

Aus der
Klinik für Endokrinologie, Diabetologie und Rheumatologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. A. Scherbaum

Charakterisierung und Interaktion von CD8+ T-Lymphozyten
und neutrophilen Granulozyten bei Patienten
mit ANCA assoziierter Vaskulitis

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Tim Vogl

2011

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. Schneider

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. MacKenzie

Meinen lieben Eltern,

die es mir ermöglicht haben

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG.....	1
2 Die ANCA assoziierten Vaskulitiden: Definition, Historie, Epidemiologie, Klinik, Therapie und Prognose	7
2.1 Tabelle 1: Namen und Definitionen der Chapel Hill Consensus Conference (CHCC) für systemische Vaskulitiden.....	8
2.2 Historie der Wegener'schen Granulomatose (WG) und der mikroskopischen Polyangiitis (MPA).....	9
2.3 Epidemiologie der WG und der MPA.....	10
2.4 Klinik der WG und der MPA.....	11
2.4.1Tabelle 2: klinische Kennzeichen der Wegener'schen Granulomatose	13
2.5 Therapie der WG und der MPA.....	13
2.6 Prognose der WG und der MPA.....	15
3 MATERIAL UND METHODEN.....	16
3.1 Patientenpopulation	16
3.2 FACS-Analysen.....	18
3.2.1Nachweis von CD4, CD8, CD11b, CD28 und CD57 auf Lymphozyten.....	18
3.2.2Nachweis von Interleukin-2 (IL-2) und γInterferon (γIFN) in CD8+-Lymphozyten.....	19
3.2.3Isolation von CD8+ T-Zellen und PMN und in vitro Aktivierung.....	19
3.2.4Isolierung von T-Zellen und PMN und in vitro Aktivierung.....	21
3.3 Antikörper für FACS-Analysen.....	22
3.4 Verwendete Reagenzien.....	22
3.5 Statistik	22
4 ERGEBNISSE	23
4.1 Bestimmung der CD4/CD8 Ratio der Patienten	23
4.2 Charakterisierung der CD8+ T-Lymphozyten.....	26
4.2.1Expression von CD28 auf CD8+ T-Lymphozyten	26
4.2.2Expression von CD57 auf CD8+ T-Lymphozyten	28
4.2.3Expression von CD11b auf CD8+ T-Lymphozyten.....	31
4.3 Expression von Interleukin-2 und γInterferon bei isolierten, stimulierten CD8+ T-Zellen ex vivo.....	34
4.4 Analyse von CD8+-T-Zellen während eines akuten Schubes und in Remission bzw. nach Intensivierung der immunsuppressiven Therapie.....	36
4.5 Nachweis von MHC Klasse II, CD14, CD64 und CD83 auf PMN bei Patienten mit AAV...39	
4.6 In vitro Untersuchungen zur Interaktion von γInterferon produzierenden T-Zellen und PMN.....	41
5 DISKUSSION.....	42

6 ZUSAMMENFASSUNG.....	50
7 LITERATURVERZEICHNIS.....	52
8 ANHANG.....	60
8.1 Veröffentlichungen.....	60
8.2 Tabelle 3: Abkürzungen.....	62
8.3 Tabelle 4: verwendete Antikörper.....	63
8.4 Tabelle 5: Materialliste.....	64
8.5 Tabelle 6: ELK Klassifikation.....	65
8.6 Tabelle 7: ACR-Kriterien zur Klassifikation von Vaskulitiden.....	66

1 Einleitung und Zielsetzung

Wegener'sche Granulomatose (WG) und Mikroskopische Polyangiitis (MPA) gehören zu der Gruppe der primären Vaskulitiden kleiner Gefäße (englisch: small vessel vasculitis; SVV). Durch den Nachweis von sogenannten antineutrophilen zytoplasmatischen Antikörpern (englisch: antineutrophil cytoplasmatic antibody; ANCA) werden sie mit dem Churg-Strauss-Syndrom (CSS) gemäß der Chapel Hill Consensus Conference (CHCC) als „ANCA-assoziierte Vaskulitiden“ (AAV) klassifiziert.

Die Pathogenese der AAV ist bis heute nicht ausreichend geklärt und Gegenstand aktueller Forschungen. In den letzten Jahren wurde vor allem die Rolle polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (englisch: polymorphonuclear neutrophils; PMN) bei der Krankheitsentstehung der AAV besser verstanden. Ihnen wird in zahlreichen Studien eine wesentliche Bedeutung im Entzündungsgeschehen der AAV zugeschrieben. Diese Feststellung beruht vor allem auf der Tatsache, dass bei Patienten mit aktiver WG Infiltrate mit aktivierten PMN in den betroffenen Organen (Brouwer 1994) und/oder in der peripheren Zirkulation nachweisbar sind. Diese Infiltrate gehen nach Beginn einer immunsuppressiven Therapie zurück (Haller 1996; Muller Kobold 1998). Aktivierte PMN sollen durch ihr Repertoire an zytotoxischen und proteolytischen Enzymen maßgeblich an der Entstehung von Vaskulitiden beteiligt sein.

Wie es zu der Aktivierung der PMN kommt, ist noch nicht genau geklärt. Seit Entdeckung der ANCA (Davies 1982; van der Woude 1985) wird angenommen, dass ANCA, insbesondere ANCA gegen die Zielantigene Proteinase 3 (PR3-ANCA) und Myeloperoxidase (MPO-ANCA), eine zentrale Rolle im Rahmen der Aktivierung von PMN bei Patienten mit AAV haben könnten.

Diese Annahme beruht im Wesentlichen auf den folgenden beiden Beobachtungen:

- (1) Der Nachweis von ANCA hat eine hohe Assoziation an die Erkrankungen und soll einen prädiktiven Wert für eine Aktivierung haben.
- (2) ANCA können in *in vitro* Versuchen PMN aktivieren.

Ad 1: ANCA nehmen in der Diagnostik der AAV eine zentrale Rolle ein. Für die einzelnen AAV wurde ein unterschiedliches, teils spezifisches ANCA-Muster beschrieben (van der Woude 1985; Nolle 1989). Bei Patienten mit WG sind in 95% der Fälle in der so genannten Generalisationsphase (siehe Seite 9) PR3-ANCA nachweisbar. Bei der MPA findet man in (40)-80% der Fälle MPO-ANCA (Schonermarck 2001). Mit Hilfe der Kombination von ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) und der Immunfluoreszenztechnik ist es heute möglich durch eine Bestimmung von PR3/ MPO-ANCA zusammen mit c- bzw. pANCA die WG und die MPA mit einer Sensitivität von 73% bzw. 67% und einer Spezifität von jeweils bis zu 99% zu erfassen (Hagen 1998; Choi 2001).

ANCA eignen sich nicht nur zur Diagnostik der AAV, sondern auch zum Therapiemonitoring. Einige Arbeiten zeigten eine Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität und dem ANCA-Titer. Es wurde außerdem beschrieben, dass ein Anstieg des ANCA-Titers einer Aktivierung der Erkrankung voraus gehen kann: Ein ANCA-Titeranstieg um das Vierfache des Vorwertes soll die Rezidivwahrscheinlichkeit von WG-Patienten in Remission erhöhen (Han 2003). Zusätzlich kann die Persistenz eines hohen ANCA-Titers in Remission mit einem höheren Risiko eines Rezidives vergesellschaftet sein (Kyndt 1999; Slot 2004). Allerdings konnten nicht alle Studien diese Assoziation von ANCA und der Krankheitsaktivität zeigen (Nowack 2001). Eine systematische Übersichtsarbeit hat ebenfalls (auf Grund methodischer und statistischer Schwächen vieler publizierter Studien) die Bedeutung der ANCA in Bezug auf Krankheitsaktivität und Verlaufsmonitoring in Frage gestellt (Birck 2006).

Ad 2: PMN Aktivierung durch ANCA:

In zahlreichen *in vitro*-Versuchen konnte die Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch ANCA gezeigt werden. Durch eine Vorstimulation (so genanntes „priming“) mit z.B. Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 (IL-1) exprimieren PMN unter anderem die beiden in Granula gespeicherten Zielantigene für zirkulierende ANCA Proteinase 3 (PR3) und Myeloperoxidase (MPO). Durch Antikörper gegen PR3- und/ oder MPO sollen nach Bindung an den Rezeptoren pro-inflammatorische Mediatoren und proteolytische Enzyme freigesetzt oder

Aktivitätsmarker hochreguliert werden (Falk 1990; Keogan 1992; Csernok 1994; Porges 1994; Harper 2001; Bosch 2006). Einschränkend wurden bei diesen Untersuchungen aufgereinigte IgG-Fractionen von ANCA positiven Seren oder gar heterologe Antikörper gegen PR 3 (z.B. aus der Maus oder dem Kaninchen) benutzt. Diese Versuchsanordnung reflektiert somit die Situation *in vivo* nur ungenügend; bei aufgereinigten Antikörpern, vor allem aber bei heterologen, kann die Affinität für das Antigen deutlich unterschiedlich zu der *in vivo* Situation sein.

Als Schlussfolgerung der oben genannten Arbeiten ist die so genannte „ANCA-Sequenz“-Theorie entstanden:

Im Rahmen des „priming“ der PMN, z.B. bei einem Infekt, sollen (ähnlich wie *in vitro*) die beiden Zielantigene für ANCA, PR3 und MPO, aus den Granula der PMN auf die Zelloberfläche transloziert und damit für ANCA zugänglich werden. Als Schlüsselzytokine werden hier u.a. TNF- α und IL-1 diskutiert; diese sollen neben den PMN auch das Gefäßendothel aktivieren, an welches PMN über Adhäsionsmoleküle (z.B. CD62) binden können. Binden jetzt wiederum ANCA an den voraktivierten PMN könnte es zur einer „Überaktivierung“ der PMN kommen. Verstärkt wird dieser Effekt möglicherweise durch ein „cross-link“ des Fc-Teils der ANCA an die Fc γ -Rezeptoren II (CD32) oder III (CD16) auf PMN. Für die vollständige Aktivierung von PMN scheint die gleichzeitige Bindung erforderlich (Porges 1994; Kocher 1998; Schreiber 2004). Diese Bindung soll zur Degranulation und konsekutiv zur Ausschüttung pro-inflammatorischer Mediatoren (wie Zytokine oder aktive Sauerstoffradikale) führen, die letztendlich ein Gewebstrauma induzieren könnte (Übersicht der ANCA-Sequenz-Theorie zeigt die **Abbildung 1**).

Als ein entscheidender Schritt in dieser Theorie wäre allerdings eine Bindung von ANCA an PMN *in vivo* nötig. Von diesem Schritt wird immer ausgegangen (und er ist naheliegend), da in der AAV-Diagnostik *in vitro* die Bindung von ANCA an fixierten PMN ausgezeichnet gelingt (Savige 2003). *In vivo* konnte diese Bindung von ANCA an PMN allerdings bisher nicht schlüssig gezeigt werden (Abdel-Salam 2004). Abdel-Salam konnte trotz eines hohen ANCA-Gehaltes im Serum der Patienten mit aktiver Erkrankung und einer Expression des Zielantigens (PR3) auf den PMN kein oberflächengebundenes humanes Immunglobulin G (IgG) nachweisen. Der Gehalt an oberflächlich gebundenem IgG war außerdem bei

Patienten mit AAV nicht höher, als bei gesunden Spendern. Auch isolierte und durch TNF- α aktivierte PMN zeigten keine signifikante Bindung von IgG nach Inkubation mit Plasma von Patienten mit hohen ANCA-Titern. Lediglich nach Aufreinigung der ANCA banden diese an PMN. Die Antikörper hatten allerdings eine sehr niedrige Affinität zu PMN.

Des weiteren zeigt die klinische Erfahrung, dass es Patienten gibt, bei denen trotz einer aktiven Erkrankung überhaupt keine ANCA nachgewiesen werden können, und umgekehrt gibt es zahlreiche Patienten mit hohen Antikörpertitern, die aber keine Anzeichen einer aktiven Erkrankung zeigen (Kerr 1993; Reinhold-Keller 2001). Außerdem finden sich ANCA, insbesondere MPO-ANCA, auch bei vielen Erkrankungen ohne jegliche Vaskulitis-Symptome (Gunton 2000; Schmitt 2005).

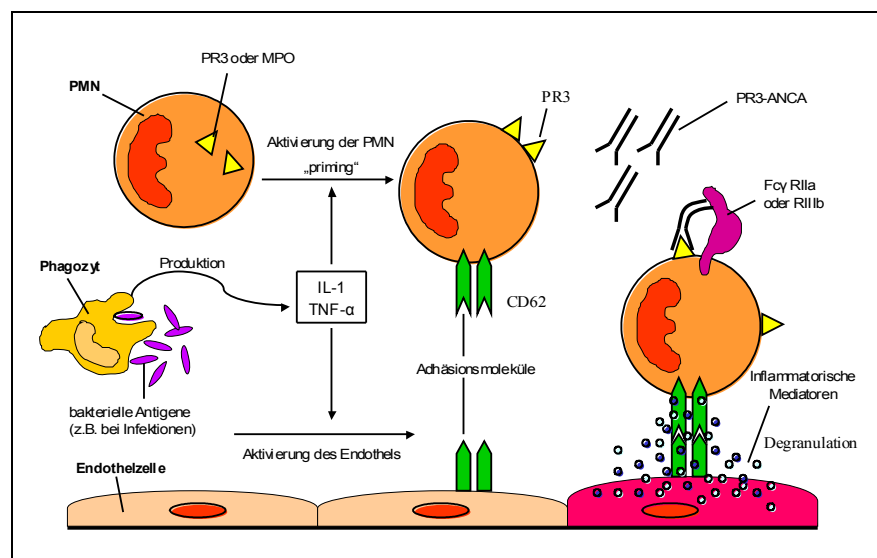


Abbildung 1: Modell der Aktivierung von PMN und ANCA induzierten Degranulation (ANCA-Sequenz-Theorie) modifiziert nach (Gross 1999; Sarraf 2005).

Zusammenfassend gehen viele Autoren von einer zentralen, pathogenetischen Bedeutung der ANCA und der Aktivierung von PMN durch die ANCA bei der Entstehung der AAV aus. Letztendlich steht der definitive Beweis für diese Theorie (z.B. durch ein schlüssiges Tiermodell) aber noch aus.

Neben den aktivierten PMN und den Autoantikörpern sollen vor allem T-Lymphozyten bei der Pathogenese der AAV eine entscheidende Rolle spielen. Die Vermutung der T-Zellbeteiligung beruht unter anderem auf der Beobachtung, dass

T-Zellen bei Patienten mit AAV in den betroffenen Organen wie der Niere akkumulieren und ihre Anzahl mit dem Gewebsschaden korreliert (Brouwer 1993; Weidner 2004). Außerdem fanden sich fundamental veränderte T-Zellpopulationen im peripheren Blut. Es konnte nachgewiesen werden, dass die T-Zellen z.B. vermehrt Aktivitätsmarker wie HLA-DR, CD25 oder CD125 exprimieren (Schlesier 1995; Giscombe 1998; Steiner 2001).

Neben diesen Beobachtungen legen Therapien gegen T-Lymphozyten mit teilweise guten Erfolgen eine Bedeutung der Zellen im Krankheitsgeschehen nahe (Schmitt 2004).

Weiterhin wurde von mehreren Arbeitsgruppen über eine erhöhte Frequenz von PR3- und MPO-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut von Patienten mit WG bzw. MPA berichtet, obwohl die Ergebnisse hierzu nicht kohärent sind (Brouwer 1994; van der Geld 2000; Popa 2002).

Bei der Interpretation von Veränderungen von T-Zell-Populationen ist es allerdings schwierig zu unterscheiden, ob die beobachteten Effekte Ursache oder Folge der Erkrankung, Folge von anderen (z.B. viralen) Infekten oder aber auch der immunsuppressiven Therapie sind. Als Ausdruck einer vorrausgegangen andauernder Aktivierung fanden sich in T-Zellen von Patienten mit WG nicht-therapieassoziierte Hinweise auf eine sogenannte „replikative Seneszenz“. Unter der „replikativen Seneszenz“ versteht man, dass jede Zelle nur eine gewisse, festgelegte Anzahl von Zellzyklen durchlaufen kann, bevor sie in einen Zustand der Alterung (der so genannten „Seneszenz“) kommt. Diese replikative Seneszenz geht mit einer Verkürzung der Telomere der DNA einher (Vogt 2003) und ist außerdem durch den Verlust von CD28, des wichtigsten co-stimulatorischen Moleküls auf T-Zellen, gekennzeichnet (Lamprecht 2001; Lamprecht 2003; Vogt 2003). Der Verlust von CD28 wurde dabei auf den CD4⁺ T-Zellen, aber vornehmlich auf den CD8⁺ Zellen beschrieben.

Ziel meiner Arbeit ist es, nach Hinweisen für eine vorangegangene und für eine aktuelle Aktivierung bzw. aktivierungsabhängigen Veränderungen im CD8⁺ Kompartiment bei AAV zu suchen. Hierfür wurde als weiterer Marker für eine „Zell-Alterung“ (Seneszenz), im Sinne der abgelaufenen oder permanenten Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen, neben dem Gehalt von CD28 auf CD8⁺-Zellen auch die Expression von CD57 untersucht. CD57, auch HNK-1 genannt, ist ein

Glykoprotein, welches auf natürlichen Killerzellen (NK) und T-Lymphozyten gefunden werden kann. Es ist Bestandteil von im Endstadium differenzierten T-Lymphozyten und zeigt eine replikative Seneszenz dieser Zellen, besonders von CD8⁺-T-Zellen, an (Brenchley 2003).

Um eine akute Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen zu zeigen, wurde der Gehalt von CD11b auf CD8 Zellen untersucht. CD11b, die α -Kette des β 2-Integrins Mac-1, ist auch bekannt als Komplement-Rezeptor 3 (CR3) und wird auf allen Leukozyten, inklusive T-Lymphozyten, expremiert. Im Zuge einer T-Zell-Aktivierung ist CD11b sowohl auf CD4⁺, als auch auf CD8⁺ T-Zellen vermehrt nachweisbar. Es ist sehr wahrscheinlich Bestandteil von Migration und Extravasation der T-Zellen aus der Blutzirkulation in das entzündete Gewebe (Wagner 2006).

Die Veränderungen wurden unter anderem mit klinischen Parametern wie der Krankheitsdauer und/ oder der Krankheitsaktivität, mit der Frage einer Assoziation zwischen den immunologischen Parametern und klinischen Verläufen, verglichen. Unter dem Aspekt der PMN-Aktivierung wollten wir ein Modell für einen alternativen Aktivierungsmechanismus für PMN vorschlagen. Da ANCA *in vivo* offensichtlich nur niedrig-affin an PMN binden können (Abdel 2003) erscheint eine Aktivierung von PMN *in vivo* durch ANCA zumindest diskutabel. Zur Beantwortung der Frage, ob es einen alternativen Aktivierungsmechanismus gibt, sollte eine mögliche Interaktion zwischen PMN und CD8⁺ T-Zellen *ex vivo* und *in vitro* untersucht werden.

2 Die ANCA assoziierten Vaskulitiden: Definition, Historie, Epidemiologie, Klinik, Therapie und Prognose

Die ANCA assoziierten Vaskulitiden (AAV) sind durch den Nachweis von antineutrophilen zytoplasmatischen Antikörpern (ANCA) charakterisiert. Zu den AAV werden gemäß der Chapel Hill Consensus Konferenz (CHCC) von 1992 die Wegener'sche Granulomatose (WG), die mikroskopische Polyangiitis (MPA) und das Churg Strauss Syndrom (CSS) klassifiziert. Diese drei primär systemischen Vaskulitiden befallen hauptsächlich kleine Gefäße, wie Arterien, Arteriolen, Kapillaren und Venolen und werden deshalb auch als „Klein-Gefäß-Vaskulitiden“ (engl: small vessel vasculitides; SVV) bezeichnet. Da histologisch in den betroffenen Geweben gar keine oder nur geringe Immunkomplexablagerungen zu finden sind, werden diese drei Krankheitsbilder von Seiten der Pathologen auch als „pauci-immun“ titulierte (Jennette 1994).

