S.M., Lo S., Menon S., Clifford T., Hunte B. and Lesley R., *IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo*. Immunity, 2001. **15**(6): p. 985-995.
162. Shimoda K., van Deursent J., Sangster M.Y., Sarawar S.R., Carson R.T., Tripp R.A., Chu C., Quelle F.W., Nosaka T. and Vignali D.A., *Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted State6 gene*. Nature, 1996. **380**: p. 630-633.
163. Kaplan M.H., Schindler U., Smiley S.T. and Grusby M.J., *Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for the development of Th2 cells*. Immunity, 1996. **4**(3): p. 313-319.
164. Kuperman D., Schofield B., Wills-Karp M. and Grusby M.J., *Signal transducer and activator of transcription factor 6 (Stat6)-deficient mice are protected from antigen-induced airway hyperresponsiveness and mucus production*. The Journal of Experimental Medicine, 1998. **187**(6): p. 939-948.
165. Rosen M.J., Frey M.R., Washington M.K., Chaturvedi R., Kuhnhein L.A., Matta P., Revetta F.L., Wilson K.T. and Polk D.B., *STAT6 activation in ulcerative colitis: A new target for prevention of IL-13-induced colon epithelial cell dysfunction*. Inflammatory Bowel Diseases, 2011. **17**(11): p. 2224-2234.
166. Kontzias A., Kotlyar A., Laurence A., Changelian P. and O'Shea J.J., *Jakinibs: a new class of kinase inhibitors in cancer and autoimmune disease*. Current Opinion in Pharmacology, 2012. **12**(4): p. 464-470.
167. Wu P., Nielsen T.E. and Clausen M.H., *FDA-approved small-molecule kinase inhibitors*. Trends in Pharmacological Sciences, 2015. **36**(7): p. 422-439.
168. Taylor P.C., *Anti-TNF. ALPHA. Therapy for Rheumatoid Arthritis: An Update*. Internal Medicine, 2003. **42**(1): p. 15-20.
169. Demetri G.D., Von Mehren M., Blanke C.D., Van den Abbeele A.D., Eisenberg B., Roberts P.J., Heinrich M.C., Tuveson D.A., Singer S. and Janicek M., *Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors*. New England Journal of Medicine, 2002. **347**(7): p. 472-480.
170. Druker B.J., Guilhot F., O'Brien S.G., Gathmann I., Kantarjian H., Gattermann N., Deininger M.W.N., Silver R.T., Goldman J.M. and Stone R.M., *Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia*. New England Journal of Medicine, 2006. **355**(23): p. 2408-2417.
171. Wu P., Nielsen T.E. and Clausen M.H., *Small-molecule kinase inhibitors: an analysis of FDA-approved drugs*. Drug Discovery Today, 2016. **21**(1): p. 5-10.
172. Verstovsek S., Mesa R.A., Gotlib J., Levy R.S., Gupta V., DiPersio J.F., Catalano J.V., Deininger M.W., Miller C.B. and Silver R.T., *Efficacy, safety and survival with ruxolitinib treatment in patients with myelofibrosis: results of a median 2-year follow-up of COMFORT-I*. Haematologica, 2013. **98**: p. 1-7.
173. Sandborn W.J., Ghosh S., Panes J., Vranic I., Su C., Rousell S. and Niezychowski W., *Tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor, in active ulcerative colitis*. New England Journal of Medicine, 2012. **367**(7): p. 616-624.