2.1 Tabelle 1: Namen und Definitionen der Chapel Hill Consensus Conference (CHCC) für systemische Vaskulitiden

Name	CHCC-Definition	Typische klinische Symptome	ANCA-Häufigkeit	ANCA-Spezifität
Wegener'sche Granulomatose (WG)	Granulomatöse Entzündung des Respirationstrakts und nekrotisierende Vaskulitis kleiner/ mittlerer Gefäße, z.B. Kapillaren Venolen, Arteriolen und Arterien. Häufig nekrotisierende Glomerulonephritis	„Kopf-Klinik“ (z.B. chronische Sinusitis) =lokalisierte WG Pulmorenales Syndrom	Lokalisierte WG: ≤50% Generalisierte WG: 95%	PR3-ANCA: 95% MPO-ANCA: 5%
Mikroskopische Polyangiitis (MPA)	Nekrotisierende Vaskulitis mit wenigen/ keinen Immunkomplexablagerungen in kleinen Gefäßen, d.h. Kapillaren, Venolen, Arteriolen Nekrotisierende Arteriitis kleiner bis mittelgroßer Arterien kann vorkommen. Häufig nekrotisierende Glomerulonephritis, ebenso pulmonale Kapillaritis	Pulmorenales Syndrom	(40)-80%	MPO-ANCA: 95% PR3-ANCA: 5%
Churg Strauss Syndrom (CSS)	Eosinophile und granulomatöse Entzündung des Respirationstraktes und nekrotisierende Vaskulitis kleiner und mittlerer Gefäße, assoziiert mit Asthma und Bluteosinophilie	Pulmonale Infiltrate, Eosinophilie, Polyneuropathie, kardiale Beteiligung	10-70%	PR3-ANCA: 30% MPO ANCA: 0% ANCA-negativ 30%

(Jennette 1994)

2.2 Historie der Wegener'schen Granulomatose (WG) und der mikroskopischen Polyangiitis (MPA)

Als Erstbeschreiber der WG gilt der Medizinstudent Heinz Klinger, der 1931 eine Arbeit veröffentlichte, in der er über zwei Patienten berichtete, die an einer, wie er sagte, „unüblichen Panarteriitis nodosa“ litten. Er beschrieb als Erster die typischen Symptome der WG mit Lungenbeteiligung, nekrotischer Vaskulitis und Glomerulonephritis. Außerdem hatte einer seiner Patienten die für die WG so typischen Entzündungen des oberen Respirationstraktes (Klinger 1931).

Im Jahre 1939 berichtete der junge Pathologe Frederick Wegener ebenfalls von drei Patienten mit ähnlichen Symptomen. Wegener schrieb: „Über eine eigenartige rhinogene Granulomatose mit besonderer Beteiligung des Arteriensystems und der Nieren“. Seine Aufzeichnungen und Beobachtungen führten zu der Bezeichnung Wegener'sche Granulomatose (Wegener 1939).

In Amerika wurde die Krankheit erst in den Fünfziger Jahren bekannt als die beiden Ärzte Godman und Churg sich intensiv mit der WG beschäftigten und aus der bis dahin hauptsächlich europäischen Literatur eine detaillierte Übersichtsarbeit zur WG verfassten (Godman 1954). Die Mitarbeiter des National Institute of Health (NIH) Fauci und Wolff verfassten 1974 aufgrund empirischer Daten eine umfassende Arbeit über Symptome, Verlauf und Therapie der WG und veröffentlichten damit erstmals ein Behandlungsschema, das durch die Kombination von Glukokortikoiden und Cyclophosphamid Erfolge in der Behandlung der WG zeigte (Fauci 1974). Eine weitere, umfangreichere Studie von Hoffmann und Fauci et al. mit 158 Patienten bestätigte im wesentlichen die Erkenntnisse über die Therapieerfolge der konsequenten Immunsuppression (Hoffman 1992). Das hier entstandene Fauci-Schema zur initialen Behandlung einer aktiven WG-Manifestation hat auch heute noch Bestand.

Als Davies et al. 1982 die antineutrophilen cytoplasmatischen Antikörper (ANCA) beschrieb, begann ein neues Kapitel der Forschung über Vaskulitiden (Davies 1982). Van der Woude et al. führte 1985 die ANCA als diagnostischen Marker der WG ein und vermutete eine Beziehung zwischen Krankheitsaktivität und ANCA (van der Woude 1985). Heute haben sich die ANCA als wesentlicher Bestandteil

in der Diagnostik der AAV etabliert. Die Frage der pathogenetischen Bedeutung der ANCA ist noch nicht ausreichend geklärt.

Die mikroskopische Polyangiitis (MPA) hingegen ist erst 1992 im Rahmen der Chapel Hill Consensus Conference als eigenständige Vaskulitiserkrankung definiert worden. Früher wurde die MPA als mikroskopische Polyarteriitis bezeichnet und wurde als Sonderform der 1866 von Kussmaul und Maier beschriebenen Polyarteriitis nodosa (Kussmaul 1866) von Wohlwill 1923 abgegrenzt (Wohlwill 1923). Wohlwill erkannte den Befall von kleinsten Gefäßen, im Sinne einer Glomerulonephritis, die die mikroskopische Polyarteriitis von der Polyarteriitis nodosa, die klassischerweise nie kleine Gefäße befällt, abgrenzte. Da die MPA neben den Arteriolen auch kleine Venen, Venolen und Kapillaren befällt, wurde in den CHCC-Definitionen der allgemeinere Name Angiitis gewählt, anstatt der zuvor bezeichneten Arteriitis.

2.3 Epidemiologie der WG und der MPA

Die WG kann in jedem Alter auftreten. Allerdings sind nur 15% der Patienten jünger als 19 Jahre alt. Das Hauptmanifestationsalter der Patienten liegt bei 40–50 Jahren (Hoffman 1992; Reinhold-Keller 2000). Männer und Frauen sind etwa zu gleichen Teilen betroffen. Kaukasier werden unter den Erkrankten am häufigsten gezählt (Hoffman 1992).

Die Inzidenz schwankt zwischen den einzelnen Erdteilen. Beispielhaft liegt die Inzidenz in den USA bei ca. 8,5 pro 1 Million Einwohner, in England bei 19,8 pro 1 Million und in Deutschland bei 10 pro 1 Millionen Einwohner (Carruthers 1996).

Die Prävalenz der WG liegt in Europa bei ca. 40-60 pro 1 Million (Reinhold-Keller 1996; Watts 2000).

Die MPA ist wesentlich seltener als die WG und hat eine Inzidenz von 1-3 pro 1 Million Einwohner in Deutschland (Reinhold-Keller 2002). Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen und das Manifestationsalter der MPA liegt im Durchschnitt um das 50. Lebensjahr (Lhote 1996).

2.4 Klinik der WG und der MPA

Klinisch sind die WG und die MPA oft nur schwer voneinander zu unterscheiden und besonders im Anfangsstadium kann eine sichere Zuordnung unmöglich sein. Allgemeine Symptome wie Fieber, Schwäche- und Müdigkeitsgefühl oder Gewichtsabnahme (B-Symptomatik) gehen oft den vaskulitistypischen Symptomen voraus und können bei beiden Erkrankungen auftreten. Es gibt aber einige klinische Merkmale, die bei einer Differenzierung zwischen WG und MPA hilfreich sind.

Die WG ist durch die klassische Trias aus HNO-Beteiligung, Lungenmanifestation und Nierenbeteiligung geprägt. Typischerweise zeigt sie einen zweiphasigen Verlauf. Im lokal begrenzten Initialstadium der Erkrankung treten vornehmlich granulomatöse Entzündungen des HNO- und des Respirationstraktes auf, welche die Patienten in ärztliche Betreuung führen. Die Patienten klagen über Sinusitiden und/oder blutigen Schnupfen mit Schleimhautulzerationen der Nase, die bis zu einer Septumperforation führen können. Knorpeldestruktionen der Nase können zu der für die WG typischen Sattelnasendeformation führen. Charakteristisch sind auch rezidivierende Entzündungen des Ohres und des Auges. Diese Symptomkonstellation wird nicht selten mit chronischen Infekten oder grippeähnlichen Erkrankungen verwechselt, ist oft therapieresistent und rezidivierend. In der Klinik wird dieser Komplex als die so genannte „Kopf-Klinik“ bezeichnet.

Im weiteren Krankheitsverlauf kann es zu einer Generalisation mit schweren systemischen Beteiligungen kommen. Hier ist eine klinische Manifestation an fast allen Organen möglich. Es kann zu schwerer Lungenbeteiligung, Gelenkbeteiligung, Erkrankung des Nervensystems und/ oder Hautbeteiligung kommen. Die Erkrankung der Niere kann von einer blanden fokalen Glomerulonephritis bis zu einer rapid-progressiven Glomerulonephritis mit rasch fortschreitender Niereninsuffizienz und lebensbedrohlichen Verläufen reichen (**Tabelle 2**, (Hoffman 1992)).

Die MPA hingegen zeigt im Anfangsstadium zusätzlich zu der oben beschriebenen B-Symptomatik häufig rheumatische Beschwerden wie Myalgien und Arthralgien

bzw. Arthritiden. Die für die WG so typische Kopfklinik, tritt bei der MPA so gut wie nicht auf und ist andernfalls nicht auf eine granulomatöse Entzündung zurückzuführen, sondern Folge einer vaskulitischen Läsion ohne Granulombildung.

Die MPA zeigt in ihrem Krankheitsverlauf eine höhere Frequenz der Nierenbeteiligung (>90%), die sich auch öfter als rapid progressive Glomerulonephritis manifestiert. Häufiger ist bei der MPA ebenfalls eine Lungenbeteiligung in Form von pulmonalen Hämorrhagien zu finden (12-29%). Man spricht bei gleichzeitigem Auftreten dieser beiden Leitsymptome von einem „pulmo-renalen Syndrom“. Ein weiterer Unterschied ist das vielfache Auftreten von gastrointestinalen Beschwerden, wie abdominelle Schmerzen, Blutungen und eventuelle Aneurysmenbildung der Viszeralarterien (Savage 1985; Lhote 1996; Guillevin 1999). Die Differentialdiagnose ist lediglich anhand klinischer Erscheinungsformen äußerst schwierig. Deshalb bedarf es weiterer Diagnostik, insbesondere ANCA-Serologie und Histologie zur Abklärung und Bestätigung der Verdachtsdiagnose.

2.4.1 Tabelle 2: klinische Kennzeichen der Wegener'schen Granulomatose

Organ (prozentuale Beteiligung)	Symptome und Zeichen
Lungen, Pleura (85%)	Einzelne oder multiple Knoten, Kavernen, Infiltrate, Atelektase, Kollaps, alveoläre Hämorrhagie, Pleuraerguss, entzündlicher Pseudotumor
Niere (77%)	Proteinurie, mikroskopische Hämaturie, fokale segmentale nekrotisierende Glomerulonephritis, Niereninsuffizienz, Nierenversagen
Nase (60-80%)	Epistaxis, Krustenbildung, Chondritis, Septumperforation, Sattelnasendeformität
Sinus (60-80%)	Muköse Schleimbildung, Pansinusitis, Knochenzerstörung
Ohr (60%)	Seröse Otitis, sensorische Taubheit, Mastoiditis
Trachea, Bronchien (60%)	Subglottische Stenose, muköse Ulzerationen, entzündlicher Pseudotumor, Bronchomalazie, Dyspnoe, Stridor
Haut (50%)	Urtikaria, Papeln, Vesikel, Erytheme, Petechien, Pyoderma gangrenosum, palpable Purpura
Auge (40-70%)	Konjunktivitis, Episkleritis, korneosklerale Ulzerationen, Uveitis, retinale Vaskulitis, Ophthalmoplegie, Zentralarterienverschluss, orbitaler Pseudotumor, Dakryozystitis, Tränengangsstenose
ZNS (33%)	Mononeuropathie, Hirnnervenlähmung, periphere Neuropathie, Apoplex, transversale Myelitis
Gelenke (30%)	Arthralgien, symmetrische Polyarthritis kleiner und großer Gelenke
Mundhöhle (30%)	Kieferschmerzen, hyperplastische Gingivitis, Ulzerationen
Gastrointestinaltrakt (<10%)	Erosive Ösophagitis, Darmperforation, Kolitis

(Specks 1998)

2.5 Therapie der WG und der MPA

Die Therapien der WG und der MPA ähneln sich in ihren Grundzügen. Ansatzpunkt ist bei beiden der Versuch das Entzündungsgeschehen durch eine Immunsuppression zu unterdrücken und damit Folgeschäden zu verhindern. Die Therapien sind individuell dem Krankheitsbild der Patienten anzupassen und von der Schwere der Erkrankung, der Verträglichkeit der Medikamente, dem Alter und der Komorbidität abhängig.

Es werden verschiedene Therapieziele verfolgt: Remissionsinduktion, Remissionserhaltung und die Behandlung therapierefraktärer Verläufe.

Die aktuelle Standardtherapie sowohl der WG als auch der MPA zur Remissionsinduktion (Fauci-Schema), sieht bei Diagnose der Erkrankung eine Kombination von hochdosierten Glukokortikoiden und Cyclophosphamid vor (Fauci 1983). Durch diese Therapie kann bei >80% der Patienten eine Remission erreicht werden (Langfort 2001). Das Problem ist aber, dass Cyclophosphamid eine Reihe von Risiken in sich birgt (z.B. hämorrhagische Zystitis, myelodysplastisches Syndrom). Somit ist eine langzeitige Therapie immer mit der Gefahr von therapiebedingten Komplikationen verbunden (Hoffman 1992). 50-70% der Erkrankten erleiden innerhalb von 5 Jahren nach Absetzen der Therapie ein Rezidiv nach erfolgreicher Remissionsinduktion (Langfort 2003).

Bei nicht lebensbedrohlichen oder lokalisierten Verlaufsformen und besonders zur Remissionserhaltung besteht die Möglichkeit weniger toxische Medikamente einzusetzen. Azathioprin ist zurzeit das Mittel der ersten Wahl nach erfolgreicher Remissionsinduktion zur Remissionserhaltung. Die CYCAZAREM-Studie hat gezeigt, dass es ähnlich effektiv ist wie Cyclophosphamid, aber deutlich weniger Langzeitnebenwirkungen besitzt (Jayne 2003). Auch Methotrexat (MTX) ist bei limitierter, nicht lebensbedrohender Verlaufsform ein Alternativpräparat zu Cyclophosphamid und weist eine hohe Remissionsrate auf; es ist ebenfalls zur Remissionserhaltung erfolgreich einsetzbar (Specks 2005). Offene Studien geben Anhalt dafür, dass auch Leflunomid und Mycophenolat Mofetil therapeutisches Potential zur Remissionserhaltung bei Patienten in partieller oder kompletter Remission besitzen (Metzler 2004; Joy 2005).

Zur Behandlung therapierefraktärer Verläufe wurden zahlreiche Medikamente und Therapieoptionen untersucht. So konnte in kleineren Studien aufgezeigt werden, dass TNF α -Antagonisten (Infliximab, Remicade®) und Anti-CD20-Antikörper (Rituximab, Mabthera®) wirksam sind (Lamprecht 2002; Keogh 2006). Für die Plasmapherese, die bei fulminanter, lebensbedrohender Krankheit mit schwerer renaler Beteiligung eingesetzt wird, gibt es positive Erfahrungen aus kontrollierten, prospektiven Studien (Jayne 2006). Eine Anzahl von retrospektiver Untersuchungen zeigt, dass die Plasmapherese die Nierenfunktion und pulmonale Hämorrhagien verbessert (Klemmer 2003; Rahman 2006).

2.6 Prognose der WG und der MPA

Die WG verläuft in unbehandelten, generalisierten Fällen letal. Die mittlere Überlebensdauer lag früher bei gerade einmal 5 Monaten, wobei ein Großteil der Patienten an einer Niereninsuffizienz verstorben ist (Hoffman 1994).

Der Verlauf der Erkrankung hat sich allerdings seit Wegener's Erstbeschreibung 1939 durch Fortschritte in Diagnose und Therapie von einer damals tödlich zu einer heute chronisch verlaufenden Krankheit mit häufigen Rezidiven entwickelt. Fauci führte 1983 die Standardtherapie mit Cyclophosphamid und Prednison ein und veränderte damit grundlegend den fatalen Krankheitsverlauf.

Zwei Patientenkollektive mit jeweils über 150 Patienten zeigten Überlebensraten von über 80% nach 6-8 Jahren (Reinhold-Keller 2002).

Die Fünfjahres-Überlebensrate der MPA liegt heute bei ca. 75%, jedoch hinterlässt die Erkrankung in vielen Fällen irreparable Schäden an Nieren und Lunge. Eine besonders schlechte Prognose haben diejenigen Patienten, die zu Beginn der Diagnosestellung eine hohe Krankheitsaktivität zeigen und bereits initial eine Nieren- oder Lungenbeteiligung vorweisen (Brijker 1999). Das Risiko ein Rezidiv zu erleiden ist allerdings bei der MPA oder bei MPO-ANCA assoziierten Vaskulitiden niedriger als bei der WG bzw. bei PR3-ANCA assoziierten Vaskulitiden (Westmann 1998).

3 Material und Methoden

3.1 Patientenpopulation

Die Studie ist von den Ethikkommissionen der Universitäten Düsseldorf und der Universität Heidelberg genehmigt worden. Nach Aufklärung und schriftlicher Zustimmung über die Studie wurden 90 Patienten mit WG oder MPA der Abteilung für Rheumatologie der Universität Düsseldorf und der nephrologischen Abteilung der Universität Heidelberg rekrutiert. Alle Patienten erfüllten die Klassifikationskriterien für die Diagnose der WG und/ oder der MPA nach der Chapel Hill Consensus Conference und den ACR Kriterien (nur WG, siehe Anhang Tabelle 7). Die Aktivität der Erkrankung wurde mit dem Birmingham vasculitis activity score (BVAS, (Luqmani 1994) bestimmt. 10 Patienten hatten eine aktive Erkrankung (BVAS >5; WG n=5; MPA n=5), 80 waren im Stadium der Remission (BVAS <1; WG n=47; MPA n=33).

Bei 30 Patienten wurden Verlaufsmessungen nach 6–26 Monaten durchgeführt. Dabei wurden Patienten retrospektiv in zwei Gruppen mit 1. stabiler Erkrankung (inaktiv, n = 24) oder mit 2. einer so genannten „smoldering disease“ (dass heißt chronisch aktiv im Sinne des erhöhten BVAS, n = 6) untersucht.

46 Patienten waren weiblich und 38 männlich. Bei 6 Patienten waren die Daten im Nachhinein nicht mehr eruierbar. Das Alter der Patienten reichte von 27 bis 85 Jahren, der Altersdurchschnitt (Mittelwert) lag bei 58,8 Jahren (+/-).

Für den Vergleich zwischen den klinischen Parametern und den Messergebnissen, wurden einzelne Patientengruppen definiert.

1. Einteilung nach der ELK-Klassifikation: Die Population wurde nach Schweregrad der Erkrankung anhand der ELK-Klassifikation (siehe Anhang Tabelle 6) in 5 Gruppen unterteilt. Jeder Patient wurde entsprechend seiner Anzahl der betroffenen Organe eingruppiert (z.B. 1 betroffenes Organ = ELK 1, 2 Organe = ELK 2 usw.). Patienten mit mehr als 5 betroffenen Organen gehören der Gruppe ELK 5 an.

2. Einteilung nach dem Krankheitsverlauf: Die Population wurde in 3 Gruppen unterteilt, die sich nach der Schwere der Erkrankung unterschieden. Die Gruppe 1 (S 0) enthielt die „leichten“ Patienten mit maximal einem Ereignis und einer Remission für mindestens 5 Jahre (n=7); die Gruppe 2 (S 1) enthielt alle „schwereren“ Patienten, d.h. Patienten mit einem limitierten Verlauf (wie Kopfklinik) ohne systemische Beteiligung, mit einem einmaligen Krankheitsschub ohne Rezidiv (so genannte „one shot disease“) oder einem Krankheitsverlauf mit maximal einem Rezidiv innerhalb der letzten 5 Jahre (n=12). Die Gruppe 3 (S 2) enthielt diejenigen Patienten mit einem „schweren“ Verlauf, die zwei und mehr Rezidive hatten und an einer Organbeteiligung (siehe unten) litten (n=18)
3. Einteilung renale Beteiligung oder keine renale Beteiligung: Die 1. Gruppe enthielt diejenigen Patienten die keine Beteiligung der Niere hatten und die 2. Gruppe diejenigen, bei denen die Niere befallen war.
4. Einteilung nach systemischer Erkrankung/ nicht-systemischer Erkrankung: Die 1. Gruppe enthielt die Patienten, bei denen eine systemische Erkrankung vorlag, das heißt Beteiligung der Niere, Lunge oder des ZNS. Die 2. Gruppe enthielt die Patienten, die nicht-systemisch erkrankt waren, also einen limitierten Verlauf (z.B. Kopfklinik, Haut oder Gelenke) besaßen.
5. Einteilung nach der Krankheitsdauer: Es wurden zwei Gruppen erstellt, die sich in der Erkrankungsdauer unterschieden. Eine Gruppe enthielt die Patienten, die >5 Jahre erkrankt waren, eine Gruppe Patienten, die <5 Jahre erkrankt waren.
6. Einteilung nach kumulativer Cyclophosphamiddosis: Eine weitere Einteilung fand in Bezug auf die kumulative Cyclophosphamid-Menge, die die Patienten im Verlauf ihrer Erkrankung erhalten haben, statt. Die kumulative Cyclophosphamiddosis wurde in folgender Weise abgeschätzt: Bei intravenöser Cyc-Therapie wurde von einer monatlichen Gesamtmenge von etwa 1g ausgegangen (Standarddosis von 20mg/kg/Körpergewicht), dies wurde auf die Gesamtdauer der Therapie hochgerechnet. Bei oraler Gabe, wurde bezogen auf die Standarddosis von 1–2 mg/kg/KG/ Tag von der 3fachen Menge (3g) pro Monat ausgegangen. Nach dieser Berechnung wurden 3 Gruppen gebildet:

Gruppe 1 mit einer kumulative Cyclophosphamid-Dosis von <10g (niedrige Dosis), Gruppe 2 zwischen 10-50g (mittlere Dosis) und Gruppe 3 mit >50g Cyclophosphamid (hohe Dosis).

3.2 FACS-Analysen

3.2.1 Nachweis von CD4, CD8, CD11b, CD28 und CD57 auf Lymphozyten

Bei 47 Patienten mit WG und 33 mit MPA in Remission und bei 10 Patienten mit aktiver Erkrankung (WG n=5; MPA n=5) wurde die Expression von CD4, CD8, CD11b, CD28 und CD57 auf T-Zellen mittels FACS-Analyse gemessen.

Für die Messung wurde den Patienten venöses Vollblut in Natrium-Heparin Lösung (BecktonDickinson, Heidelberg) abgenommen. Jeweils 50µl Blut wurden mit den entsprechenden Antikörpern wie folgt inkubiert.

1.	2 µl Simultest Control γ1/γ2a	2µl Mouse IgG1PerCP	Negativkontrolle
2.	2 µl Simultest Control γ1/γ2a	5µl CD8 PerCP	
3.	5µl FastImmune γ1/ γ1/CD3		
4.	5µl CD11b FITC	5µl CD28 PE	5µl CD8 PerCP
5.	5µl CD57 FITC	5µl CD28 PE	5µl CD8 PerCP
6.	2µl CD4 FITC	2µl CD8 PE	

Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln, wurden die Zellen mit 2ml FACS Lysing Solution (10 Minuten; 1:10 Verdünnung mit Aqua dest.) lysiert. Nach 2maligen Waschen mit 3ml Cellwash erfolgte die Fixierung mit 400µl Cytotfix® (1:4 verdünnt in FACS-Puffer (PBS ,1% BSA, 0,1% NaN₃)).

Die gefärbten Zellen wurden in einem FACS-Sort® mit CellCept 3.3® als Software (beides BecktonDickinson) gemessen und analysiert.

3.2.2 Nachweis von Interleukin-2 (IL-2) und γ Interferon (γ IFN) in CD8+-Lymphozyten

Bei 3 Patienten wurde der Gehalt an IL-2 und γ IFN in T-Zellen im Vollblut mittels FACS gemessen. Zur Akkumulation der Zytokine in der Zelle wurde 1ml Vollblut (EDTA) mit 1ml RPMI 1640 und 8 μ l Brefeldin A für 12-18h inkubiert.

Jeweils 100 μ l Blutes wurden mit folgenden Antikörpermischungen 25 Minuten inkubiert.

1.	5 μ l Simultest Control γ 1/ γ 2a	Negativkontrolle
2.	5 μ l Simultest Control γ 1/ γ 2a	5 μ l CD28 PE
3.	-	5 μ l CD28 PE
4.	-	5 μ l CD28 PE

Anschließend wurden die Zellen mit FACS Lysing Solution® (10 Minuten; 1:10 Verdünnung mit Aqua dest.) lysiert. Zur Permeabilisierung wurden 500 μ l Permeabilizing Solution 2® (1:10) hinzugegeben und 10 Minuten inkubiert. Es folgte die Waschung mit 3ml FACS-Puffer und die Zugabe der intrazellulären Antikörper:

3.	20 μ l IL-2 FITC
4.	20 μ l γ IFN FITC

Nach 30 Minuten Inkubationszeit wurden die Zellen mit 3ml FACS Puffer gewaschen und anschließend mit 500 μ l Cytofix® (1:4 mit FACS-Puffer) fixiert. Die gefärbten Zellen wurden in einem FACS-Sort® mit CellCept 3.3® als Software (beides BecktonDickinson) gemessen und analysiert.

3.2.3 Isolation von CD8+ T-Zellen und PMN und *in vitro* Aktivierung

Für die Messung wurde den Patienten Vollblut in Natrium-Heparin Lösung (BecktonDickinson, Heidelberg) abgenommen. Die Isolierung erfolgte steril.

15ml Blut wurde mit 15ml MACS-Puffer (500ml PBS + 2,5g BSA + 0,3722g EDTA) verdünnt. 15ml Lymphoprep® wurden in ein 50ml Falcon Röhrchen gegeben und

mit 30ml Blut überschichtet. Es wurde 20 Minuten bei 800g ohne Bremse zentrifugiert, der zentrifugierte Lymphozytenring mit einer Pipette abgenommen und in ein weiteres 50ml Falcon Röhrchen gegeben. Dieses wurde mit MACS-Puffer auf 40ml aufgefüllt und erneut 10 Minuten 300g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Es folgte die Resuspension des Pellet mit 40ml MACS-Puffer. Die Zellen und Lösungen wurden kühl gehalten (8°C). Der Zellzahl entsprechend erfolgte die Zugabe der Antikörper. Die Zellen wurden gezählt und nach Zellzahl entsprechend weiterbehandelt. Die im Folgenden angegebenen Mengen entsprechen einer Zellzahl von bis zu 10^7 Zellen. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 300g und 8°C wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet mit 80µl MACS-Puffer resuspendiert.

Der Lösung wurden 20µl CD8 MicroBeads® zugegeben und 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 3ml MACS-Puffer gewaschen (Zentrifuge 300g, 10 Minuten), der Überstand abpipettiert und das Pellet mit 500µl Puffer resuspendiert.

Im Folgenden isolierte man die CD8-Lymphozyten mit magnetischer anti-CD8 Zell Separation (autoMACS; dies erfolgte nach Angaben des Herstellers Miltenyi Biotech).

Im nächsten Arbeitsschritt folgte die Stimulation der isolierten Zellen mit 4µl BFA, 5µl PMA und 4µl Ionomycin 4h im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) mit anschließender Färbung. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Es folgte ein Waschschritt mit FACS-Puffer. Das Pellet wurde in 400ml FACS-Puffer aufgenommen und auf 4 FACS-Röhrchen verteilt. Anschließend fixierte und permeabilisierte man die Zellen mit Fix & Perm Lösung (Becton Dickinson) nach Herstelleranleitung. Dieser Arbeitsschritt schloss die Zugabe folgender Antikörper ein:

1.	5 µl Simultest Control γ1/γ2a	Negativkontrolle
2.	5 µl Simultest Control γ1/γ2a	5µl CD28 PE
3.	20µl IL-2 FITC	5µl CD28 PE
4.	20µl γIFN FITC	5µl CD28 PE

Die Suspensionen wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, 2malig mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend mit 400µl Cytofix (1:4 mit FACS-Puffer) fixiert. Die gefärbten Zellen konnten jetzt in einem FACS-Sort[®] mit CellCept 3.3[®] als Software (beides BecktonDickinson) gemessen und analysiert werden.

Die Isolierung der PMN erfolgte analog zu der Isolierung der T-Zellen. PMN konnten nach Behandlung des Vollblutes mit Polymorphprep[®] nach Angaben des Herstellers separiert und weiter durch MACS Technik (s.o.) mit anti-CD15 Microbeads[®] isoliert werden.

3.2.4 Isolierung von T-Zellen und PMN und *in vitro* Aktivierung

Vollblut wurde mit Polymorphprep[®] (Nycomed, Norway) nach Angaben des Herstellers zentrifugiert. Aus der PMN-Schicht wurden die Zellen mit magnetischer Zell-Separation (autoMACS) nach Angaben des Herstellers (Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Germany) isoliert.

CD8⁺ Zellen wurden durch Adsorption durch „anti-CD8 magnetic beads“ isoliert. Für die Aktivierung der CD11b Expression wurden die CD8⁺ Zellen in RPMI (10%ig mit fötalem Kalbsserum (2x10⁶/ml)) resuspendiert. Die Aktivierung der Zellen erfolgte durch PMA (20ng/ml) in Kombination mit Ionomycin (1 µg/ml) für 48h. Die Expression von CD11b und CD28 wurde mittel FACS gemessen. Überstände dieser T-Zellen wurden nach Beginn der Stimulation für 24h und 48h kultiviert. Für die Aktivierung der PMN wurden 200µl der kultivierten Überstände den PMN (2x10⁶/800µl) für 24h und 48h beigegeben. Für die Ko-Kultivierung wurden die aktivierten T-Zellen (2x10⁶/ml) zusammen mit den PMN (2x10⁶/ml) erneut für 24h und 48h inkubiert. Für die Stimulation wurden 1 bis 5µg an Antikörpern (anti-PR3 oder IgG) verwendet.

3.3 Antikörper für FACS-Analysen

Eine Auflistung der verwendeten Antikörper zeigt Tabelle 4 im Anhang (Seite 63).

3.4 Verwendete Reagenzien

Eine Übersicht über die verwendeten Reagenzien zeigt Tabelle 5 im Anhang (Seite 64).

3.5 Statistik

Unterschiede und Signifikanzen wurden durch den Varianztest ANOVA und den Bonferroni-Test mit einem Signifikanzniveau von $p=0,05$ kalkuliert.

Die Koinzidenz des CD4/CD8 Ratio und des Gehalts an CD11b, CD28 und CD57 auf T-Zellen wurde mit dem Chi square Test ermittelt. Der Grenzwert für einen erniedrigten CD4/CD8 Ratio wurde bei $<1,5$ festgesetzt (Mittelwert von gesunden Spendern). Der Grenzwert für die anderen Parameter wurde entsprechend den Mittelwerten ± 1 SD der gesunden Probanden gesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Bestimmung der CD4/CD8 Ratio der Patienten

Die CD4/CD8 Ratio wird bestimmt um Veränderungen in der T-Zell Population abzubilden, die durch Verschiebung des Verhältnisses von CD4+ zu CD8+ Zellen zu Stande kommt (z.B. bei Aktivierung und Proliferation oder aber Persistenz einer oder mehrerer spezifischer T-Zellen).

Es zeigt sich bei Patienten mit WG und MPA eine signifikante Verschiebung der CD4/CD8 Ratio. Die CD4/CD8 Ratio liegt bei der Mehrzahl der Patienten in Remission (58 von 80) unter 1,5 (Normalwert für gesunde Spender: 1,5-2,5; siehe **Abbildung 2**). Der Median bei den Patienten liegt bei 1,0, bei den gesunden Probanden bei 2,05 (n=50). Der Mittelwert ist signifikant unterschiedlich und liegt bei den Patienten bei $1,12 \pm 0,56$ gegenüber $1,81 \pm 0,44$ bei den gesunden Probanden ($p < 0,05$, mit ANOVA und Bonferroni Test).

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der CD4/CD8 Ratio zwischen den Patienten mit WG und MPA (WG (n=43): Median 1,13; Mittelwert $1,2 \pm 0,7$; MPA (n=39): Median 1,16; Mittelwert $1,33 \pm 0,5$, $p > 0,05$).

Die CD4/CD8 Ratio wurde mit klinischen Parametern korreliert (s. Seite 16/17). Es zeigt sich ein Trend, dass Patienten mit einer langandauernden Erkrankung >5 Jahre und einem schwereren Krankheitsverlauf mit mehreren Rezidiven eine niedrigere CD4/CD8 Ratio haben, als Patienten mit kurzer Erkrankung ($<5a$) und einer limitierten Verlaufsform. Zwischen systemischer versus limitierter oder auch renal versus nicht-renal Erkrankung zeigt sich kein Unterschied in der CD4/CD8 Ratio (Daten nicht gezeigt).

Bei 30 Patienten wurden Verlaufsmessungen der CD4/CD8 Ratio nach 6–26 Monaten durchgeführt. Hier zeigt sich, dass bei Patienten mit einem stabilen, gut kontrollierten Krankheitsverlauf die CD4/CD8 Ratio stabil bleibt oder sich das Verhältnis wieder in Richtung CD4 verschiebt. Bei 6 Patienten mit einem chronisch-progressiven Verlauf (so genannte „smoldering disease“) sieht man im Verlauf ihrer Erkrankung eine weitere Erniedrigung der CD4/CD8 Ratio (**Abbildung 3**).

Außerdem haben wir bei unseren Patienten die Absolutzahlen von CD4 und CD8 bestimmt. Hier zeigt sich, dass die Anzahl der CD4+ T-Zellen verringert ($64 - 392/\mu\text{l}$, Mittelwert $\pm$ SD 187 ± 95 ; Normalwert $320 - 1473/\mu\text{l}$; $n=10$), die Zahl der CD8+ T-Zellen hingegen gleich bleibt oder erhöht ist.

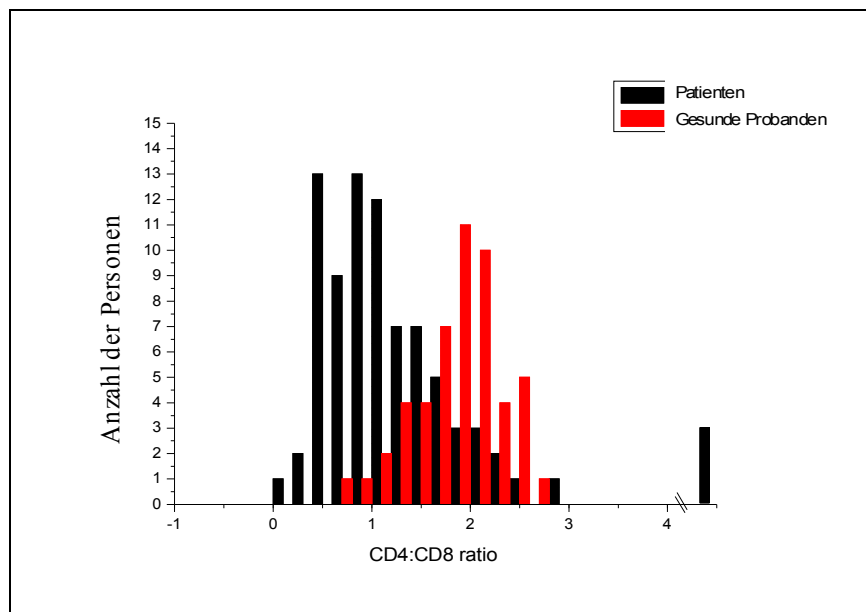


Abbildung 2: CD4/CD8 Ratio von Patienten mit WG oder MPA im Vergleich zu alters-gleichen Probanden; die Daten sind als Histogramm gezeigt, wobei die y-Achse die Anzahl der Individuen (Patienten schwarz, gesunde Probanden rot) darstellt und die x-Achse die CD4/CD8 Ratio. Drei Patienten haben eine CD4/CD8 Ratio größer als 3 (4,9; 6 und 6,09).

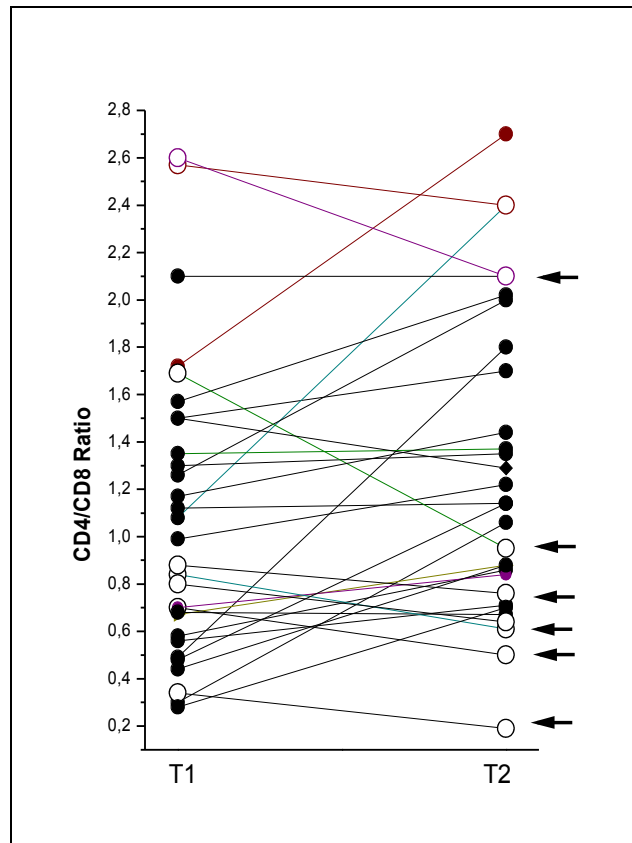


Abbildung 3: Das Diagramm zeigt die Verlaufsmessungen der CD4/CD8 Ratio (y-Achse) von 30 Patienten vom Zeitpunkt T1 bis zum Zeitpunkt T2 (Intervall von 6-24 Monaten). Die 6 Pfeile markieren die Patienten mit einem chronisch-progressiven Verlauf. Bei diesen Patienten findet sich eine weitere Erniedrigung der CD4/CD8 Ratio im Krankheitsverlauf.

4.2 Charakterisierung der CD8+ T-Lymphozyten

4.2.1 Expression von CD28 auf CD8+ T-Lymphozyten

CD28 ist einer der wichtigsten Liganden für kostimulatorische Signale bei der T-Zellaktivierung und wird nach wiederholter Stimulation herunter reguliert (siehe Einleitung). Dies kann unter anderem auch in Langzeit-Zell-Kultur *in vitro* durch wiederholte Re-Exposition mit einem spezifischen Antigen (hier Tetanus-Toxin) nachgestellt werden (**Abbildung 4a**). *In vivo* finden wir bei Patienten mit WG und MPA vermehrt CD8+/CD28- T-Zellen in der Peripherie ($46.7 \pm 19.3\%$ bei Patienten verglichen mit $22.4 \pm 8.5\%$ bei den Probanden, $p < 0.01$), insbesondere bei einer lang andauernden Erkrankung >5 Jahre ($38.1 \pm 14.4\%$ bei Patienten mit einer Erkrankung <5 Jahre; $49.7 \pm 18.1\%$ bei Patienten mit einer Erkrankung >5 Jahre; $p < 0.05$) (**Abbildung 4b**).

Die Anzahl der CD8+/CD28- T-Zellen korreliert mit einer niedrigen CD4/CD8 Ratio (**Abbildung 4c**), während es keine Korrelation zwischen der verminderten CD28 Expression und verschiedenen klinischen Parametern wie der Schwere der Erkrankung, der Anzahl der Organmanifestationen oder der kumulativen Cyclophosphamiddosis gibt. Zwischen Patienten mit WG und MPA findet sich kein signifikanter Unterschied im CD28 Gehalt auf CD8+ Zellen (**Abbildung 4b links**).

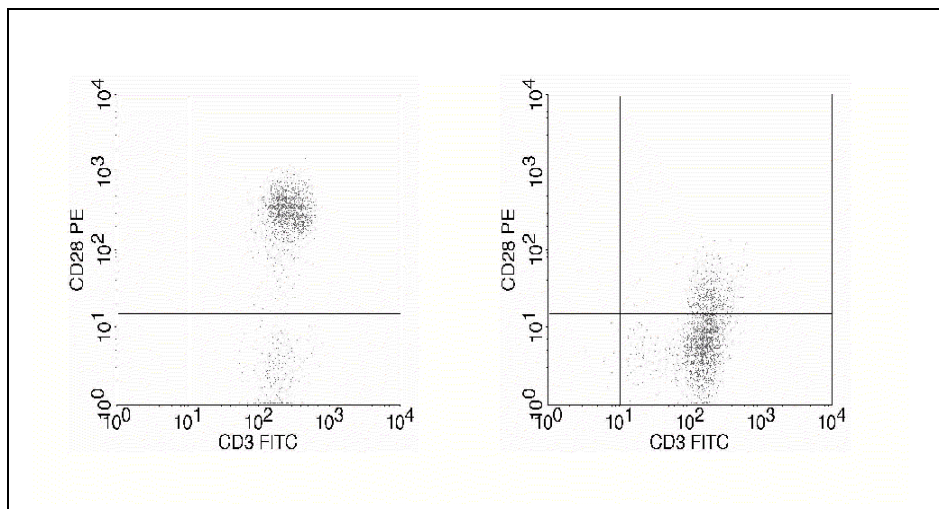


Abbildung 4a: Expression von CD28 auf T-Zellen *in vitro*. Die T-Zellen (CD3+) sind vor Stimulation mit Tetanus-Toxin alle CD28+ (links). Die Abbildung rechts zeigt den Verlust von CD28 nach wiederholter Stimulation der Zellen durch das spezifische Antigen.