182 Literaturverzeichnis

174. Sandborn W. J. e.a., *Efficacy and safety of oral tofacitinib as induction therapy in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis: results from 2 phase 3 randomised controlled trials in European Crohn's and Colitis Organisation*. 2016.
175. Sandborn W.J., Ghosh S., Panes J., Vranic I., Wang W., Niezychowski W. and Investigators S.A., *A phase 2 study of tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor, in patients with Crohn's disease*. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2014. **12**(9): p. 1485-1493. e2.
176. Papp K., Menter M., Abe M., Elewski B., Feldman S., Gottlieb A., Langley R., Luger T., Thaci D. and Buonanno M., *Tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor, for the treatment of chronic plaque psoriasis: results from two randomized, placebo-controlled, phase III trials*. *British Journal of Dermatology*, 2015. **173**(4): p. 949-961.
177. Hansen R.B. and Kavanaugh A., *Novel treatments with small molecules in psoriatic arthritis*. *Current Rheumatology Reports*, 2014. **16**(9): p. 1-7.
178. Craiglow B.G. and King B.A., *Tofacitinib citrate for the treatment of vitiligo: a pathogenesis-directed therapy*. *JAMA Dermatology*, 2015. **151**(10): p. 1110-1112.
179. Xing L., Dai Z., Jabbari A., Cerise J.E., Higgins C.A., Gong W., De Jong A., Harel S., DeStefano G.M. and Rothman L., *Alopecia areata is driven by cytotoxic T lymphocytes and is reversed by JAK inhibition*. *Nature Medicine*, 2014. **20**(9): p. 1043-1049.
180. Levy L.L., Urban J. and King B.A., *Treatment of recalcitrant atopic dermatitis with the oral Janus kinase inhibitor tofacitinib citrate*. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2015. **73**(3): p. 395-399.
181. Gupta A., Carviel J. and Abramovits W., *Efficacy of tofacitinib in treatment of alopecia universalis in two patients*. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2016. **30**(8): p. 1373-1378.
182. Karaman M.W., Herrgard S., Treiber D.K., Gallant P., Atteridge C.E., Campbell B.T., Chan K.W., Ciceri P., Davis M.I. and Edeen P.T., *A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity*. *Nature Biotechnology*, 2008. **26**(1): p. 127-132.
183. Chrencik J.E., Patny A., Leung I.K., Korniski B., Emmons T.L., Hall T., Weinberg R.A., Gormley J.A., Williams J.M. and Day J.E., *Structural and thermodynamic characterization of the TYK2 and JAK3 kinase domains in complex with CP-690550 and CMP-6*. *Journal of Molecular Biology*, 2010. **400**(3): p. 413-433.
184. Williams N.K., Bamert R.S., Patel O., Wang C., Walden P.M., Wilks A.F., Fantino E., Rossjohn J. and Lucet I.S., *Dissecting specificity in the Janus kinases: the structures of JAK-specific inhibitors complexed to the JAK1 and JAK2 protein tyrosine kinase domains*. *Journal of Molecular Biology*, 2009. **387**(1): p. 219-232.
185. Hall T., Emmons T.L., Chrencik J.E., Gormley J.A., Weinberg R.A., Leone J.W., Hirsch J.L., Saabye M.J., Schindler J.F. and Day J.E., *Expression, purification, characterization and crystallization of non- and phosphorylated states of JAK2 and JAK3 kinase domain*. *Protein Expression and Purification*, 2010. **69**(1): p. 54-63.
186. Zhou Y.-J., Hanson E.P., Chen Y.-Q., Magnuson K., Chen M., Swann P.G., Wange R.L., Changelian P.S. and O'Shea J.J., *Distinct tyrosine phosphorylation sites in JAK3 kinase domain positively and negatively regulate its enzymatic activity*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997. **94**(25): p. 13850-13855.
187. Feng J., Witthuhn B.A., Matsuda T., Kohlhuber F., Kerr I.M. and Ihle J.N., *Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop*. *Molecular and Cellular Biology*, 1997. **17**(5): p. 2497-2501.
188. Agency E.M. *Refusal of the marketing authorisation for Xeljanz (tofacitinib)*. 2013.
189. Fleischmann R., Kremer J., Cush J., Schulze-Koops H., Connell C.A., Bradley J.D., Gruben D., Wallenstein G.V., Zwillich S.H. and Kanik K.S., *Placebo-controlled trial of tofacitinib monotherapy in rheumatoid arthritis*. *New England Journal of Medicine*, 2012. **367**(6): p. 495-507.

190. Ortiz-Ibanez K., Alsina M. and Munoz-Santos C., *Tofacitinib and other kinase inhibitors in the treatment of psoriasis*. Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition), 2013. **104**(4): p. 304-310.
191. O'Shea J.J., Kontzias A., Yamaoka K., Tanaka Y. and Laurence A., *Janus kinase inhibitors in autoimmune diseases*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2013. **72**(suppl 2): p. ii111-ii115.
192. Souto A., Maneiro J.R., Salgado E., Carmona L. and Gomez-Reino J.J., *Risk of tuberculosis in patients with chronic immune-mediated inflammatory diseases treated with biologics and tofacitinib: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials and long-term extension studies*. Rheumatology, 2014: p. keu172.
193. Herper M. *Pfizer's Key Drug Walks A Tightrope*. 2011.
194. Dowty M.E., Lin J., Ryder T.F., Wang W., Walker G.S., Vaz A., Chan G.L., Krishnaswami S. and Prakash C., *The pharmacokinetics, metabolism, and clearance mechanisms of tofacitinib, a Janus kinase inhibitor, in humans*. Drug Metabolism and Disposition, 2014. **42**(4): p. 759-773.
195. FDA, *Pharmacology Review, Application Number 203214Orig1s000*. 2011. p. 64-94.
196. Gupta P., Alvey C., Wang R., Dowty M.E., Fahmi O.A., Walsky R.L., Riese R.J. and Krishnaswami S., *Lack of effect of tofacitinib (CP-690,550) on the pharmacokinetics of the CYP3A4 substrate midazolam in healthy volunteers: confirmation of in vitro data*. British Journal of Clinical Pharmacology, 2012. **74**(1): p. 109-115.
197. Bannwarth B., Kostine M. and Poursac N., *A pharmacokinetic and clinical assessment of tofacitinib for the treatment of rheumatoid arthritis*. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 2013. **9**(6): p. 753-761.
198. Albert A., *Chemical aspects of selective toxicity*. Nature, 1958. **182**(4633): p. 421.
199. Wermuth C., Ganellin C., Lindberg P. and Mitscher L., *Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998)*. Pure and Applied Chemistry, 1998. **70**(5): p. 1129-1143.
200. Stella V.J., *Prodrugs as therapeutics*. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2004. **14**(3): p. 277-280.
201. Rautio J., Kumpulainen H., Heimbach T., Oliyai R., Oh D., Järvinen T. and Savolainen J., *Prodrugs: design and clinical applications*. Nature Reviews Drug Discovery, 2008. **7**(3): p. 255-270.
202. Ettmayer P., Amidon G.L., Clement B. and Testa B., *Lessons learned from marketed and investigational prodrugs*. Journal of Medicinal Chemistry, 2004. **47**(10): p. 2393-2404.
203. Clement B., Schmitt S. and Zimmermann M., *Enzymatic Reduction of Benzamidoxime to Benzamidoxime*. Archiv der Pharmazie, 1988. **321**(12): p. 955-956.
204. Clement B., *Reduction of N-hydroxylated compounds: amidoximes (N-hydroxyamidines) as prodrugs of amidines*. Drug Metabolism Reviews, 2002. **34**(3): p. 565-579.
205. Havemeyer A., Bittner F., Wollers S., Mendel R., Kunze T. and Clement B., *Identification of the missing component in the mitochondrial benzamidoxime prodrug-converting system as a novel molybdenum enzyme*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(46): p. 34796-34802.
206. Gruenewald S., Wahl B., Bittner F., Hungeling H., Kanzow S., Kotthaus J., Schwering U., Mendel R.R. and Clement B., *The fourth molybdenum containing enzyme mARC: cloning and involvement in the activation of N-hydroxylated prodrugs*. Journal of Medicinal Chemistry, 2008. **51**(24): p. 8173-8177.
207. Albert A., Goldacre R. and Phillips J., *455. The strength of heterocyclic bases*. Journal of the Chemical Society (Resumed), 1948: p. 2240-2249.
208. Peterlin Masic L., *Arginine mimetic structures in biologically active antagonists and inhibitors*. Current Medicinal Chemistry, 2006. **13**(30): p. 3627-3648.
209. Sands M., Kron M.A. and Brown R.B., *Pentamidine: a review*. Review of Infectious Diseases, 1985. **7**(5): p. 625-6344.
210. Van Ryn J., Stangier J., Haertter S., Liesenfeld K.-H., Wiene W., Feuring M. and Clemens A., *Dabigatran etexilate-a novel, reversible, oral direct thrombin inhibitor: interpretation of*