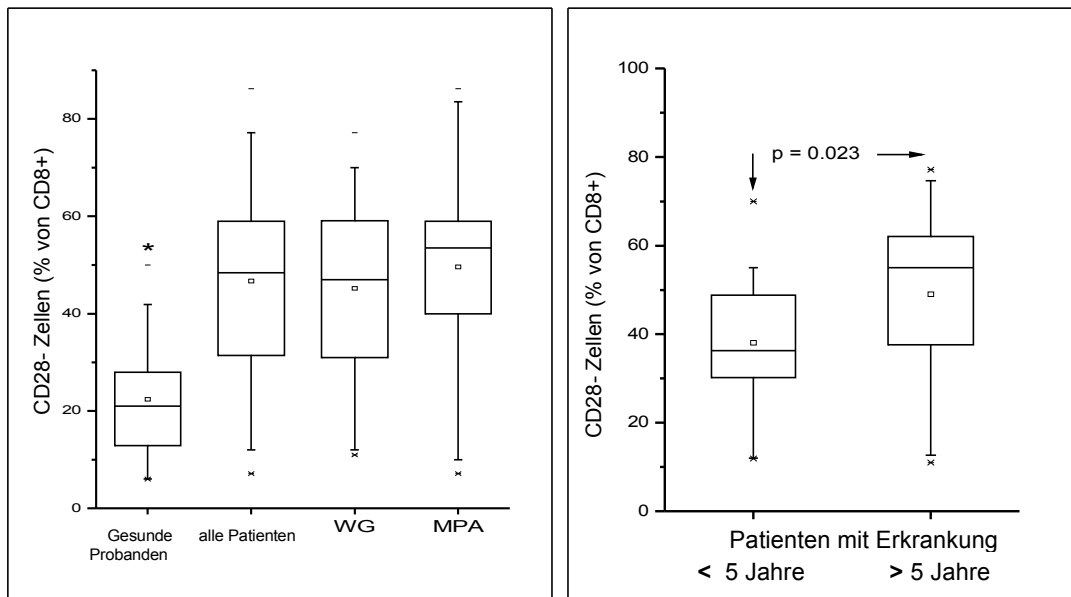


Abbildung 4b: Expression von CD28 auf CD8+ Zellen: Das Verhältnis von CD8+CD28- Zellen wurde bei Patienten (Patienten mit WG, n=47; Patienten mit MPA, n=33) und gesunden, altersgleichen Probanden (n=20) mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Daten sind in einem „box and whiskers“ Diagramm dargestellt, wobei 50% der Werte in der „box“ liegen, die „whiskers“ zeigen jeweils den höchsten und niedrigsten Wert an. Die Horizontale Linie gibt den Median an und der Punkt den Mittelwert. In ANOVA sind die Mittelwerte der Patientengruppe signifikant unterschiedlich von den Werten der gesunden Probanden.

Rechts: Bei Patienten mit einer Erkrankungsdauer von >5 Jahren (n=31) ist das Verhältnis von CD8+/CD28- Zellen im Gegensatz zu den Zellen der Patienten mit einer Erkrankungsdauer <5 Jahre erhöht (n=22).

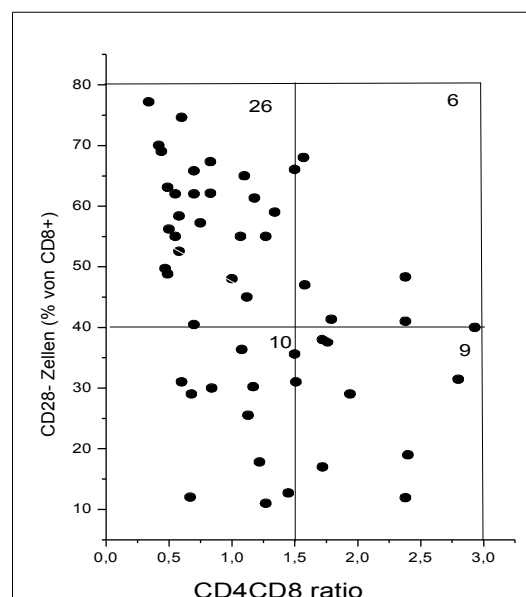


Abbildung 4c: Bei der Mehrheit der Patienten geht eine Erhöhung der CD8+/CD28- Zellen mit einer unter dem Normwert liegenden CD4/CD8 Ratio einher (Normwert 1,5 bis 2,5). Bei einem Grenzwert für CD8+/C28- von 40% (dies entspricht dem Normwert $\pm$ 1 Standardabweichung) ist die Verteilung von hohen CD8+/CD28- Zellen und niedriger CD4/CD8 Ratio statistisch signifikant (chi square Tests; $p < 0,05$).

4.2.2 Expression von CD57 auf CD8+ T-Lymphozyten

CD57, als weiterer Marker für replikative Seneszenz, wird bei gesunden Probanden vornehmlich auf CD28- Zellen expremiert (**Abbildung 5a**). Die Expression ist variabel und nimmt mit höherem Lebensalter zu (**Abbildung 5b**). Im Vergleich der Probanden zu Patienten mit WG und MPA ist die CD57 Expression nur bei Patienten mit jüngerem Lebensalter (Median 36 Jahre) unterschiedlich zu den gesunden Probanden. In den Gruppen mit einem Altersmedian von 68 Jahren besteht kein Unterschied zwischen gesunden Probanden und den Patienten. Patienten gestaffelt nach der Schwere der Erkrankung zeigen einen höheren Anteil an CD8+/CD57+ Zellen je schwerer der Verlauf der Erkrankung ist (**Abbildung 5c**; „nicht-schwere“ Erkrankung (S0) n=7, „weniger-schwere“ Erkrankung (S1) n=12, „schwere“ Erkrankung (S2) n=18). Auch Patienten mit einem schweren, systemischen Verlauf haben im Gegensatz zu Patienten mit einer lokalisierten Erkrankung mehr CD8+/CD57+ Zellen (**Abbildung 5d**). Die Gruppe der Patienten mit systemischer Erkrankung zeigt einen deutlich größeren Anteil als die Patienten mit lokalisierter Erkrankung. Daneben findet sich bei steigender Anzahl von beteiligten Organen (nach der ELK-Klassifikation) ein höherer Anteil an CD8+/CD57+ Zellen (**Abbildung 5e**). Außerdem findet sich eine Korrelation zwischen CD8+/CD57+ mit der CD4/CD8 Ratio (**Abbildung 5f**).

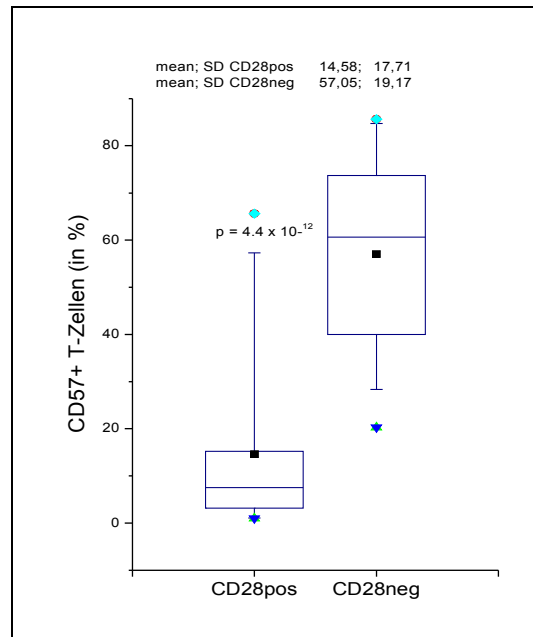


Abbildung 5a: Die Abbildung zeigt, dass CD57 vornehmlich auf CD28- T-Zellen expremiert wird.

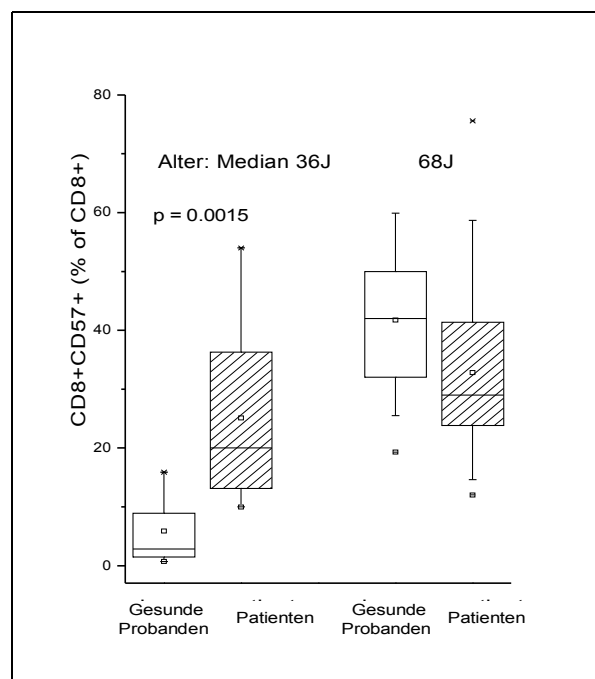


Abbildung 5b: Prozentualer Anteil von CD8+/CD57+ T-Zellen (y-Achse) von gesunden Probanden und Patienten (x-Achse, links) mit einem Altersmedian von 36 Jahren. Im Vergleich gesunde Probanden und Patienten mit einem Altersmeridian von 68 Jahren (x-Achse, rechts). Die CD57 Expression auf CD8+ Zellen ist bei jungen Patienten signifikant höher als die der gesunden Probanden. Im Altersmeridian von 68 Jahren kann kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden.

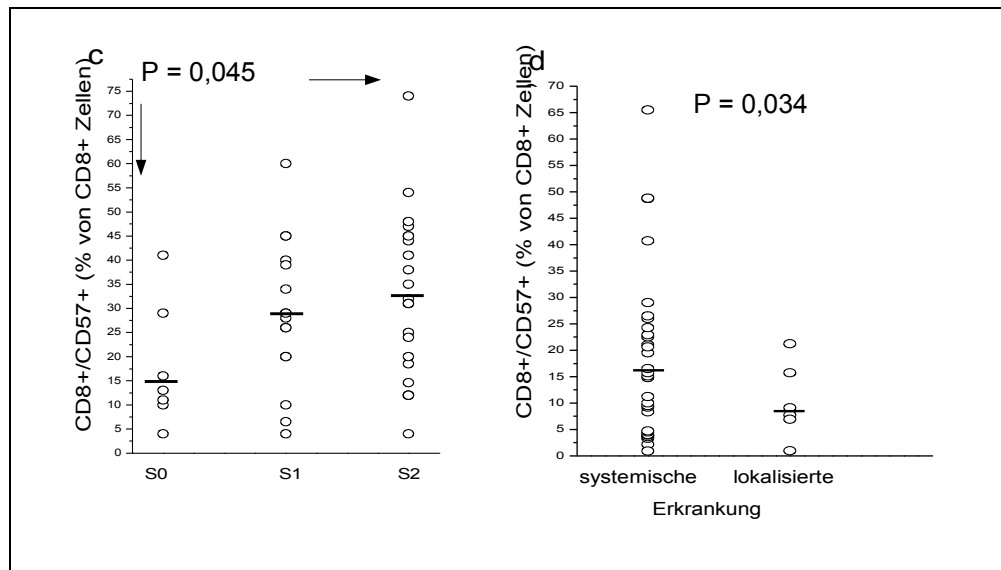


Abbildung 5c: Anteil der CD8+/CD57+ Zellen in Relation zu der Schwere der Erkrankung. „Nicht-schwere“ Erkrankung (S0, keine Krankheitsaktivität in den letzten 5 Jahren) (n=7) war korreliert mit einem signifikant niedrigeren Anteil von CD8+CD57+ Zellen als „weniger-schwere“ Erkrankung (S1, Erkrankung ohne Organmanifestation mit ≤ 1 Rezidiv) (n=12) und „schwere“ Erkrankung (S2, systemische Erkrankung mit mindestens einer Organmanifestation und mindestens einem Rezidiv) (n=18).

Abbildung 5d: Anteil der CD8+/CD57+ Zellen in Relation zu systemischer und lokalisierter Erkrankung. Patienten mit einer systemischen Erkrankung zeigten einen höheren Anteil CD8+/CD57+ Zellen, als Patienten mit einer lokalisierter Erkrankung. Jeder Punkt (O) stellt den Anteil von CD8+/CD57+ Zellen eines Patienten dar. Die Balken (—) zeigen den Median.

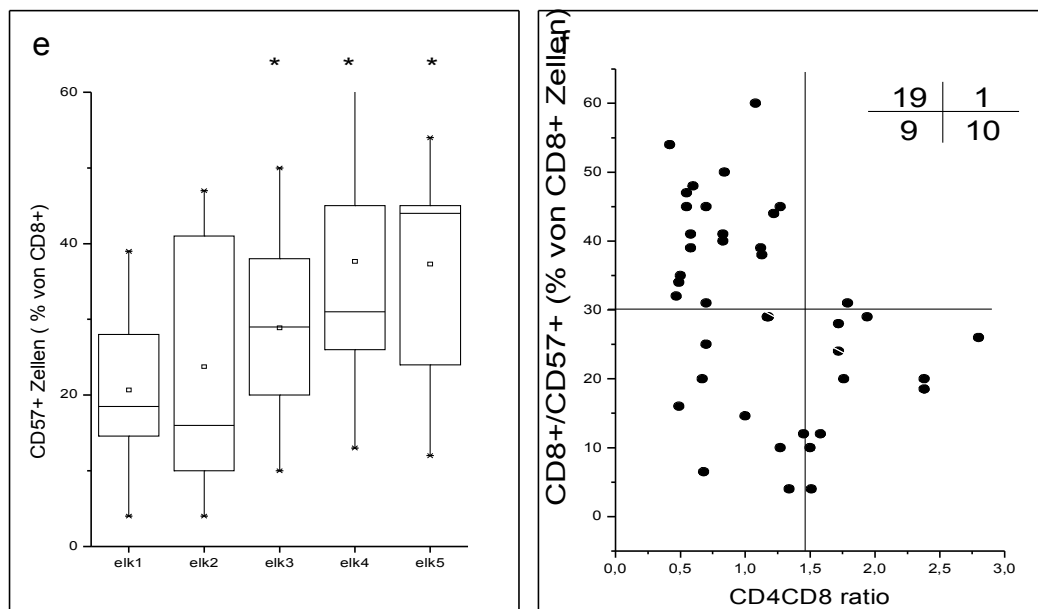


Abbildung 5e: Wenn die Patienten entsprechend ihrer Anzahl der betroffenen Organe eingruppiert werden (von 1–5 Organe, entsprechend der ELK-Klassifikation s. Anhang), steigt der Mittelwert mit der Anzahl der beteiligten Organe. Unterschied zwischen „ELK1“ und „ELK5“ signifikant (rechts).

Abbildung 5f: Hohe CD57 Expression geht mit niedriger CD4/CD8 Ratio einher; die Verteilung ist statistisch signifikant wenn der Grenzwert für CD57 Expression bei 30% und die CD4/CD8 Ratio bei 1,5 liegt (Normalwerte gesunder Erwachsener).

4.2.3 Expression von CD11b auf CD8+ T-Lymphozyten

Als Marker für Aktivierung wurde auf CD8+ T-Zellen die Expression von CD11b untersucht. CD11b, auch als Komplement Rezeptor 3 (CR3) bekannt, ist die α -Kette des Integrins MAC-1 und wird von allen Leukozyten expremiert.

Bei gesunden Probanden sind ungefähr 20% der CD8+ T-Zellen positiv für CD11b, besonders wird CD11b auf den CD8+/CD28- Zellen expremiert. Bei Patienten mit aktiver Erkrankung wird CD11b aufreguliert, dann vornehmlich auf den CD8+/CD28+ Zellen. Bei Patienten mit aktiver Erkrankung sind bis zu 18% der Zellen CD8+/CD28+/CD11b+ (Mittelwert $8,9\% \pm 4,7\%$ versus $1,2\% \pm 2,0\%$ in gesunden Probanden ($n=20$); $p<0,001$). Die CD11b Expression nimmt unter immunsuppressiven Therapie ab und CD11b ist auf CD8+/CD28+ nicht mehr nachweisbar (Beispiel in **Abbildung 6a**).

Bei den Patienten in Remission wird CD11b nur auf CD8+/CD28- Zellen expremiert, wobei die Expression unter den Patienten sehr stark variiert (ein Beispiel und die Zusammenfassung aller Daten zeigt **Abbildung 6b und c**). Im Vergleich zu gesunden Probanden findet sich bei Patienten mit AAV mehr CD8+/CD28-/CD11b+ T-Zellen. Kein Unterschied besteht dagegen zwischen MPA und WG-Patienten. Der Gehalt an CD8+/CD28-/CD11b+ Zellen korreliert mit dem erniedrigten CD4/CD8-Quotienten (die Daten aller Patienten und Probanden sind in **Abbildung 6d und e** zusammengefasst).

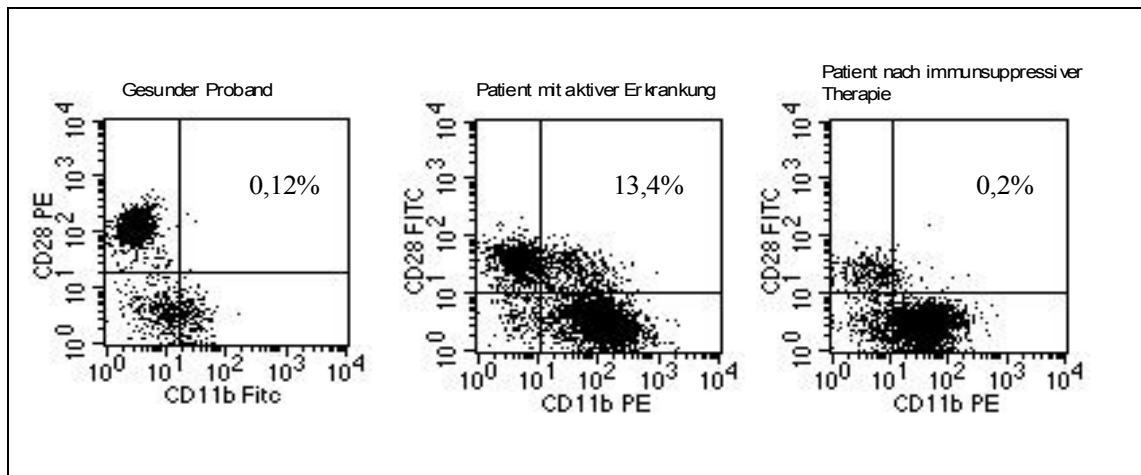


Abbildung 6a: CD11b Expression auf CD8+ T-Zellen. Bei gesunden Probanden (links) sind ungefähr 20% der T-Zellen positiv für CD11b, vornehmlich die CD28- Zellen. Bei einem Patienten mit aktiver Erkrankung (Mitte) konnten wir zusätzlich eine Population von CD8+CD28+CD11b+ Zellen nachweisen (rechter oberer Quadrant; 13,4%). Diese Population ist nach immunsuppressiver Therapie nicht mehr nachweisbar (rechts; 0,2%).

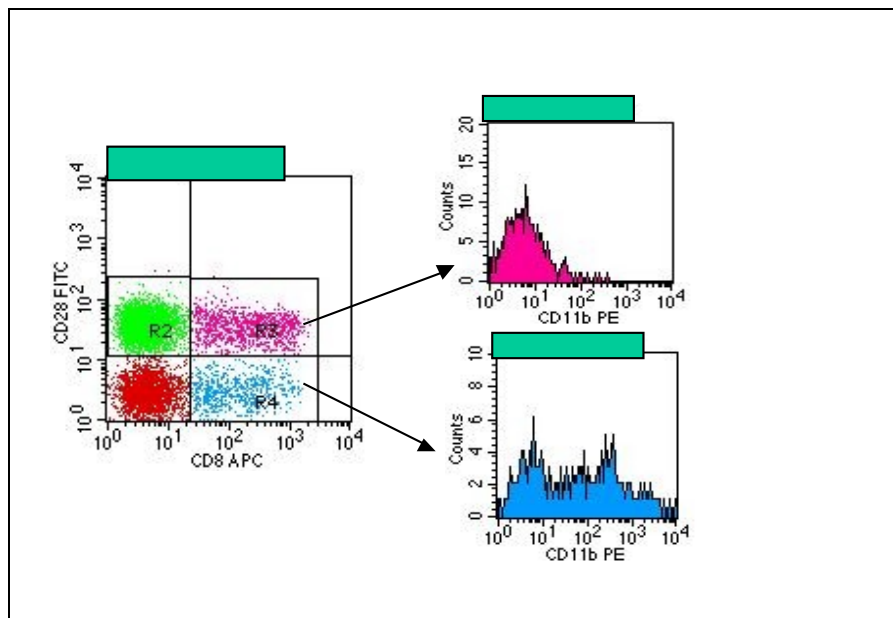


Abbildung 6b: Beispiel eines Patienten in Remission. Eine CD11b Expression konnte nur auf CD28- Zellen gefunden werden (blau, rechts unten). Bei den CD28+ T-Zellen war so gut wie keine CD11b Expression nachweisbar (pink, rechts oben).

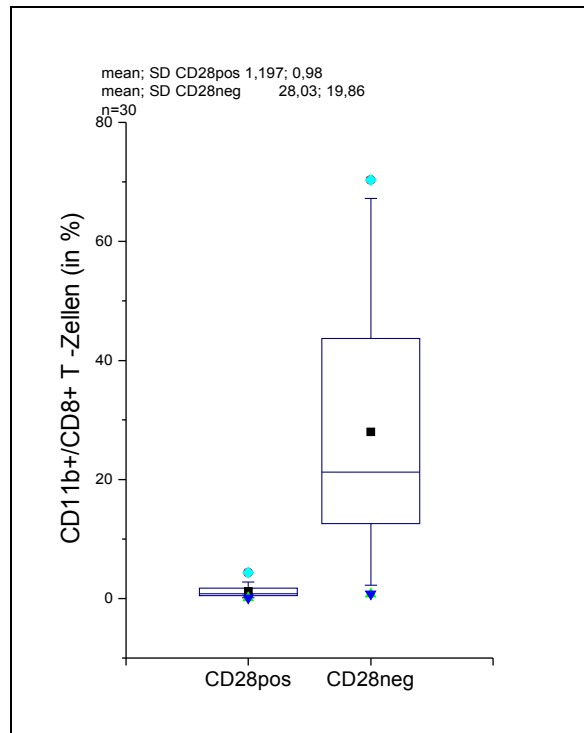


Abbildung 6c: Das Diagramm zeigt die Expression von CD11b auf CD8+/CD28+ (links) bzw. CD8+/CD28- (rechts) T-Zellen bei Patienten in Remission. Es ist zu sehen, dass CD11b vornehmlich auf CD28- Zellen expremiert wird.

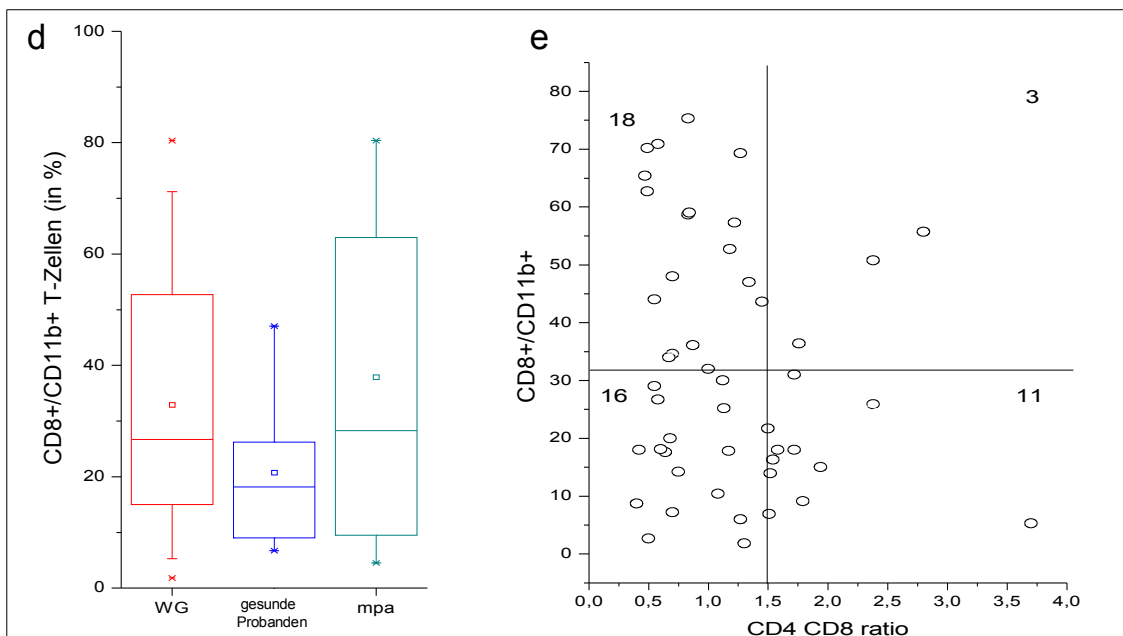


Abbildung 6d und e: Der Gehalt an CD8+/CD28-/CD11b+ T-Lymphozyten ist signifikant höher bei Patienten mit WG oder MPA im Vergleich zu gesunden Probanden ($p < 0,05$). Die CD11b Expression geht einher mit einer niedrigen CD4/CD8 Ratio (chi square Tests $< 0,05$; Cut-off für hohe CD11b Expression bei 32%, entsprechend dem Mittelwert ± 1 Standardabweichung gesunder Probanden)

4.3 Expression von Interleukin-2 und γ Interferon bei isolierten, stimulierten CD8⁺ T-Zellen *ex vivo*

Um die funktionellen Eigenschaften der CD8⁺/CD28⁻ T-Zellen zu untersuchen, wurden die Produktion von Zytokinen und von zytotoxischen Mediatoren *in vitro* und *ex vivo* untersucht. Zunächst wurde *in vitro* eine Zelllinie repetitiv stimuliert. Im Rahmen der Re-Stimulation verlieren die Zellen CD28 (siehe auch Seite 22, Abbildung 4a). Die CD28⁻ Zellen sind nach mehreren Passagen nicht mehr proliferationsfähig (gemessen mittels ³H-Thymidin-Inkorporation, Daten nicht gezeigt). Sie generieren in diesem Zustand proinflammatorische Mediatoren wie γ IFN, Perforin und Granzym B (siehe **Abbildung 7a**).

In isolierten CD8⁺ Lymphozyten ist nach Stimulation mit BFA, PMA und Ionomycin *in vitro* die Produktion von IL-2 und γ IFN mittels FACS nachweisbar. Nach Stimulation produzieren CD8⁺ T-Zellen IL-2 und γ IFN, beide Zytokine (insbesondere γ IFN) waren sowohl in CD8⁺/CD28⁺ als auch CD8⁺/CD28⁻ nachweisbar (**Abbildung 7b**).

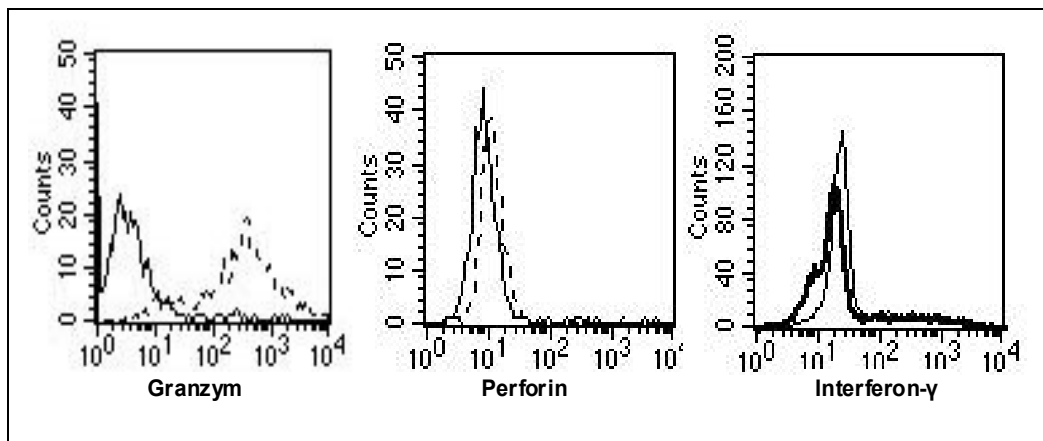


Abbildung 7a: Nach repetitiver Stimulation *in vitro* waren CD28⁻ T-Zellen nicht mehr proliferationsfähig (nicht gezeigt), produzierten aber weiterhin die proinflammatorischen Zytokine Granzym B (links), Perforin (Mitte) und γ IFN (rechts); gestrichelte Kurve (links, Mitte) bzw. dünne Kurve (rechts) = Produktion nach Stimulation.

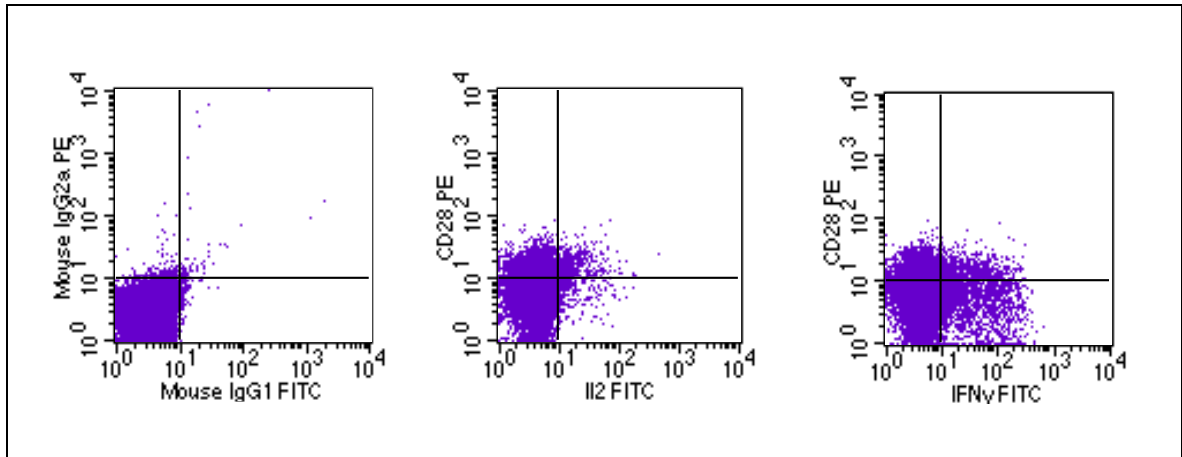


Abbildung 7b: CD8+ T-Zellen eines Patienten wurden isoliert und mit BFA, PMA, und Ionomycin stimuliert. Nach Stimulation findet sich in einem Teil der CD8+ T-Zellen IL-2 (Mitte) und γ IFN (rechts). Negativkontrolle im Vergleich links.

4.4 Analyse von CD8+-T-Zellen während eines akuten Schubes und in Remission bzw. nach Intensivierung der immunsuppressiven Therapie

Nach dem Nachweis von γ IFN, IL-2 und Granzym/Perforin in CD28- T-Zellen *in vitro* sowie bei einem Patienten mit AAV in isolierten T-Zellen nach Stimulation *in vitro* wurde die Generierung von IL-2 und γ IFN mittels FACS-Analyse bei Patienten im Vollblut *ex vivo* gemessen. Die Zellen wurden hierfür nicht stimuliert, sondern die Spontanproduktion der Zytokine durch intrazelluläre Akkumulation durch BFA 1% direkt nachgewiesen.

Bei einem Patienten mit akuten Schub der WG (CRP: 6,8mg/dl; BVAS: 9) kann in CD28+ und CD28- T-Zellen IL-2 und γ IFN nachgewiesen werden (**Abbildung 8a**). Nach erfolgreicher Intensivierung der immunsuppressiven Therapie mit Kortikosteroiden und Cyclophosphamid (CRP: 0,9mg/dl; BVAS: 1) nimmt der Gehalt von IL-2 und γ IFN positiven CD28+ und CD28- Zellen ab (**Abbildung 8b**, **Abbildung 8d**).

Korrespondierend kann bei einem Patienten in Remission in T-Zellen kein γ IFN nachgewiesen werden. Dieser Patient zeigt lediglich eine IL-2 Produktion (**Abbildung 8c**)

Durch Mehrfachfärbungen wird außerdem ersichtlich, dass die γ IFN produzierenden Zellen auch CD11b+ sind. **Abbildung 8e** zeigt beispielhaft den Gehalt der CD8+/CD11b+ Zellen während eines Schubes.

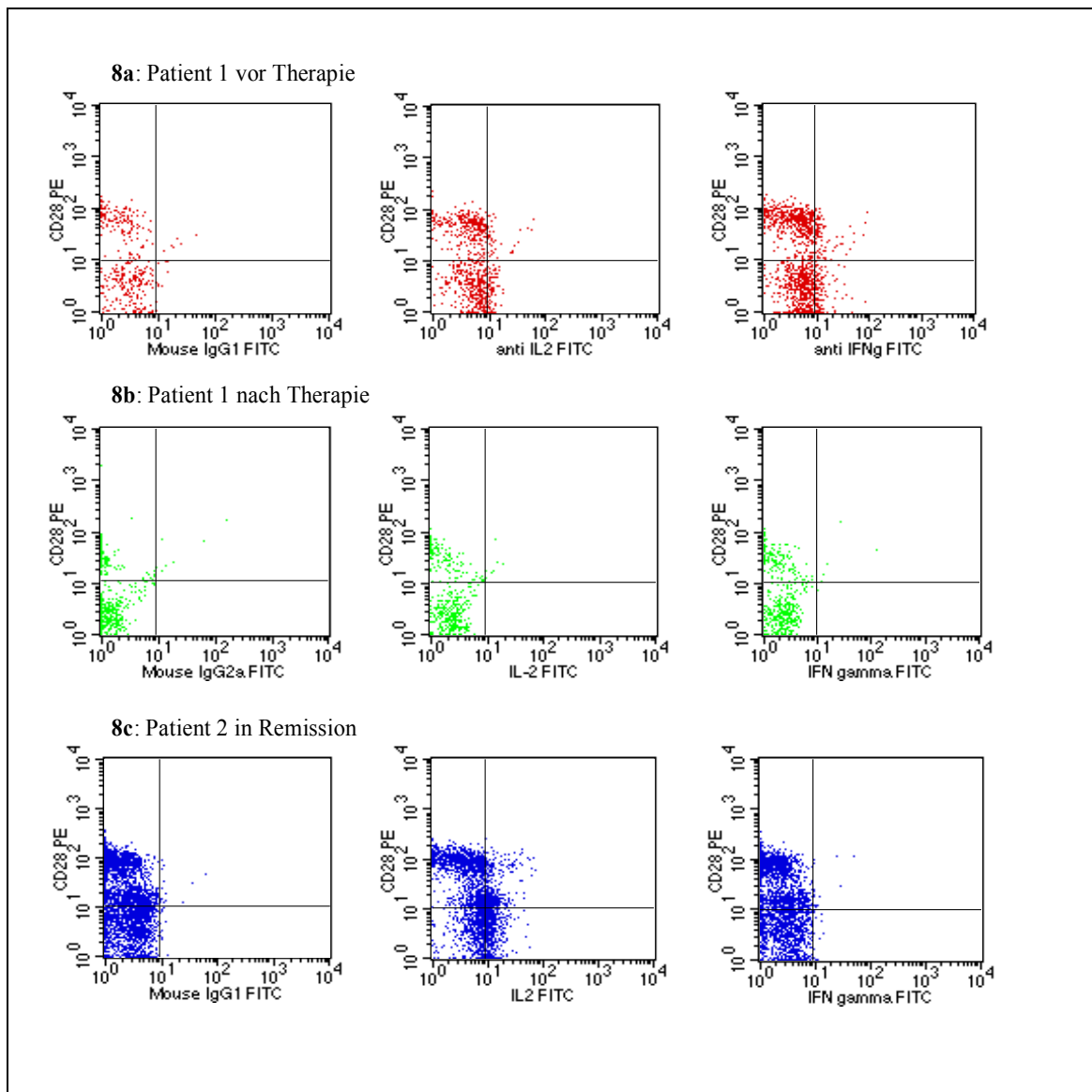


Abbildung 8a: Bei einem Patienten mit WG wird die γ IFN und die IL-2 Produktion in CD28+ und CD28- T-Zellen gemessen. In der aktiven Krankheitsphase zeigt sich eine deutliche Produktion der beiden Zytokine.

Abbildung 8b: Nach erfolgreicher Intensivierung der Immunsuppressiven Therapie sinkt der γ IFN- und IL-2-Gehalt bei demselben Patienten deutlich ab.

Abbildung 8c: Bei einem WG Patienten in Remission kann keine Produktion von γ IFN nachgewiesen werden. IL-2 findet sich allerdings auch in Remission.

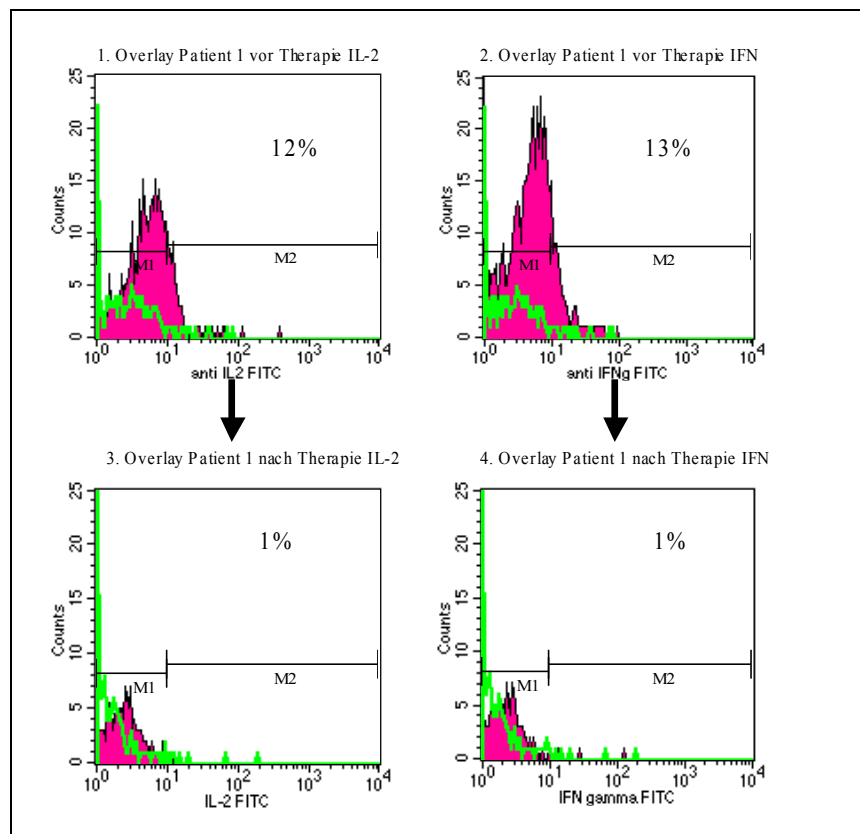


Abbildung 8d: 1.: Zeigt die Lymphozyten des Patienten mit aktiver WG vor der immunsuppressiven Therapie. 12% der Zellen sind positiv für IL-2 (Lila M2). Die grüne Kurve zeigt die entsprechende Negativkontrolle.
 2.: zeigt die den Gehalt an γ IFN in den Lymphozyten desselben Patienten wie in 1. 13% der Zellen sind positiv für γ IFN (Lila M2). Die grüne Kurve zeigt die entsprechende Negativkontrolle.
 3.: zeigt die Lymphozyten des Patient einen Monat später nach erfolgreicher Remissionsinduktion mit immunsuppressiver Therapie. Nur noch 1% der Zellen ist positiv für IL-2 (Lila M2). grüne Kurve zeigt die entsprechende Negativkontrolle.
 4.: zeigt die den Gehalt an γ IFN in den Lymphozyten desselben Patienten wie in 3: Nur 1% der Zellen ist positiv für γ IFN (Lila M2).

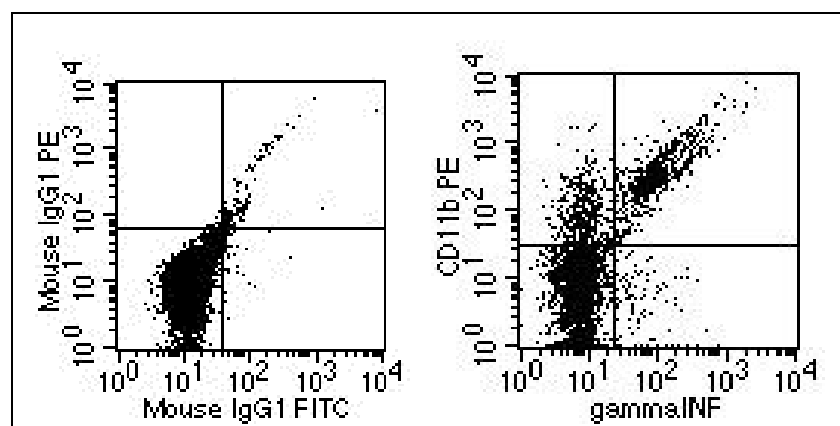


Abbildung 8e: Die Abbildung zeigt die CD8+ Zellen eines Patienten mit WG im aktiven Krankheitsstadium. Es ist zu sehen, dass es eine Population von Zellen gibt, die CD8+/CD11b+ ist und gleichzeitig γ IFN produziert (rechtes Bild, rechter, oberer Quadrant). Das linke Bild zeigt die entsprechende Negativkontrolle.