184 Literaturverzeichnis

- coagulation assays and reversal of anticoagulant activity*. Thrombosis & Haemostasis, 2010. **103**(6): p. 1116.
211. Gustafsson D., Nyström J.-E., Carlsson S., Bredberg U., Eriksson U., Gyzander E., Elg M., Antonsson T., Hoffmann K.-J. and Ungell A.-L., *The direct thrombin inhibitor melagatran and its oral prodrug H 376/95: intestinal absorption properties, biochemical and pharmacodynamic effects*. Thrombosis Research, 2001. **101**(3): p. 171-181.
212. Lee W.M., Larrey D., Olsson R., Lewis J.H., Keisu M., Auclert L. and Sheth S., *Hepatic findings in long-term clinical trials of ximelagatran*. Drug Safety, 2005. **28**(4): p. 351-370.
213. AstraZeneca, *AstraZeneca decides to withdraw exanta*, in http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Press_release/2010/02/WC500074073.pdf. 2006.
214. Sinha V. and Kumria R., *Colonic drug delivery: prodrug approach*. Pharmaceutical Research, 2001. **18**(5): p. 557-564.
215. Conchie J. and Macdonald D., *Glycosidases in the mammalian alimentary tract*. Nature, 1959. **184**: p. 1233.
216. Yang L., Chu J.S. and Fix J.A., *Colon-specific drug delivery: new approaches and in vitro/in vivo evaluation*. International Journal of Pharmaceutics, 2002. **235**(1): p. 1-15.
217. Mutschler E. G.G., Kroemer H.K., Menzel S., Ruth P., *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Pharmakologie, Klinische Pharmakologie, Toxikologie*. Vol. 10. 2013, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 604.
218. Krischkowski C., *mARC-Expression und N-reduktive Aktivität in hepatischen und extrahepatischen porcinen und humanen Geweben und Studien zur submitochondrialen Lokalisation von mARC*, in Pharmazeutisches Institut. 2014, Christian-Albrechts-Universität: Kiel.
219. Clement B., Demesmaeker M. and Linne S., *Microsomal Catalyzed N-Hydroxylation of Guanabenz and Reduction of the N-Hydroxylated Metabolite: Characterization of the Two Reactions and Genotoxic Potential of Guanoxabenz*. Chemical Research in Toxicology, 1996. **9**(4): p. 682-688.
220. Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G., Mallia A., Gartner F., Provenzano M., Fujimoto E., Goeke N., Olson B. and Klenk D., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Analytical Biochemistry, 1985. **150**(1): p. 76-85.
221. Omura T. and Sato R., *The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes I. Evidence for its hemoprotein nature*. Journal of Biological Chemistry, 1964. **239**(7): p. 2370-2378.
222. König W., *Über eine neue, vom Pyridin derivierende Klasse von Farbstoffen*. Journal für Praktische Chemie, 1904. **69**(1): p. 105-137.
223. Asmus E. and Garschagen H., *Über die Verwendung der Barbitursäure für die photometrische Bestimmung von Cyanid und Rhodanid*. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 1953. **138**(1): p. 414-422.
224. Nagashima S., *Simultaneous reaction rate spectrophotometric determination of cyanide and thiocyanate by use of the pyridine-barbituric acid method*. Analytical Chemistry, 1984. **56**(11): p. 1944-1947.
225. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-275.
226. Laemmli U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**: p. 680-685.
227. Yilmaz Ö.H., Katajisto P., Lamming D.W., Gültekin Y., Bauer-Rowe K.E., Sengupta S., Birsoy K., Dursun A., Yilmaz V.O. and Selig M., *mTORC1 in the Paneth cell niche couples intestinal stem-cell function to calorie intake*. Nature, 2012. **486**(7404): p. 490-495.