4.5 Nachweis von MHC Klasse II, CD14, CD64 und CD83 auf PMN bei Patienten mit AAV

Neben den T-Lymphozyten spielen PMN in der Pathogenese der AAV eine wesentliche Rolle. Wir haben als nächstes untersucht, ob das Auftreten von MHC II, CD14, CD64 und CD83 positiven PMN bei Patienten mit AAV an aktivierte und γ IFN produzierenden T-Lymphozyten in vivo assoziiert ist.

Nach Stimulation mit BFA, PMA und Ionomycin finden sich bei Patienten mit WG parallel zur Produktion von γ IFN und IL-2 in CD8⁺ T-Zellen (**Abbildungen 8**) MHC II und CD83 positive PMN (**Abbildung 9a**).

Bei den Patienten mit aktiver WG zeigt sich parallel zum Rückgang der γ IFN⁺ Zellen (**Abbildungen 8**) auch eine Inaktivierung der PMN mit einer Herunterregulierung von MHC II. Auch die beiden anderen untersuchten aktivierungs-abhängigen Rezeptoren CD14 und CD64 gehen parallel mit der Krankheitsaktivität (und dem Gehalt an aktivierten T-Zellen) zurück (Beispiel in **Abbildung 9b+c**, eine Übersicht aller Patienten in aktivem Krankheitsstadium gibt **Abbildung 9d**)

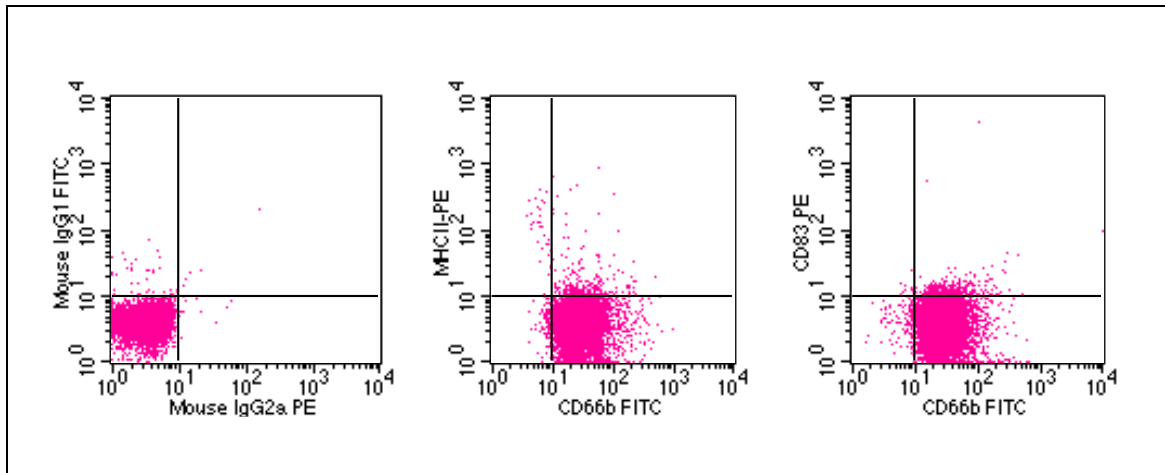


Abbildung 9a: Die PMN eines WG-Patienten erwerben parallel zu der Produktion von γ IFN und IL2 durch T-Lymphozyten (Abbildung 7a) MHC II (Mitte; rechter, oberer Quadrant) und CD83 (links; rechter, oberer Quadrant) nach Stimulation mit BFA, PMA und Ionomycin. Das linke Histogramm zeigt die Negativkontrolle.

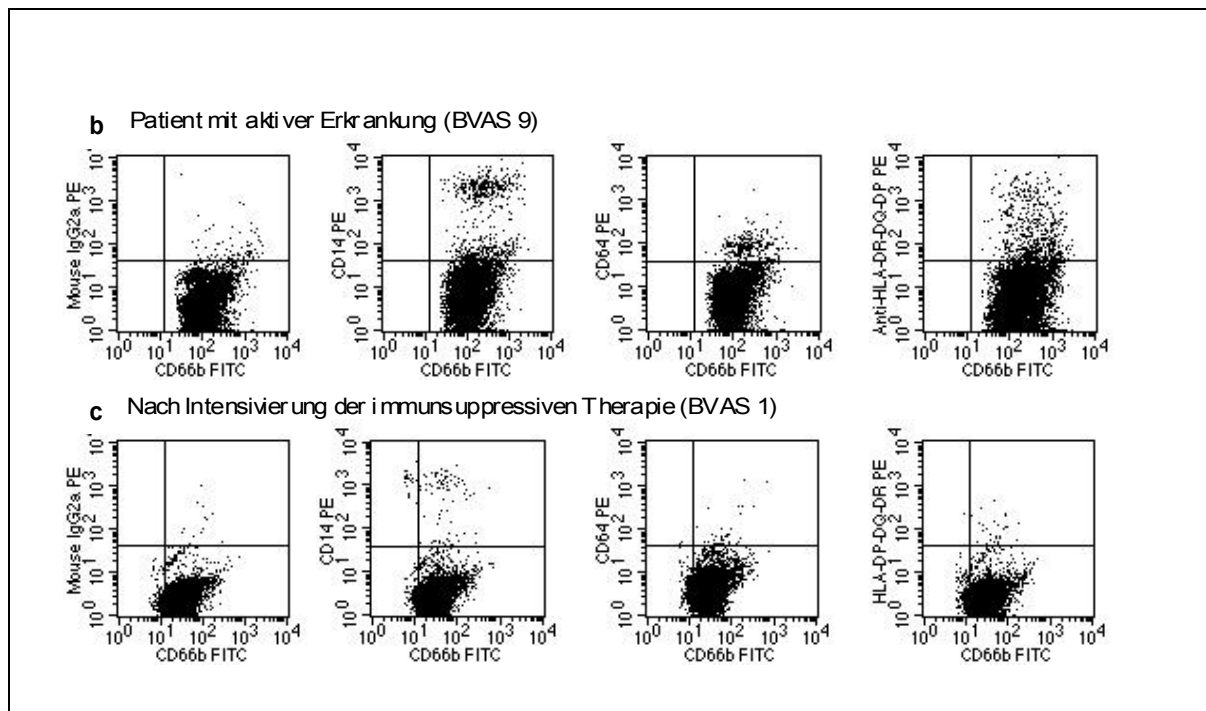


Abbildung 9b: Bei einem Patienten mit aktiver WG (BVAS 9) wurde die Expression der aktivitäts-assoziierten Rezeptoren CD14, CD64 und MHC II auf PMN mittel FACS-Analyse gemessen.

Abbildung 9c: Nach erfolgreicher Intensivierung der immunsuppressiven Therapie (BVAS 1) sieht man, dass die Expression der aktivitäts-assoziierten Rezeptoren auf den PMN stark reduziert wird.

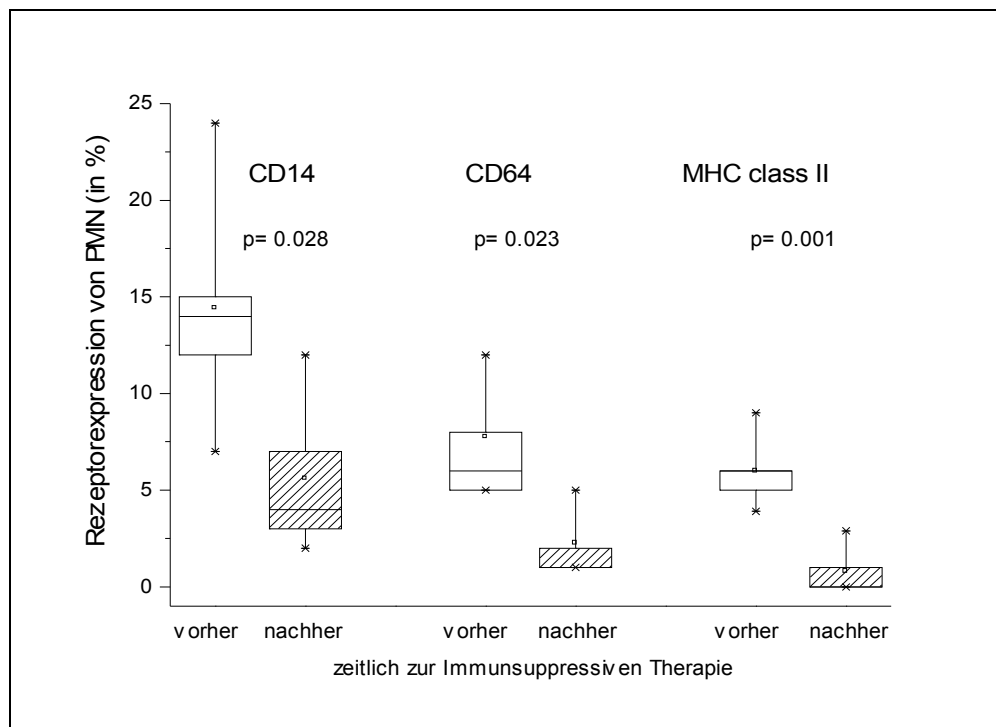


Abbildung 9d: Das Diagramm zeigt die Rezeptorexpression in % von PMN bei Patienten in aktiven Krankheitsstadium vor und nach einer immunsuppressiven Therapie. Es ist zu sehen, dass nach erfolgter Therapie der Gehalt an CD14 (links), CD64 (Mitte) und MHC II (rechts) abnimmt.

4.6 *In vitro* Untersuchungen zur Interaktion von γ Interferon produzierenden T-Zellen und PMN

Im Krankheitsschub erwerben CD8+/CD28-/CD57+ T-Zellen CD11b und diese Zellen produzieren γ IFN (siehe **Abbildung 10**). γ IFN wiederum ist in der Lage PMN *in vivo* zu aktivieren (siehe oben). Um dies zu prüfen führten wir eine Reihe von *in vitro* Versuchen mit isolierten T-Zellen und PMN durch.

Nach Ko-Kultivierung der CD8+/CD28+/CD11b+ Zellen *in vitro* mit autologen PMN erwarben PMN MHC II. Nach 24h waren $12,7\% \pm 8,0\%$ der PMN MHC II+; nach 48h waren es $24,9\% \pm 7,5\%$ der PMN. Die Expression von MHC II auf frisch isolierten PMN ohne Ko-Kultivierung lag bei $<1\%$ (Daten nicht gezeigt).

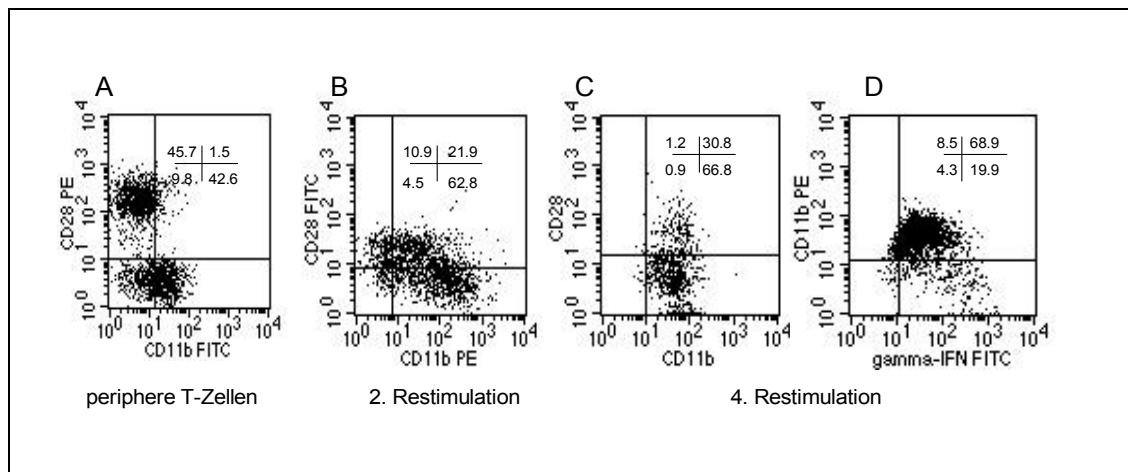


Abbildung 10: Periphere CD8+ T-Zellen eines gesunden Probanden (A) erwerben nach wiederholter Stimulation mit PHA CD11b (B, C). Diese CD8+/CD11b+ T-Zellen produzieren γ IFN (D).

5 Diskussion

Die Pathogenese der ANCA assoziierten Vaskulitiden ist bis heute nicht ausreichend geklärt und Gegenstand aktueller Forschungen. Allgemein wird als Ursache von chronisch-entzündlichen Erkrankungen, wie der AAV, eine „fehlgesteuerte Aktivierung der Immunantwort“ angenommen. Es wird postuliert, dass es auf der Basis einer genetischen Prädisposition durch (z.B. virale) Infektionen, Autoimmunprozesse und/oder allergische Reaktionen zu einer sich selbst unterhaltenden, destruktiven Entzündung kommt. Charakteristisch für den Ablauf der Entzündung bei solch chronisch-entzündlichen Erkrankungen ist es, dass sie in der akuten Phase mit einer Aktivierung der PMN einhergeht, welche dann von einer fortschreitenden Aktivierung von T-Lymphozyten gefolgt ist.

Die Beteiligung der PMN in der Pathogenese der AAV scheint heute gesichert. Zahlreiche Arbeiten der letzten Jahre konnten signifikante Veränderungen in der Zellpopulation der PMN feststellen, die auf eine Beteiligung der PMN schließen lassen. Bei AAV Patienten können aktivierte PMN im Blut und in betroffenen Organen gefunden werden (Brouwer 1994). Diese PMN zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an aktivitäts-assoziierten Oberflächenmarkern wie CD64 aus. Nach Beginn einer immunsuppressiven Therapie sind sie bei betroffenen Patienten nicht mehr nachweisbar (Haller 1996; Muller Kobold 1998). Zusätzlich verändert sich eine definierte Population an PMN zu Zellen mit einem ähnlichen Phänotyp wie so genannte dendritische Zellen (DC). Sie erwerben MHC Klasse II Moleküle, co-stimulatorische Rezeptoren wie CD80 und CD86 sowie CD83, einen Marker, der als spezifisch für DC gilt. Diese Veränderung haben wir als „Differenzierung“ von PMN bezeichnet. Diese differenzierten PMN sind *in vitro* in der Lage Antigene MHC Klasse II-abhängig T-Lymphozyten zu präsentieren (Hänsch 1999; Iking-Konert 2002). Möglicherweise spielt dieser Zelltypus auch *in vivo* durch eine Präsentation von (Auto)-Antigenen in der Pathogenese der ANCA-assoziierten Vaskulitiden eine Rolle.

Neben aktivierten PMN sollen Antikörper gegen zytoplasmatische Bestandteile der PMN (so genannte antineutrophile zytoplasmatische Antikörper, ANCA) in der Entstehung von AAV eine Schlüsselrolle einnehmen. In den letzten Jahren ist eine

Vielzahl von Arbeiten entstanden, die diese Rolle von ANCA in der Pathogenese von AAV postulieren. Es gibt allerdings Argumente, die gegen die zentrale Rolle von ANCA in der Pathogenese von AAV sprechen (siehe Einleitung).

Als stärkstes Argument für eine Beteiligung der ANCA galt bislang die Beobachtung, dass ANCA in *in vitro* Versuchen PMN aktivieren können (siehe Einleitung). ANCA induzierten bei PMN *in vitro* die Produktion von Sauerstoffradikalen, was für eine Entzündungsentstehung verantwortlich sein könnte (Falk 1990; Keogan 1992; Csernok 1994; Porges 1994; Harper 2001; Bosch 2006). Damit es aber zu einer Aktivierung der PMN und dann zu einer Vaskulitis kommen kann, wäre es von entscheidender Bedeutung, dass ANCA *in vivo* an die Oberfläche von PMN binden. Diese Bindung von ANCA an PMN konnte allerdings bisher nicht schlüssig gezeigt werden (s. Einleitung).

Zusammenfassend muss man sagen, dass die Ergebnisse der Studien zur Aktivierung von PMN durch ANCA keine befriedigenden Ergebnisse liefern. Der Zweifel an der pathogenen Bedeutung von ANCA besteht weiterhin.

Da ANCA offensichtlich *in vivo* nur unzureichend binden, müsste es einen alternativen Aktivierungsweg für PMN bei den AAV geben. Viele Hinweise sprechen für die Beteiligung von T-Lymphozyten.

Eine T-Zell-Antwort könnte durch Generierung von T-Zell-Zytokinen, wie γ IFN, zur Aktivierung der PMN bei AAV führen. Diese These wird durch folgende Fakten unterstützt:

1: Neben aktivierten PMN finden sich *ex vivo* auch aktivierte T-Zellen. Neben akuten Aktivierungsmarkern wie HLA-DR, CD25 oder CD125 (siehe Einleitung), gibt es zahlreiche Hinweise auf eine andauernde und repetitive Stimulation und Proliferation von T-Zellen, wie Anhalte für die so genannte replikative Seneszenz der T-Zellen (Vogt 2003), die verminderte Expression von CD28 (Schlesier 1995; Giscombe 1998; Lamprecht 2001, siehe 4.2.1), der Erwerb von CD57 (Schlesier 1995, siehe 4.2.2) und die Veränderungen der CD4/CD8 Ratio (siehe 4.1).

2: Es gibt zahlreiche Befunde, dass γ IFN von T-Zellen in der Akutphase der AAV produziert wird und somit eine wesentliche Rolle in der Pathogenese von AAV spielen könnte (Giscombe 1998; Komocsi 2002; Spriewald 2005, siehe 4.4).

3: Während einer akuten Phase der Erkrankung sind PMN aktiviert. Neben anderen Markern findet man auf PMN z.B. CD64 als Marker für eine akute, aber auch MHC Klasse II Antigene als Hinweis auf eine andauernde Aktivierung. Die Expression beider Rezeptoren wird in *in vitro* Experimenten vornehmlich durch γ IFN, einem typischen T-Zell-Zytokin, induziert (Radsak 2000; Hänsch 2003, siehe 4.5).

Bisher ist es nicht eindeutig geklärt, wie und warum T-Zellen bei AAV aktiviert werden, obwohl es Anhalte für eine Antgenspezifität gibt (Brouwer 1994; Griffith 1996). Daten in aktueller Literatur zeigen jedoch eindeutig, dass bei WG und MPA sowohl CD4+ als auch CD8+ T-Zellen aktiviert sind und CD4+ Zellen konnten vornehmlich als Quelle von γ IFN identifiziert werden (Komocsi 2002; Spriewald 2005).

Die hier dargestellten Daten liefern Hinweise für eine vorangegangene und für eine aktuelle Aktivierung bzw. aktivierungsabhängigen Veränderungen im CD8+ Kompartiment. Unter dem Aspekt der PMN-Aktivierung versuche ich außerdem ein Modell für einen alternativen Aktivierungsmechanismus für PMN darzustellen. Eine Interaktion zwischen PMN und CD8+ T-Zellen, die Hinweise auf ein Zusammenspiel dieser beiden Zellformen gibt, kann *ex vivo* nachgestellt werden.

Unser Patientenkollektiv zeigt eine deutliche Verschiebung der CD4/CD8 Ratio in Richtung CD8. Eine Verschiebung des Verhältnisses von CD4+ zu CD8+ Zellen findet sich zum Beispiel bei Aktivierung und Proliferation oder aber Persistenz einer oder mehrerer spezifischer T-Zellen in einem der Kompartimente. Besonders Patienten mit einer langandauernden Erkrankung (>5 Jahre) zeigen diese Veränderung, wobei die Anzahl an CD4+ T-Zellen abnimmt, wohin gegen die Population der CD8+ T-Zellen stabil bleibt oder sich sogar vergrößert (Marinaki 2005). Dies deutet auf eine präferentielle Aktivierung und/ oder Expansion von CD8+ T-Zellen hin. Auf der anderen Seite könnten die CD8+ Zellen durch den

Verlust von CD28 und den Erwerb von CD57 eine höhere Resistenz gegenüber der natürlichen Apoptose aufweisen, was dann zur Akkumulation von CD8+ T-Zellen im peripheren Blut führen würde (Vallejo 2005).

In unserem Kollektiv finden wir (wie Vogt 2003) einen Verlust von CD28 auf den CD8+ Zellen, was als Ausdruck für eine vorangegangene Aktivierung der T-Zellen zu werten ist. CD28 ist einer der wichtigsten Liganden für kostimulatorische Signale bei der T-Zellaktivierung. CD28 wird auf T-Zellen nach wiederholter Stimulation, z.B. im Rahmen von viralen Infekten, herunter reguliert (Vallejo 2005). Insbesondere Patienten mit einer langen und schweren Erkrankung zeigen einen signifikant höheren Anteil an CD28- T-Zellen im Vergleich zu gesunden Probanden. Eine Korrelation mit anderen klinischen Parametern gelingt nicht (siehe 4.2.1). Insbesondere die fehlende Korrelation des CD28- Gehaltes und der kumulativen Cyclophosphamiddosis bei unseren Patienten deutet auf eine immunsuppressivaunabhängige T-Zellveränderung hin.

Wie bereits Schlesier 1995 zeigen konnte, erwerben CD8+ T-Zellen von Patienten mit multipler Organbeteiligung CD57 (Schlesier 1995). Erwerb von CD57 wird ebenfalls als Marker für eine replikative Seneszenz angesehen (Brenchley 2003) und ist somit ein zuverlässiger Indikator für eine vorausgegangene Aktivierung. Folglich steigt naturgemäß der Anteil der CD57+ Zellen durch vermehrt stattgefundenen Kontakt mit infektiösen Antigenen und somit physiologischerweise mit dem Alter.

Meine Daten zeigen, dass der Anteil von CD8+/CD57+ T-Zellen bei gesunden Probanden und Patienten mit AAV in höherem Lebensalter in etwa gleich ist. Erklären könnte dies die Tatsache, dass sowohl ältere Patienten, als auch ältere gesunde Probanden eine erhöhte Anzahl an immunologischen Reaktionen, sei es durch AAV oder z.B. bakterielle/virale Infekte, durchgemacht haben. Folglich wäre der Anteil der CD8+/CD57+ Zellen nicht signifikant unterschiedlich. Dagegen spricht, dass ältere Patienten zusätzlich zu ihrer AAV bedingten T-Zellaktivität auch andere immunologische Reaktionen wie banale Infekte durchgemacht haben müssten. Die Anzahl an Infekten könnte außerdem aufgrund von immunsuppressiven Therapeutika höher sein als bei gesunden Probanden. Demnach ließe sich auch erwarten, dass der CD57+ Gehalt höher ist.

Bei jüngeren Probanden und Patienten bis 40 Jahre zeigen meine Daten jedoch einen signifikanten Unterschied im Gehalt der CD8+/CD57+ Zellen: AAV Patienten weisen bereits in jüngeren Jahren einen höheren Anteil von CD8+/CD57+ T-Zellen auf. Der CD8+/CD57+ T-Zellpool der gesunden Probanden bis 40 Jahre ist noch nicht expandiert. Im Gegensatz zu älteren gesunden Probanden haben sie natürlicherweise weniger entzündliche oder autoimmune Reaktionen durchgemacht. Da diese jüngeren Patienten teilweise mit Immunsuppressiva behandelt wurden, ist ein therapeutischer Effekt auf die T-Zellen nicht ganz auszuschließen.

Außerdem finden wir eine Korrelation zwischen CD57 Expression und klinischen Parametern, wie der Anzahl der Organmanifestationen und der Schwere der Erkrankung: erhöhte CD8+/CD57+ Expression findet sich bei Patienten mit schwerer Erkrankung und multipler Organbeteiligung (Abbildungen 5b-f).

Neben diesen Markern für eine „permanente oder vorangegangene“ Aktivierung untersuchten wir CD11b als einen Rezeptor für eine akute Aktivierung von T-Zellen. CD11b, auch Komplement-Rezeptor 3 (CR3) genannt, wird auf allen Leukozyten, inklusive T-Lymphozyten, expremiert. Wir finden auf CD8+ Zellen eine Aufregulation von CD11b während eines akuten Schubes der Vaskulitis (siehe Abbildung 6a). Studien mit Virus infizierten Mäusen zeigten, dass CD11b ein Indikator für die Aktivierung von T-Zellen ist und durch die Expression von CD11b zwischen aktivierten Effektor T-Zellen und Memory T-Zellen unterschieden werden kann (McFarland 1992; Christensen 2001). Bei der Mehrheit unserer Patienten mit aktiver WG und MPA können wir eine erhöhte Expression von CD11b auf CD8+ T-Zellen feststellen. ES findet sich bei Patienten mit aktiver Erkrankung eine Population von CD8+CD28+CD11b+ T-Zellen, die bei Patienten in Remission und bei gesunden Probanden nicht nachgewiesen werden kann. Bei diesen ist die CD11b Expression auf CD8+CD28- T-Zellen beschränkt. Das Auftreten von CD11b vornehmlich auf CD28+ T-Zellen passt zu der Annahme, dass T-Zellen, denen das co-stimulatorische Molekül CD28 fehlt, nicht mehr auf eine Aktivierung ansprechen können.

In Studien bei Patienten mit Virus-Infektionen (CMV oder EBV) konnte ebenfalls eine Assoziation von CD11b-Expression und T-Zell-Aktivierung nachgewiesen werden, einhergehend mit einer Expansion von CD8+ Effektorzellen (Fiorentini 2001). In dieser Studie wurden die CD8+CD28+CD11b+ T-Zellen als transienter

Phänotyp im Rahmen der CD8⁺ T-Zell Aktivierung beschrieben, was auch bei unseren Patienten beobachtet werden kann. Nach erfolgreicher immunsuppressiver Therapie ist diese Zellpopulation bei unseren Patienten nicht mehr nachweisbar. Stattdessen lässt sich eine Population von CD8⁺CD28⁻CD11b⁺ Zellen nachweisen, die in einigen Fällen mit der Dauer der Erkrankung ansteigt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Kombination von CD28⁻ Zellen mit CD11b ein Indikator für vorausgegangene Aktivierung sein könnte. Da 9 von 10 Patienten mit aktiver Erkrankung neue Patienten ohne eine Immunsuppression waren, erscheint eine konkurrierende Virusinfektion als Ursache für die CD11b-Expression auf den T-Zellen unwahrscheinlich, obwohl dies nicht ganz ausgeschlossen werden kann.

Zusammenfassend beschreiben die Ergebnisse einen T-Zell Phänotyp der sich im Krankheitsverlauf einer möglichen Entwicklung unterzieht, die in der folgenden Abbildung dargestellt ist (**Abbildung 11**).

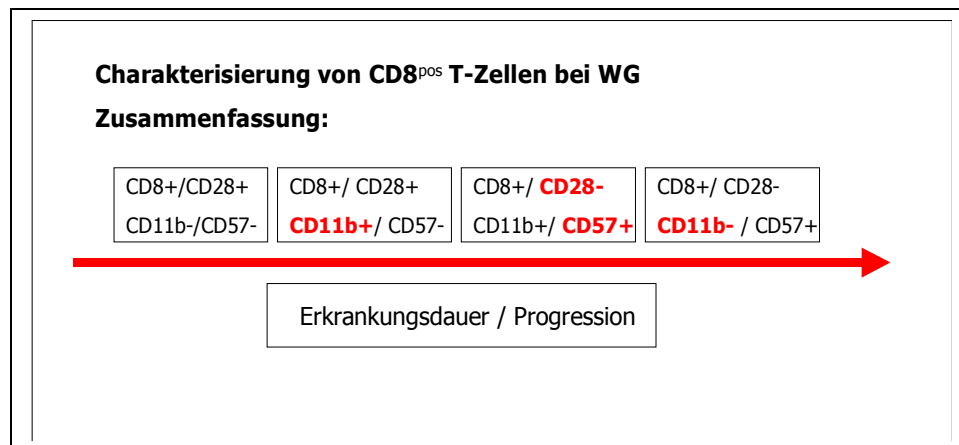


Abbildung 11: Charakterisierung der CD8⁺ T-Zellen bei Patienten mit AAV im Laufe der Erkrankung

IL-2 und γ IFN sind proinflammatorische Zytokine, die unter anderem aus aktivierten T-Zellen generiert werden. Sie fungieren als Mediatoren zwischen immunkompetenten Zellen der physiologischen Immunantwort und sollen auch in der Pathogenese der AAV eine zentrale Stellung einnehmen. Wir konnten in unseren Untersuchungen zeigen, dass CD8⁺ T-Zellen bei AAV während einer aktiven Krankheitsphase γ IFN produzieren. Nach erfolgreicher Intensivierung der immunsuppressiven Therapie ging die γ IFN Produktion korrespondierend zum

Rückgang der klinischen Beschwerden (BVAS von 9 auf BVAS 1) vollständig zurück. Bei einem Patienten in Remission konnte kein γ IFN in CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sprechen für eine aktivitätsabhängige Produktion von γ IFN bei AAV.

Es ist bekannt, dass besonders γ IFN, neben anderen T-Zell-Zytokinen, ein potenter Aktivator von PMN ist. Unter anderem wird die Expression von CD64 und MHC Klasse II gesteuert (Reinisch 1996; Radsak 2000; Hänsch 2003). MHC II Moleküle sind essentiell für die Antigenpräsentation an T-Zellen und werden normalerweise nur von professionell-antigen-präsentierenden Zellen expremiert. CD64 gehört zu den Fc- γ Rezeptoren, die aggregierte IgG binden können und so bei der Opsonisierung von Antigenen eine Rolle spielen. CD64 ist ein hochaffiner Fc γ I Rezeptor und wird aktivitätsabhängig auf PMN expremiert. Wir finden *ex vivo* bei Patienten während einer aktiven AAV eine Zellpopulation, die diesem Zell-Typ entspricht: PMN bei Patienten mit aktiver WG expremierten CD64 und MHC Klasse II. Daneben findet sich auf diesen „differenzierten“ PMN CD83. CD83 gilt als sehr spezifischer Marker für dendritische Zellen, und wird im Rahmen der Differenzierung aus Monozyten erworben. Nach erfolgreicher Intensivierung der immunsuppressiven Therapie zeigt sich, parallel zum Rückgang der γ IFN produzierenden CD8-T-Zellen, auch ein Rückgang der aktivitäts-assoziierten Rezeptoren CD64 und MHC Klasse II auf den PMN. Vermutlich entfällt der aktivierende Stimulus durch die CD8⁺ T-Lymphozyten.

Diese funktionelle Koppelung der PMN mit aktivierten T-Zellen kann in *in vitro* Versuchen nachgestellt werden. CD8⁺ T-Zellen wurden durch Stimulation aktiviert und expremieren *in vitro* CD11b, verlieren CD28 und generieren γ IFN. Nach Ko-Kultivierung von PMN mit diesen aktiven, γ IFN produzierenden T-Zellen, ist eine Expression des aktivitäts-assoziierten Oberflächenrezeptors MHC Klasse II auf PMN nachweisbar (siehe 4.6). Auch Überstände von diesen T-Zellen (mit hohem Gehalt an γ IFN) oder CD3-aktivierte T-Zellen regulieren MHC Klasse II auf PMN auf.

Diese Ergebnisse legen eine T-Zell-gesteuerten PMN-Aktivierung durch γ IFN aus T-Zellen nahe. Da die Expression von MHC Klasse II ein Proteinbiosynthese-abhängiger Prozess ist, zeigt diese Differenzierung einen Entzug der PMN von ihrer konsekutiven Apoptose an. Eine verlängerte Lebensdauer von aktivierten

PMN mit einer erhöhten zytotoxischen Aktivität führt dann möglicherweise zu einer Schädigung von Gewebe, wie sie bei AAV zu beobachten ist (Dallegrì 1997; Edwards 2003).

Andererseits konnte bereits festgestellt werden, dass MHC Klasse II positive PMN als Helferzellen für T-Zell-Aktivierung arbeiten und eine T-Zell Antwort, wie sie in AAV Patienten ersichtlich ist, hervorrufen (Fanger 1997; Radsak 2000; Iking-Konert 2001).

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern Hinweise auf eine aktivitäts-abhängige Proliferation von CD8⁺ T-Zellen mit der Fähigkeit der Produktion von γ IFN. Gleichzeitig kann eine Aktivierung von PMN beobachtet werden, die im Sinne einer γ IFN induzierten Aktivierung abläuft. Das Oberflächenmuster der aktivierten PMN zeigt bei unseren Patienten einen Phänotyp, der mit der Expression von MHC Klasse II, CD64 und CD83 einen dendritischen Zellcharakter hat, der in der Lage sein könnte, als antigenpräsentierende Zelle für T-Zellen zu arbeiten. Offen bleibt die Frage, in wie weit MHC Klasse II exprimierende PMN eine Relevanz für eine Krankheitsprogression bei AAV haben.

Zusammengefasst liefert unsere Studie Hinweise auf die Expansion von CD8⁺ T-Zellen, die in aktiver Krankheitsphase einen CD8⁺CD28⁺CD11b⁺ Phänotyp zeigen und in der Lage sind γ IFN zu produzieren. Wir vermuten, dass diese T-Zellen Veränderungen der PMN, welche in aktiver Krankheitsphase zu sehen sind und *in vitro* nachgestellt werden können, auch *in vivo* hervorrufen. Die Aktivierung von PMN bei AAV durch CD8⁺ T-Zellen könnte meiner Meinung nach eine Alternative sein, einen chronisch-entzündlichen Prozess hervorzurufen und es gilt sie weiter zu untersuchen.

6 Zusammenfassung

Die Beteiligung der PMN in der Pathogenese der AAV ist durch viele Arbeiten gut belegt worden. Unter anderem tragen PMN durch die Generierung von proinflammatorischen Molekülen maßgeblich zu der akuten und chronischen Entzündung bei. Die allgemein gängige Theorie zu der Pathogenese der AAV geht von einer zentralen Bedeutung der ANCA bei der Aktivierung der PMN und somit bei der Entstehung der Erkrankungen aus. Zahlreiche Befunde lassen die Bedeutung der ANCA jedoch zumindest kritisch hinterfragen. Somit stellt sich die Frage nach alternativen Mechanismen in der Pathogenese der AAV und der Aktivierung von PMN.

Zur Beantwortung dieser Frage haben wir T-Lymphozyten und PMN von Patienten mit AAV mittels FACS-Analyse untersucht. Besonders interessierten uns Oberflächenmarker der replikativen Seneszenz (CD28, CD57) und aktivierungsabhängige Marker (CD11b). Ebenfalls untersucht wurden die Produktion aktivierungsabhängiger Zytokine wie γ IFN und IL-2 und die mögliche Interaktion der T-Zellen mit PMN.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern Hinweise für eine pathophysiologische Bedeutung von CD8⁺-T-Lymphozyten. Der Anteil der CD8⁺ T-Zellen bei Patienten mit WG oder MPO nimmt im Laufe der Erkrankung gegenüber den CD4⁺-Zellen durch eine Persistenz der Zellen zu. Es findet sich ein Muster auf CD8⁺ Lymphozyten, welches auf eine permanente Aktivierung der Zellen schließen lässt. CD8⁺ Zellen verlieren in Folge dessen den Oberflächenmarker CD28 und erwerben CD57. Der Erwerb von CD57 kann im Sinne der replikativen Seneszenz gewertet werden. Dieser Zelltypus entzieht sich der Apoptose und persistiert dadurch.

Bei Patienten mit einer aktiven Erkrankung kann als Ausdruck einer Zellaktivierung zusätzlich vermehrt CD11b auf den CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. Dieser transiente, aktivierte Phänotyp von T-Zellen (CD8⁺/CD28⁺/CD11b⁺) ist nach erfolgreicher immunsuppressiver Therapie nicht mehr nachweisbar, was die aktivitätsabhängige Bedeutung zeigen könnte. Während einer aktiven Krankheitsphase generieren CD8⁺ Zellen das proinflammatorische Zytokin γ IFN. γ IFN ist einer der potentesten Aktivatoren von PMN und führt bei PMN zu einer

„Transdifferenzierung“ mit Expression der Oberflächenantigene CD64 und MHC II, die normalerweise auf ruhenden PMN nicht expremiert werden. Nach erfolgreicher immunsuppressiver Therapie nimmt sowohl der γ IFN-Gehalt in den CD8⁺ T-Zellen, als auch die Anzahl CD64 und MHC II⁺ PMN ab. Diese funktionelle Koppelung zwischen aktivierten T-Zellen und differenzierten PMN war *in vitro* nachstellbar. Isolierte und aktivierte CD8⁺ T-Zellen produzierten γ IFN und führten nach Ko-Kultivierung mit PMN zur Expression von MHC II.

Zusammenfassend deuten die dargestellten Ergebnisse auf eine aktivitätsabhängige Interaktion von CD8⁺ T-Zellen mit der Fähigkeit zur Produktion von γ IFN und der Aktivierung von PMN bei Patienten mit AAV. Diese Verbindung zwischen der angeborenen (PMN) und adaptiven (T-Zellen) Immunantwort könnte ein alternativer Mechanismus bei der Entstehung von AAV sein.

7 Literaturverzeichnis

- Abdel-Salam, B, Iking-Konert, C, Schneider, M, Andrassy, K, Hänsch, M (2004). "Autoantibodies to neutrophil cytoplasmatic antigens (ANCA) do not bind to polymorphnuclear neutrophils in blood." Kidney international **66**.
- Birck, R, Schmitt, WH, et al. (2006). "Serial ANCA determinations for monitoring disease activity in patients with ANCA-associated vasculitis: systematic review." Am J Kidney Dis **47**(1): 15-23.
- Bosch, X, Guilabert, A, et al. (2006). "Antineutrophil cytoplasmic antibodies." Lancet **368**(9533): 404-18.
- Brenchley, JM, Karandikar, NJ, et al. (2003). "Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells." Blood **101**(7): 2711-20.
- Brijker, F, Magee, CC, Tervaert, JW (1999). "Outcome of patients with vasculitis associated with antineutrophil cytoplasmatic antibodies." Clin Nephrol **52**: 344-351.
- Brouwer, E, Huitema, MG, et al. (1993). "Antimyeloperoxidase-associated proliferative glomerulonephritis: an animal model." J Exp Med **177**(4): 905-14.
- Brouwer, E, Huitema, MG, et al. (1994). "Neutrophil activation in vitro and in vivo in Wegener's granulomatosis." Kidney Int **45**(4): 1120-31.
- Brouwer, E, Stegeman, CA, et al. (1994). "T cell reactivity to proteinase 3 and myeloperoxidase in patients with Wegener's granulomatosis (WG)." Clin Exp Immunol **98**(3): 448-53.
- Carruthers, D and Watts, R (1996). "Wegener's granulomatosis-increased incidence or increased recognition?" Br J Rheumatol.
- Choi, H, Liu, S, Merkel, PA, et al. (2001). "Diagnostic performance of antineutrophil cytoplasmic antibody tests for idiopathic vasculitides: metaanalysis with a focus on antimyeloperoxidase antibodies." J Rheumatol **28**(7): 1584-90.
- Christensen, J, Andreassen, S, et al. (2001). "CD11b expression as a marker to distinguish between recently activated effector CD8(+) T cells and memory cells." Int Immunol **13**(4): 593-600.
- Csernok, E, Ernst, M, Schmitt, WH (1994). "Activated neutrophils express proteinase 3 on their plasma membrane in vitro and in vivo." Clin Exp Immunol **95**: 244-250.

- Dallegrì, F and Ottonello, L (1997). "Tissue injury in neutrophilic inflammation." Inflamm Res **46**(10): 382-91.
- Davies, D, et al (1982). "Segmental necrotizing glomerulonephritis with antineutrophil cytoplasmic antibody: possible arbovirus etiology?" Br Med J **285**: 606.
- Edwards, SW, Moulding, DA, et al. (2003). "Regulation of neutrophil apoptosis." Chem Immunol Allergy **83**: 204-24.
- Falk, R, et al. (1990). "Anti neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce of oxygen radicals in vitro." Proc Natl Acad Sci USA **87**: 4115-4119.
- Fanger, NA, Liu, C, et al. (1997). "Activation of human T cells by major histocompatibility complex class II expressing neutrophils: proliferation in the presence of superantigen, but not tetanus toxoid." Blood **89**(11): 4128-35.
- Fauci, A, Wolff, SM (1974). "Wegener's granulomatosis: studies in 18 patients and a review of the literature." Medicine (Baltimore) **52**: 535-561.
- Fauci, AS, Haynes, BF, et al. (1983). "Wegener's granulomatosis: prospective clinical and therapeutic experience with 85 patients for 21 years." Ann Intern Med **98**(1): 76-85.
- Fiorentini, S, Licenziati, S, et al. (2001). "CD11b expression identifies CD8+CD28+ T lymphocytes with phenotype and function of both naive/memory and effector cells." J Immunol **166**(2): 900-7.
- Giscombe, R, Nityanand, S, Lewin, N, Grunewald, J, Lefvert, AK (1998). "Expanded T-cell populations in patients with Wegener's granulomatosis: characteristics and correlates with disease activity." J Clin Immunol **18**(6): 404-413.
- Godman, G, Churg, J (1954). "Wegener's granulomatosis: Pathology and review of the literature." Arch Pathol **58**: 533-553.
- Griffith, ME, Coulthart, A, et al. (1996). "T cell responses to myeloperoxidase (MPO) and proteinase 3 (PR3) in patients with systemic vasculitis." Clin Exp Immunol **103**(2): 253-8.
- Gross, WL (1999). "Primär systemische Vaskulitiden." Der Internist(40): 1194-1215.
- Guillevin, L, Durand-Gasselin, B. (1999). "Microscopic polyangiitis: clinical and laboratory findings in eighty-five patients." Arthritis Rheum **42**: 421-430.
- Gunton, J, Stiel, J, Clifton-Bligh, P, et al. (2000). "Prevalence of positive antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) in patients receiving anti-thyroid medication." Eur J Endocrinol **142**: 587-590.