228. Gudd J., *Evaluierung neuer Prodrugprinzipien für Wirkstoffe mit Amidin- und Guanidinfunktionen*. 2015, Dissertation. Christian-Albrechts-Universität, Kiel. Pharmazeutisches Institut.
229. Kotthaus J., Kotthaus J., Schade D., Schwering U., Hungeling H., Müller-Fielitz H., Raasch W. and Clement B., *New prodrugs of the antiprotozoal drug pentamidine*. ChemMedChem, 2011. **6**(12): p. 2233-2242.
230. Laroui H., Ingersoll S.A., Liu H.C., Baker M.T., Ayyadurai S., Charania M.A., Laroui F., Yan Y., Sitaraman S.V. and Merlin D., *Dextran sodium sulfate (DSS) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon*. PLoS ONE, 2012. **7**(3): p. e32084.
231. Mutschler E. G.G., Kroemer H.K., Menzel S., Ruth P., *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Pharmakologie, Klinische Pharmakologie, Toxikologie*. Vol. 10. 2012, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 892.
232. Chaitanya G.V., Alexander J.S. and Babu P.P., *PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration*. Cell Communication and Signaling, 2010. **8**(1): p. 31.
233. Vollmer P., Oppmann B., Voltz N., Fischer M. and Rose-John S., *A role for the immunoglobulin-like domain of the human IL-6 receptor*. The FEBS Journal, 1999. **263**(2): p. 438-446.
234. O'zbek S., Peters M., Breuhahn K., Mann A., Blessing M., Fischer M., Schirmacher P., Mackiewicz A. and Rose-John S., *The designer cytokine hyper-IL-6 mediates growth inhibition and GM-CSF-dependent rejection of B16 melanoma cells*. Oncogene, 2001. **20**(8): p. 972.
235. Taga T., *IL6 signalling through IL6 receptor and receptor-associated signal transducer, gp130*. Research in Immunology, 1992. **143**(7): p. 737-739.
236. Rose-John S., Waetzig G.H., Scheller J., Grötzinger J. and Seegert D., *The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches*. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2007. **11**(5): p. 613-624.
237. Clark J.D., Flanagan M.E. and Telliez J.-B., *Discovery and Development of Janus Kinase (JAK) Inhibitors for Inflammatory Diseases*. Journal of Medicinal Chemistry, 2014. **57**(12): p. 5023-5038.
238. Ouyang W., Rutz S., Crellin N.K., Valdez P.A. and Hymowitz S.G., *Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease*. Annual Review of Immunology, 2011. **29**: p. 71-109.
239. Takeda K., Tanaka T., Shi W., Matsumoto M., Minami M., Kashiwamura S.-i., Nakanishi K., Yoshida N., Kishimoto T. and Akira S., *Essential role of Stat6 in IL-4 signalling*. Nature, 1996. **380**(627-630).
240. McGee D. and Vitkus S., *IL-4 enhances IEC-6 intestinal epithelial cell proliferation yet has no effect on IL-6 secretion*. Clinical & Experimental Immunology, 1996. **105**(2): p. 274-277.
241. Fatehullah A., Tan S.H. and Barker N., *Organoids as an in vitro model of human development and disease*. Nature Cell Biology, 2016. **18**(3): p. 246-254.
242. Mau S., *Studien zur extrahepatischen Reduktion verschiedener N-hydroxylierter Verbindungen*. 2002, Dissertation. Christian-Albrechts-Universität, Kiel. Pharmazeutisches Institut.
243. Suzuki A., Hanada T., Mitsuyama K., Yoshida T., Kamizono S., Hoshino T., Kubo M., Yamashita A., Okabe M. and Takeda K., *CIS3/SOCS3/SSI3 plays a negative regulatory role in STAT3 activation and intestinal inflammation*. Journal of Experimental Medicine, 2001. **193**(4): p. 471-482.
244. Song F., Ito K., Denning T.L., Kuninger D., Papaconstantinou J., Gourley W., Klimpel G., Balish E., Hokanson J. and Ernst P.B., *Expression of the neutrophil chemokine KC in the colon of mice with enterocolitis and by intestinal epithelial cell lines: effects of flora and proinflammatory cytokines*. The Journal of Immunology, 1999. **162**(4): p. 2275-2280.

186 Literaturverzeichnis

245. Pickert G., Neufert C., Leppkes M., Zheng Y., Wittkopf N., Warntjen M., Lehr H.-A., Hirth S., Weigmann B. and Wirtz S., *STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing*. Journal of Experimental Medicine, 2009. **206**(7): p. 1465-1472.
246. Gebhardt C., Németh J., Angel P. and Hess J., *S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer*. Biochemical Pharmacology, 2006. **72**(11): p. 1622-1631.
247. Cooper H.S., Murthy S., Shah R. and Sedergran D., *Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 1993. **69**(2): p. 238-249.
248. Lee E.B., Fleischmann R., Hall S., Wilkinson B., Bradley J.D., Gruben D., Koncz T., Krishnaswami S., Wallenstein G.V. and Zang C., *Tofacitinib versus methotrexate in rheumatoid arthritis*. New England Journal of Medicine, 2014. **370**(25): p. 2377-2386.
249. Dörner K., *Taschenlehrbuch: Klinische Chemie und Hämatologie*, ed. Thieme. Vol. 6. 2006, Stuttgart: Thieme, 438-442.
250. Okolie N. and Osagie A., *Liver and kidney lesions and associated enzyme changes induced in rabbits by chronic cyanide exposure*. Food and Chemical Toxicology, 1999. **37**(7): p. 745-750.
251. Holland M. and Kozlowski L., *Clinical features and management of cyanide poisoning*. Clinical Pharmacy, 1986. **5**(9): p. 737-741.
252. Chen K., Rose C.L. and Clowes G., *Comparative Values of Several Antidotes in Cyanid Poisoning*. American Journal of Medical Sciences, 1934. **188**: p. 767-81.
253. Baumeister R., Schievelbein H. and Zickgraf-Rüdel G., *Toxicological and clinical aspects of cyanide metabolism*. Arzneimittelforschung, 1975: p. 1056-1064.
254. Rosling H., *Konzo, an epidemic upper motor neuron disease studied in Tanzania*. Brain, 1990. **1**: p. 223-235.
255. Money G., *Endemic neuropathies in the Epe district of Southern Nigeria*. West African Medical Journal, 1958. **7**(1): p. 58-62.
256. Vohr H.-W., *Toxikologie: Band 2: Toxikologie der Stoffe*. 2010: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 318.
257. Cliff J., Lundquist P., Rosling H., Sörbo B. and Wide L., *Thyroid function in a cassava-eating population affected by epidemic spastic paraparesis*. Acta endocrinologica, 1986. **113**(4): p. 523-528.
258. De Vries L., van Leeuwen-Hilbers F., van Hamersveld P., Ludbrook V., D'Haens G. and De Jonge W., *The efficacy of Tofacitinib and a selective Janus Kinase 1 inhibitor in Dextran Sulphate Sodium colitis models*. in *Journal of Crohn'S & Colitis*. 2016.
259. Yokoyama S., Perera P.-Y., Waldmann T.A., Hiroi T. and Perera L.P., *Tofacitinib, a janus kinase inhibitor demonstrates efficacy in an IL-15 transgenic mouse model that recapitulates pathologic manifestations of celiac disease*. Journal of Clinical Immunology, 2013. **33**(3): p. 586-594.
260. Ghoreschi K., Jesson M.I., Li X., Lee J.L., Ghosh S., Alsup J.W., Warner J.D., Tanaka M., Steward-Tharp S.M. and Gadina M., *Modulation of innate and adaptive immune responses by tofacitinib (CP-690,550)*. The Journal of Immunology, 2011. **186**(7): p. 4234-4243.
261. Gavegnano C., Detorio M., Montero C., Bosque A., Planelles V. and Schinazi R.F., *Ruxolitinib and tofacitinib are potent and selective inhibitors of HIV-1 replication and virus reactivation in vitro*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2014. **58**(4): p. 1977-1986.
262. Majno G. and Joris I., *Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death*. The American Journal of Pathology, 1995. **146**(1): p. 3.
263. Sugimoto K., Ogawa A., Mizoguchi E., Shimomura Y., Andoh A., Bhan A.K., Blumberg R.S., Xavier R.J. and Mizoguchi A., *IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis*. The Journal of Clinical Investigation, 2008. **118**(2): p. 534-544.

264. Strober W., Ludviksson B.R. and Fuss I.J., *The pathogenesis of mucosal inflammation in murine models of inflammatory bowel disease and Crohn disease*. *Annals of Internal Medicine*, 1998. **128**(10): p. 848-856.
265. Akira S., *Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting*. *Oncogene*, 2000. **19**(21): p. 2607.
266. Reimund J.-M., Wittersheim C., Dumont S., Muller C., Baumann R., Poindron P. and Duclos B., *Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease*. *Journal of Clinical Immunology*, 1996. **16**(3): p. 144-150.
267. Grivennikov S., Karin E., Terzic J., Mucida D., Yu G.-Y., Vallabhapurapu S., Scheller J., Rose-John S., Cheroutre H. and Eckmann L., *IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer*. *Cancer cell*, 2009. **15**(2): p. 103-113.
268. Yamamoto M., Yoshizaki K., Kishimoto T. and Ito H., *IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis*. *The Journal of Immunology*, 2000. **164**(9): p. 4878-4882.
269. Jonasch E. and Haluska F.G., *Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities*. *The Oncologist*, 2001. **6**(1): p. 34-55.
270. Zhang Z. and Michael J.G., *Orally inducible immune unresponsiveness is abrogated by IFN-gamma treatment*. *The Journal of Immunology*, 1990. **144**(11): p. 4163-4165.
271. Madara J.L. and Stafford J., *Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers*. *Journal of Clinical Investigation*, 1989. **83**(2): p. 724.
272. Bisping G., Lügering N., Lütke-Brintrup S., Pauels H.G., Schürmann G., Domschke W. and Kucharzik T., *Patients with inflammatory bowel disease (IBD) reveal increased induction capacity of intracellular interferon-gamma (IFN- γ) in peripheral CD8+ lymphocytes co-cultured with intestinal epithelial cells*. *Clinical & Experimental Immunology*, 2001. **123**(1): p. 15-22.
273. Horino J., Fujimoto M., Terabe F., Serada S., Takahashi T., Soma Y., Tanaka K., Chinen T., Yoshimura A. and Nomura S., *Suppressor of cytokine signaling-1 ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice*. *International Immunology*, 2008. **20**(6): p. 753-762.
274. Wolk K., Kunz S., Witte E., Friedrich M., Asadullah K. and Sabat R., *IL-22 increases the innate immunity of tissues*. *Immunity*, 2004. **21**(2): p. 241-254.
275. Brand S., Beigel F., Olszak T., Zitzmann K., Eichhorst S.T., Otte J.-M., Diepolder H., Marquardt A., Jagla W. and Popp A., *IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration*. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2006. **290**(4): p. G827-G838.
276. Gehringer M., Forster M., Pfaffenrot E., Bauer S.M. and Laufer S.A., *Novel Hinge-Binding Motifs for Janus Kinase 3 Inhibitors: A Comprehensive Structure-Activity Relationship Study on Tofacitinib Bioisosteres*. *ChemMedChem*, 2014. **9**(11): p. 2516-2527.
277. Chassaing B., Aitken J.D., Malleshappa M. and Vijay-Kumar M., *Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice*. *Current Protocols in Immunology*, 2014. **104**: p. 15.25. 1-15.25. 14.
278. Vermeire S., Van Assche G. and Rutgeerts P., *Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys?* *Gut*, 2006. **55**(3): p. 426-431.
279. Ryckman C., Robichaud G.A., Roy J., Cantin R., Tremblay M.J. and Tessier P.A., *HIV-1 transcription and virus production are both accentuated by the proinflammatory myeloid-related proteins in human CD4+ T lymphocytes*. *The Journal of Immunology*, 2002. **169**(6): p. 3307-3313.
280. Carrión M., Juarranz Y., Martínez C., González-Álvaro I., Pablos J.L., Gutiérrez-Cañas I. and Gomariz R.P., *IL-22/IL-22R1 axis and S100A8/A9 alarmins in human osteoarthritic and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts*. *Rheumatology*, 2013. **52**(12): p. 2177-2186.
281. Foell D., Frosch M., Sorg C. and Roth J., *Phagocyte-specific calcium-binding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammation*. *Clinica Chimica Acta*, 2004. **344**(1): p. 37-51.

188 Literaturverzeichnis

282. Ryckman C., Vandal K., Rouleau P., Talbot M. and Tessier P.A., *Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion*. The Journal of Immunology, 2003. **170**(6): p. 3233-3242.
283. Roth J., Vogl T., Sorg C. and Sunderkötter C., *Phagocyte-specific S100 proteins: a novel group of proinflammatory molecules*. Trends in Immunology, 2003. **24**(4): p. 155-158.
284. Røseth A., Aadland E. and Grzyb K., *Normalization of faecal calprotectin: a predictor of mucosal healing in patients with inflammatory bowel disease*. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 2004. **39**(10): p. 1017-1020.
285. Chen G. and Goeddel D.V., *TNF-R1 signaling: a beautiful pathway*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1634-1635.
286. Schett G., Dayer J.-M. and Manger B., *Interleukin-1 function and role in rheumatic disease*. Nature Reviews Rheumatology, 2015. **12**(1): p. 14-24.
287. Miscia S., Marchisio M., Grilli A., Di Valerio V., Centurione L., Sabatino G., Garaci F., Zauli G., Bonvini E. and Di Baldassarre A., *Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) activates Jak1/Stat3-Stat5B signaling through TNFR-1 in human B cells*. Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research, 2002. **13**(1): p. 13-18.
288. Ogura H., Murakami M., Okuyama Y., Tsuruoka M., Kitabayashi C., Kanamoto M., Nishihara M., Iwakura Y. and Hirano T., *Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction*. Immunity, 2008. **29**(4): p. 628-636.
289. Subramaniam S.V., Cooper R.S. and Adunyah S.E., *Evidence for the involvement of JAK/STAT pathway in the signaling mechanism of interleukin-17*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999. **262**(1): p. 14-19.
290. Gilbert S., Zhang R., Denson L., Moriggi R., Steinbrecher K., Shroyer N., Lin J. and Han X., *Enterocyte STAT5 promotes mucosal wound healing via suppression of myosin light chain kinase-mediated loss of barrier function and inflammation*. European Molecular Biology Organization, 2012. **4**(2): p. 109-124.
291. Iizuka M. and Konno S., *Wound healing of intestinal epithelial cells*. World Journal of Gastroenterology, 2011. **17**(17): p. 2161-2171.
292. Liang C.-C., Park A.Y. and Guan J.-L., *In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro*. Nature Protocols, 2007. **2**(2): p. 329-333.
293. Zheng Y., Valdez P.A., Danilenko D.M., Hu Y., Sa S.M., Gong Q., Abbas A.R., Modrusan Z., Ghilardi N. and De Sauvage F.J., *Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens*. Nature Medicine, 2008. **14**(3): p. 282-289.
294. Clement B. and Raether W., *Amidoximes of pentamidine: synthesis, trypanocidal and leishmanicidal activity*. Arzneimittel-Forschung, 1984. **35**(7): p. 1009-1014.
295. Bollrath J., Pheesse T.J., von Burstin V.A., Putoczki T., Bennecke M., Bateman T., Nebelsiek T., Lundgren-May T., Canli Ö. and Schwitalla S., *gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis*. Cancer cell, 2009. **15**(2): p. 91-102.
296. De Robertis M., Massi E., Poeta M.L., Carotti S., Morini S., Cecchetelli L., Signori E. and Fazio V.M., *The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies*. Journal of Carcinogenesis, 2011. **10**(1): p. 9.
297. Merciris D., Delachaux C., De Vriendt V., Boutet A.-L., Perret L., Ceccotti M.-C., De Vos S., Monjardet A., Brys R. and Galien R., *P072 GLPG0634, the first selective JAK1 inhibitor, shows strong activity in the mouse DSS-colitis model*. Journal of Crohn's and Colitis, 2014. **8**(Supplement 1): p. S92-S92.
298. Waldmann T.A., *The biology of IL-15: implications for cancer therapy and the treatment of autoimmune disorders*. Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings, 2013. **16**(1): p. S28-S30.

299. Bowcock A.M. and Krueger J.G., *Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis*. Nature Reviews Immunology, 2005. **5**(9): p. 699-711.
300. Papp K., Menter A., Strober B., Langley R., Buonanno M., Wolk R., Gupta P., Krishnaswami S., Tan H. and Harness J., *Efficacy and safety of tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor, in the treatment of psoriasis: a Phase 2b randomized placebo-controlled dose-ranging study*. British Journal of Dermatology, 2012. **167**(3): p. 668-677.
301. Chang B.Y., Zhao F., He X., Ren H., Braselmann S., Taylor V., Wicks J., Payan D.G., Grossbard E.B. and Pine P.R., *JAK3 inhibition significantly attenuates psoriasiform skin inflammation in CD18 mutant PL/J mice*. The Journal of Immunology, 2009. **183**(3): p. 2183-2192.
302. Bullard D.C., Scharffetter-Kochanek K., McArthur M.J., Chosay J.G., McBride M.E., Montgomery C.A. and Beaudet A.L., *A polygenic mouse model of psoriasiform skin disease in CD18-deficient mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(5): p. 2116-2121.
303. Harel S., Higgins C.A., Cerise J.E., Dai Z., Chen J.C., Clynes R. and Christiano A.M., *Pharmacologic inhibition of JAK-STAT signaling promotes hair growth*. Science Advances, 2015. **1**(9): p. e1500973.

Anhang

Eidestaatliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Helene Geese, geb. Schmidt, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit unter der wissenschaftlichen Leitung von Prof. Dr. Bernd Clement selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Die Abhandlung stellt nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit da und ich habe außer der Beratung meiner Betreuer, Prof. Dr. Bernd Clement, Prof. Dr. Philip Rosenstiel und Dr. Konrad Aden, keine weitere Hilfe in Anspruch genommen.

Weiterhin habe ich keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde unter der Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft erstellt. Auszüge der Dissertation wurden bereits bei Posterbeiträgen veröffentlicht.

Ich versichere, dass ich weder an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel noch anderweitig versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Promotionsprüfung zu unterziehen.

Kiel, 22.06.2017

Posterbeiträge:

Geese H., Aden K., Schreiber S., Rosenstiel P., Clement B. (2014)

A quantitative analysis of Tofacitinib citrate in plasma and organs

Posterbeitrag, 23 rd Int. Symposium on Medicinal Chemistry EFMC-ISMC, Lissabon

Geese H., Paffenrot E., Laufer S., Clement B. (2016)

Is cyanide a significant metabolite of Tofacitinib?

Posterbeitrag, DPhG Jahrestagung, München

Geese H., Paffenrot E., Laufer S., Clement B. (2017)

Is cyanide a significant metabolite of Tofacitinib?

Vortrag, DPhG-Doktorandentagung, Frankfurt

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter Anleitung von

Prof. Dr. Bernd Clement

Für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Überlassung des interessanten Promotionsthemas, die Freiheit bei der Gestaltung und für die Vermittlung der Kooperation mit dem Institut der klinischen Molekularbiologie möchte ich ihm herzlich danken.

Einen großen Dank möchte ich den Mitarbeitern des Institutes der klinischen Molekularbiologie aussprechen. Prof. Dr. Philip Rosenstiel danke ich ganz herzlich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für die stetige Diskussionsbereitschaft und für die Übernahme des zweiten Gutachtens. Dr. Konrad Aden spreche ich einen großen Dank für seine intensive Betreuung und seinen Einsatz während meiner Promotion aus. Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Anne Luzius und Dr. Marlene Jentsch bedanken. Sie nahmen mich sowohl beruflich als auch privat mit offenen Armen auf, erleichterten mir den Einstieg in die neue Arbeitsgruppe, und gaben mir viele schöne Erinnerungen. Weiterhin danke ich Stephanie Stengel, Anna Henning, Antonella Fazio, Frauke Degenhardt und Berith Messner für die großartige Hilfe bei meinen Experimenten, für Ratschläge, für das Zuhören und für die schöne gemeinsame Zeit sowohl im Institut als auch privat. Stephanie Stengel und Dr. Anne Luzius danke ich außerdem für das unermüdliche Korrekturlesen meiner Arbeit. Ich bedanke mich ebenfalls herzlich bei Sabine Kock, Katharina Göbel, Maren Reffermann, Tanja Klostermeier, Melanie Nebendahl, Dorina Oelsner, Tatjana Schmidtke und Karina Greve für ihre Arbeit, ihre Unterstützung und die herzliche Aufnahme in das Team. Zusätzlich möchte ich mich bei Dr. Simone Lipinski und Dr. Maren Falk-Paulsen für ihren Einsatz während meines Experimentes bedanken.

Für die angenehme und unterhaltsame Zusammenarbeit während der Betreuung des 6. Semesters möchte ich mich bei Dr. Eva Bauch, Dr. Birte Plitzko, Jennifer Schneider, Merle Giesche, Pascal Polosek, Carsten Ginsel, Thomas Behrendt und Prof. Dr. Thomas Kunze bedanken.

Ich bedanke mich herzlich bei Prof. Dr. Stefan Laufer und Ellen Pfaffenroth für die Synthese der Verbindungen und für eine komplikationslose Zusammenarbeit.

Prof. Dr. Thomas Kunze möchte ich zusätzlich für seine Diskussionsbereitschaft danken.

Meinen Kollegen des Pharmazeutischen Institutes danke ich ebenfalls sehr für die nette Aufnahme in den Arbeitskreis. Ganz besonders möchte ich mich bei Jennifer Schneider und Carsten Ginsel bedanken. Als die letzten offiziellen Doktoranden kämpften wir wie die drei Musketiere auf einer Seite gegen die Rocheforts, Kardinäle oder Myladys de Winter der Wissenschaft. Vielen Dank für eine schöne Zeit, für ein offenes Ohr und für die Hilfe. In diesem Sinne: „Einer für alle und alle für einen!!!“

Ich danke Sven Wichmann für die technische Unterstützung im Bereich der HPLC-Analytik.

Ein riesiges Dankeschön auch an Dorothea Albold. Ich möchte ihr für die schöne gemeinsame Zeit danken. Nicht nur beruflich war es stets ein Vergnügen, sondern auch die privaten Abende und Treffen haben mein Leben verschönert.

Den größten Dank möchte ich meinem Mann, Christian, und meinen Eltern aussprechen. Meinen Eltern danke ich für eine schöne Kindheit, die mich geprägt hat, für ihre bedingungslose Liebe und ihre Fürsorge, die mich zu dem Menschen gemacht hat, der ich heute bin.

Meinem Mann danke ich für den Rückhalt, die Aufheiterung und das Verständnis während meiner Promotion. Selbstverständlich auch für das Auffangen und Halten nach Rückschritten und das gemeinsame Freuen bei Erfolgen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Helene Geese
Geburtsdatum	29. Mai 1988
Geburtsort	Karabulak, Kasachstan
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Heimatort	Hechingen, Baden-Württemberg

Wissenschaftlicher Werdegang

03/2013 – heute	Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Dissertation, Christian-Albrechts-Universität, Kiel Leitung: Prof. Bernd Clement Thema: „Charakterisierung und Untersuchung neuer JAK-Inhibitoren zur Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen“
01/2013	Approbation als Apothekerin, Kiel Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
06/2012 – 11/2012	2. Halbjahr des praktischen Jahres, Esmarch-Apotheke, Kiel
12/2011 – 05/2012	1. Halbjahr des praktischen Jahres, Universitätsmedizin, Göttingen
10/2007 – 11/2011	Studium der Pharmazie, Christian-Albrechts-Universität, Kiel Abschluss des ersten und zweiten Teils der Pharmazeutischen Prüfung
09/1998 – 06/2007	Abitur, Gymnasium Hechingen, Hechingen

Kurzfassung

Durch die Invasion von Bakterien in die Lamina propria des Darmes wird das Immunsystem aktiviert. Diese Aktivierung erfolgt unter anderem durch Zytokine, die durch den JAK/STAT-Signalweg eine Entzündung hervorrufen können, weshalb die JAK Inhibition für chronisch entzündliche Darmerkrankungen eine attraktive Therapiemöglichkeit darstellt. Dabei wurde die bedeutende Rolle der JAK-Proteine in entzündlichen Erkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis gezeigt. Zur Familie der JAK-Proteine zählen JAK1, JAK2, JAK3 und Tyk2. Die Bedeutung von JAK1, JAK2 und Tyk2 in CED wurde bereits beschrieben. Dagegen ist die Funktion von JAK3 in CED bisher nicht hinreichend geklärt. Tofacitinib wurde 2012 als einer der ersten oral verfügbaren JAK-Inhibitoren zur Therapie der rheumatoiden Arthritis in den USA zugelassen. Eine Zulassung in Europa wurde aufgrund der schweren Nebenwirkungen nach Behandlung mit Tofacitinib abgelehnt. Die Nebenwirkungen von Tofacitinib entstehen vermutlich durch die unselektive Inhibition der vier JAK-Proteine. Durch eine gezielte rektale Applikation und durch die Anwendung modifizierter JAK Inhibitoren sollte die systemische Verteilung von Tofacitinib verhindert werden. Hierfür wurden zwei JAK-Inhibitoren zur Anwendung im Kolon synthetisiert. Die Verbindungen unterscheiden sich zusätzlich aufgrund der Selektivität gegenüber den JAK-Proteinen. Die Verbindungen und Tofacitinib als Referenzsubstanz wurden zuerst in vitro in einem intestinalen Karzinomzellsystem charakterisiert.

Aufgrund der überzeugenden in vitro Daten wurden die Verbindungen in einem akuten DSS-induzierten Kolitis Modell in der Maus auf ihre Wirkung getestet. Dabei führte weder die Behandlung mit Tofacitinib noch mit den neuen Verbindungen zur Verbesserung der Wundheilung und der klinischen Parameter.

Trotz der fehlenden protektiven Wirkung in dem getesteten System könnten die neuen Substanzen Therapiemöglichkeiten bei anderen Erkrankungen, wie Darmkrebs, darstellen.