- Hagen, E, Daha, MR, Hermans, J, et al. (1998). "Diagnostic value of standardized assays for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. EC/BCR Project for ANCA Assay Standardization." Kidney Int **53**(3): 743-53.
- Haller, H, et al (1996). "Circulating leukocyte integrin expression in Wegener's granulomatosis." J Am Soc Nephrol.
- Han, WK, Choi, HK, et al. (2003). "Serial ANCA titers: useful tool for prevention of relapses in ANCA-associated vasculitis." Kidney Int **63**(3): 1079-85.
- Hänsch, G, et al. (1999). "Expression of major histocompatibility antigens in polymorphonuclear neutrophils in patients with Wegener's granulomatosis." Kidney int.
- Hänsch, G, Wagner, C (2003). "Expression of MHC class II antigen and coreceptor molecules in polymorphonuclear neutrophils." Chem Immunol Allergy **83**: 45-63.
- Harper, L, Radford, D, et al. (2001). "IgG from myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody-positive patients stimulates greater activation of primed neutrophils than IgG from proteinase 3-antineutrophil cytoplasmic antibody-positive patients." Arthritis Rheum **44**(4): 921-30.
- Hoffman, G and Fauci, A (1992). "Wegener's granulomatosis: An analysis of 158 patients." Ann Intern Med **116**: 488-498.
- Hoffman, GS (1994). "'Wegener's granulomatosis': the path traveled since 1931." Medicine (Baltimore) **73**(6): 325-9.
- Iking-Konert, C, Vogt, S, et al. (2001). "Polymorphonuclear neutrophils in Wegener's granulomatosis acquire characteristics of antigen presenting cells." Kidney Int **60**(6): 2247-62.
- Iking-Konert, C, Wagner, C, et al. (2002). "Up-regulation of the dendritic cell marker CD83 on polymorphonuclear neutrophils (PMN): divergent expression in acute bacterial infections and chronic inflammatory disease." Clin Exp Immunol **130**(3): 501-8.
- Jayne, D and Gaskin, G, Rasmussen, N, Abramowicz, D, Ferrario, F, Guillevin, L, Mirapeix, E, Savage, CO, Sinico, RA, Stegeman, CA, Westman, KW, van der Woude, FJ, Lind van Wijngaarden, RAF, Pusey, CD (2006). "Randomised trial of plasma exchange or high dose methyl prednisolone as adjunctive therapy for severe renal vasculitis." Curr Opin Nephrol Hypertens **15**(6): 603-609.
- Jayne, D and Rasmussen, N, Andrassy, K, et al. (2003). "A randomized trial of maintenance therapy for vasculitis with antineutrophil cytoplasmic antibodies." N Engl J Med **349**: 36-44.

- Jennette, JC, Falk, RJ, et al. (1994). "Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference." Arthritis Rheum **37**(2): 187-92.
- Joy, M and Hogan, S, Jennette, JC, et al (2005). "A pilot study using mycophenolate mofetil in relapsing or resistant ANCA small vessel vasculitis." Nephrol Dial Transplant **20** (12): 2725-2732.
- Keogan, MT, Esnault, VL, et al. (1992). "Activation of normal neutrophils by anti-neutrophil cytoplasm antibodies." Clin Exp Immunol **90**(2): 228-34.
- Keogh, K and Ytterberg, S, Fervenza, FC, et al. (2006). "Rituximab for refractory Wegener's granulomatosis: report of a prospective, open-label pilot trial." Am J Respir Crit Care Med **173** (2): 180-187.
- Kerr, G (1993). "Limited prognostic value of changes in antineutrophil-cytoplasmic antibody titer in patients with Wegener's granulomatosis." Arthritis Rheum **36**: 365-371.
- Klemmer, P and Chalermskulrat, W, Reif, MS, et al. (2003). "Plasmapheresis therapy for diffuse alveolar hemorrhage in patients with small vessel vasculitis." Am J Kidney Dis **42** (6): 1149-1153.
- Klinger, H (1931). "Grenzformen der Panarteritis nodosa." Frankf Z Pathol **42**: 455-480.
- Kocher, M, Edberg, JC, et al. (1998). "Antineutrophil cytoplasmic antibodies preferentially engage Fc gammaRIIIb on human neutrophils." J Immunol **161**(12): 6909-14.
- Komocsi, A, Lamprecht, P, et al. (2002). "Peripheral blood and granuloma CD4(+)CD28(-) T cells are a major source of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in Wegener's granulomatosis." Am J Pathol **160**(5): 1717-24.
- Kussmaul, A, Maier, R (1866). "Über eine bisher nicht beschriebene eigenthümliche Arterienerkrankung (Periarteritis nodosa), die mit Morbus Brightii und rapid fortschreitender Muskellähmung einhergeht." Deut Arch Klin Med **1**: 484-515.
- Kyndt, X, Reumaux, D, et al. (1999). "Serial measurements of antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in patients with systemic vasculitis." Am J Med **106**(5): 527-33.
- Lamprecht, P, Erdmann, A, et al. (2003). "Heterogeneity of CD4 and CD8+ memory T cells in localized and generalized Wegener's granulomatosis." Arthritis Res Ther **5**(1): R25-31.
- Lamprecht, P, Moosig, F, et al. (2001). "CD28 negative T-cells are enriched in granulomatous lesions of the respiratory tract in Wegener's granulomatosis." Thorax **56**: 751-757.

- Lamprecht, P and Voswinkel, J, Lilienthal, T, et al. (2002). "Effectiveness of TNF-alpha blockade with infliximab in refractory Wegener's granulomatosis." Rheumatology (Oxf) **41**: 1303-1307.
- Langfort, C (2003). "Treatment of ANCA associated vasculitis." N Engl J Med **349**.
- Langfort, C, Sneller, MC (2001). "Update on the diagnosis and treatment on Wegener's granulomatosis." Adv Intern Med **46**.
- Leavitt, R, Fauci AS, Bloch, DA; et al. (1990). "The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Wegener's granulomatosis." Arthritis Rheum **33**: 1103.
- Lhote, F, Cohen, P. (1996). "Microscopic polyangiitis: clinical aspects and treatment." Ann Med intern **147**: 165-177.
- Luqmani, RA, Bacon, PA, et al. (1994). "Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) in systemic necrotizing vasculitis." Qjm **87**(11): 671-8.
- Marinaki, S, Neumann, I, et al. (2005). "Abnormalities of CD4 T cell subpopulations in ANCA-associated vasculitis." Clin Exp Immunol **140**(1): 181-91.
- McFarland, HI, Nahill, SR, et al. (1992). "CD11b (Mac-1): a marker for CD8+ cytotoxic T cell activation and memory in virus infection." J Immunol **149**(4): 1326-33.
- Metzler, C, Fink, P, Lamprecht, W, Gross, L, Reinhold-Keller (2004). "Maintenance of remission with leflunomide in Wegener's granulomatosis." Rheumatology **43**: 315–320.
- Muller Kobold, A, Mesander, G, Stegeman, CA, Kallenberg, CG, Tervaert, JW (1998). "Are circulating neutrophils intravascularly activated in patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitides?" Clin Exp Immunol **114**(3): 491-9.
- Nolle, B, Specks, U, et al. (1989). "Anticytoplasmic autoantibodies: their immunodiagnostic value in Wegener granulomatosis." Ann Intern Med **111**(1): 28-40.
- Nowack, R, Grab, I, et al. (2001). "ANCA titres, even of IgG subclasses, and soluble CD14 fail to predict relapses in patients with ANCA-associated vasculitis." Nephrol Dial Transplant **16**(8): 1631-7.
- Popa, ER, Franssen, CF, et al. (2002). "In vitro cytokine production and proliferation of T cells from patients with anti-proteinase 3- and antimyeloperoxidase-associated vasculitis, in response to proteinase 3 and myeloperoxidase." Arthritis Rheum **46**(7): 1894-904.

- Porges, AJ, Redecha, PB, et al. (1994). "Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies engage and activate human neutrophils via Fc gamma RIIa." J Immunol **153**(3): 1271-80.
- Radsak, M, Iking-Konert, C, et al. (2000). "Polymorphonuclear neutrophils as accessory cells for T-cell activation: major histocompatibility complex class II restricted antigen-dependent induction of T-cell proliferation." Immunology **101**(4): 521-30.
- Rahman, T and Harper, L (2006). "Plasmapheresis in nephrology: an update." Curr Opin Nephrol Hypertens **15**(6): 603-9.
- Reinhold-Keller, E (2000). "An interdisciplinary approach to the care of patients with Wegener's granulomatosis. long term outcome in 155 patients." Arthritis Rheum.
- Reinhold-Keller, E (2001). "Severe CNS manifestations as the clinical hallmark in generalized Wegeners granulomatosis consistently negative for antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). A report of 3 cases and a review of the literature." Clin Exp Rheumatol **19**: 541-549.
- Reinhold-Keller, E and Herlin, K (2002). "No differences in the incidences of vasculitis between north and south germany: first results of the German vasculitis register." Rheumatology (Oxf) **41**: 540-549.
- Reinhold-Keller, E and Zeidler, A (1996). "Epidemiology of primary systemic vasculitis (PSV) in north and south Germany." Sarcoidosis.
- Reinisch, W, Tillinger, W, et al. (1996). "In vivo induction of HLA-DR on human neutrophils in patients treated with interferon-gamma." Blood **87**(7): 3068.
- Sarraf, P and Sneller, MC (2005). "Pathogenesis of Wegener's granulomatosis: current concepts." Expert Rev Mol Med **7**(8): 1-19.
- Savage, C, Winearls, CG, Evans, DJ, Rees, EJ, Lockwood, CM (1985). "Microscopic polyarteritis: presentation, pathology and prognosis." QJM **56**: 467-483.
- Savigne, J, Dimech, W, et al. (2003). "Addendum to the International Consensus Statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies. Quality control guidelines, comments, and recommendations for testing in other autoimmune diseases." Am J Clin Pathol **120**(3): 312-8.
- Schlesier, M, Kaspar, T, Gutfleisch, J, et al. (1995). "Activated CD4+ and CD8+ T-cell subsets in Wegener's granulomatosis." Rheumatol Int **14**: 213-219.
- Schmitt, W (2005). "Association of clinical autoimmune manifestations with autoantibodies in patients with hepatitis C virus infection under treatment with interferon-alpha." Kidney Blood Press Res **28**: 184.

- Schmitt, WH, Hagen, EC, et al. (2004). "Treatment of refractory Wegener's granulomatosis with antithymocyte globulin (ATG): an open study in 15 patients." Kidney Int **65**(4): 1440-8.
- Schonermark, U, Lamprecht, P, et al. (2001). "Prevalence and spectrum of rheumatic diseases associated with proteinase 3-antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) and myeloperoxidase-ANCA." Rheumatology (Oxford) **40**(2): 178-84.
- Schreiber, A, Luft, FC, et al. (2004). "Membrane proteinase 3 expression and ANCA-induced neutrophil activation." Kidney Int **65**(6): 2172-83.
- Slot, MC, Tervaert, JW, et al. (2004). "Positive classic antineutrophil cytoplasmic antibody (C-ANCA) titer at switch to azathioprine therapy associated with relapse in proteinase 3-related vasculitis." Arthritis Rheum **51**(2): 269-73.
- Specks, U (1998). "Pulmonary vasculitis." Interstitial Lung disease.
- Specks, U (2005). "Methotrexate for Wegener's Granulomatosis: What Is the Evidence?" Arthritis Rheum **52**: 2237-2242.
- Spriewald, BM, Witzke, O, et al. (2005). "Distinct tumour necrosis factor alpha, interferon gamma, interleukin 10, and cytotoxic T cell antigen 4 gene polymorphisms in disease occurrence and end stage renal disease in Wegener's granulomatosis." Ann Rheum Dis **64**(3): 457-61.
- Steiner, K, Moosig, F, et al. (2001). "Increased expression of CTLA-4 (CD152) by T and B lymphocytes in Wegener's granulomatosis." Clin Exp Immunol **126**(1): 143-50.
- Vallejo, AN (2005). "CD28 extinction in human T cells: altered functions and the program of T-cell senescence." Immunol Rev **205**: 158-69.
- van der Geld, YM, Huitema, MG, et al. (2000). "In vitro T lymphocyte responses to proteinase 3 (PR3) and linear peptides of PR3 in patients with Wegener's granulomatosis (WG)." Clin Exp Immunol **122**(3): 504-13.
- van der Woude, FJ, Rasmussen, N, et al. (1985). "Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis." Lancet **1**(8426): 425-29.
- Vogt, S, Iking-Konert, C (2003). "Shortening of telomeres: evidence for replicative senescence of t-cells derived from patients with Wegener's granulomatosis." Kidney int. **63**: 2144-51.
- Wagner, C and Hansch, GM (2006). "Receptors for complement C3 on T-lymphocytes: relics of evolution or functional molecules?" Mol Immunol **43**(1-2): 22-30.
- Watts, R and Lane, S (2000). "Epidemiology of systemic vasculitis. -a ten year study." Arthritis Rheum. **43**(2):414-19.

- Wegener, F (1939). "Über eine eigenartige rhinogene Granulomatose mit besonderer Beteiligung des Arteriensystems und der Nieren." Beitr Pathol Anat Allg Pathol **39**: 36-68.
- Weidner, S, Carl, M, et al. (2004). "Histologic analysis of renal leukocyte infiltration in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis: importance of monocyte and neutrophil infiltration in tissue damage." Arthritis Rheum **50**(11): 3651-7.
- Westmann, K, Bygren, PG, et al. (1998). "Relapse rate, renal survival or cancer morbidity in patients with Wegeners granulomatosis or microscopic polyangiitis with renal involvement." JASN **9**: 842-852.
- Wohlwill, F (1923). "Über die nur mikroskopisch erkennbare Form der Polyarteriitis nodosa." Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin **246**: 377-411.

8 Anhang

8.1 Veröffentlichungen

Tag des wissenschaftlichen Nachwuchses der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 2005	T-Zell Aktivierung bei Patienten mit Wegener´scher Granulomatose: Expansion von CD8+CD28- Klonen, Auftreten zytotoxischer Effektorzellen und Nachweis „replikativer Seneszenz“
Oxford Journals Rheumatology 2008 (47:609–616)	T lymphocytes in patients with primary vasculitis: Expansion of CD8+ T cells with the propensity to activate polymorphonuclear neutrophils Abstract Objectives: To gain insight into the immune pathogenesis of primary ANCA-associated vasculitides, the prevalence of circulating T lymphocytes expressing CD11b as a marker for activation was analyzed in patients with Wegener's granulomatosis or microscopic polyangiitis. Methods: Receptor expression and γ interferon (IFN) synthesis were measured in T cells of patients with active disease by cytofluorometry and compared with expression in patients in remission and in healthy donors. Results: During active disease, a small but conspicuous population of CD8+CD28+CD11b+ was found which produced γ IFN. In healthy donors and in patients in remission or undergoing immunosuppressive therapy, CD11b was exclusively associated with CD8+CD28- cells, the latter being more frequent in patients with long-lasting or severe disease. In vitro experiments confirmed that CD11b is up-regulated when T cells are activated. After multiple rounds of restimulation the CD11b expression persists whereas CD28 expression is lost, compatible with the notion that CD8+CD28+CD11b+ represents a transient phenotype in the course of T cell activation. The γ IFN-producing T cells activated PMN to express major histocompatibility antigens (MHC) class II, thus generating the same PMN phenotype as in patients with active ANCA-associated vasculitis. A similar PMN phenotype could be generated by cultivation with supernatants of activated T cells or by γ IFN alone, but not by antibodies to proteinase 3. Conclusions: In active primary vasculitis a small population of CD8+ T cells, identified by the expression of CD11b, expands, producing γ IFN. These T cells could activate PMN, thus generating a long-living and potentially destructive PMN phenotype.
Clinical and experimental Rheumatology 2009 (27:S19-24)	Expression of CD57 on CD8+ T lymphocytes of patients with ANCA associated vasculitis: evidence for continuous activation of CD8+ cells AbstractObjectives: To gain insight into the immune pathogenesis of primary ANCA-associated vasculitides (AAV), the prevalence of circulating CD8 + T

	lymphocytes expressing CD57 as a marker for previous activation was analyzed in patients with AAV. Methods: Receptor expression of CD57 was measured in CD8+ T cells of patients with active disease (n = 5) by cytofluorometry and compared with expression in patients in remission and in age (n = 80) matched healthy donors (n = 34). The results were compared to clinical parameters including severity and duration of the disease. Results: CD8+CD57+ were detected in patients with ANCA-associated vasculitis and in healthy donors as well and increased considerably with age. Compared to age-matched healthy donors, the prevalence of CD8+CD57+ was increased in the younger patients (up to 40 y). In most patients a high percentage of CD8+CD57+ coincided with severe disease and multiple organ involvement, while low CD8+CD57+ percentage was seen in patients with limited disease or in patients in complete remission. In patients with smoldering disease, the percentage of CD8+CD57+ increased with time. High numbers of CD8+CD57+ correlated with low CD4:CD8 ratio. Conclusions: In patients with ANCA-associated vasculitis a population of CD8+/CD57+ expand, identifying terminally differentiated CD8+ cells. The prevalence of CD57+ cells was related to the course of disease. So far, the function of CD57 on CD8+ cells is not understood, however these cells might produce certain cytokines, playing a role in the pathogenesis of AAV. The data support the hypothesis that CD8+ T cells are activated in the context of AAV.
--	--

8.2 Tabelle 3: Abkürzungen

AAV	ANCA assoziierte Vaskulitiden
ACR	American College of Rheumatology
ANCA	antineutrophile zytoplasmatische Antikörper
BVAS	Birmingham Vasculitis Activity Score
B-Zellen	B-Lymphozyten
CD	Cluster of differentiation
CHCC	Chapel Hill Consensus Conference
CSS	Churg-Strauss-Syndrom
Cyc	Cyclophosphamid
DC	Dendritische Zellen
γ -IFN	γ -Interferon
IgG	Immunglobulin
IL	Interleukin
MPA	Mikroskopische Polyangiitis
MPO	Myeloperoxidase
MTX	Methotrexat
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PR3	Proteinase 3
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
T-Zellen	T-Lymphozyten
WG	Wegener'sche Granulomatose
ZNS	Zentrales Nervensystem

8.3 Tabelle 4: verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller	Katalog-Nr.	Clone
Simultest Control $\gamma 1/\gamma 2a$	Becton Dickinson	342409	
PerCP Mouse IgG1 isotype control	BD Bioscience	550672	
Fastimmune $\gamma 1/\gamma 1/CD3$	Becton Dickinson	340369	X40, SK7
CD4 FITC	Becton Dickinson	340133	SK3
CCR7 PE	Becton Dickinson	552176	3D12
CD8 PE	Becton Dickinson	340046	SK1
Anti-CD8 MicroBeads	Miltenyi Biotecs, Germany		
Anti-CD15 MicroBeads	Miltenyi Biotecs, Germany		
CD11b FITC	Biozol	03258	ICRF44
CD28 PE	Serotec	0103B	YTH 913.12
CD28 FITC	Dako Cytamation	F7163	CD28.1
CD57 FITC	Becton Dickinson	555619	NK-1
CD195 (CCR5) FITC	Becton Dickinson	555992	2D7/CCR5
Interleukin-2 FITC	BD Bioscience	340448	5344.111
Interferon- γ FITC	BD Bioscience	340449	25723.11
Granzym B FITC	Kamiya Biomedical Company	MC-223	B18.1
MHC II	Serotec		WR18
CD66b FITC	Immunotech		80 H3
CD14	Serotec		UCHM1
CD64PE	Serotec		10.1

8.4 Tabelle 5: Materialliste

Material	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
Dulbecco's PBS W/o Ca, Mg (phosphate buffered saline)		PAA	H15-002
BSA (Bovine serum albumin)		SIGMA Steinheim, Germany	A7906
Natrium acid		SIGMA Steinheim, Germany	S8032
Cytofix buffer	1:4 mit FACS- Puffer	BD PharMingen® Heidelberg, Germany	554655
FACS Lysing Solution	1:10 mit Aqua dest.	Becton Dickinson	349202
Cellwash		Becton Dickinson	349524
Polystyrene Roundbottom Tube 5ml		Falcon Heidelberg, Germany	
FACS Permeabilizing Solution 2	1:10 mit FACS-Puffer	BD Biosciences	340973
RPMI 1640		Biochrom	FG1215
Brefeldin A		SIGMA Steinheim, Germany	B-7651
PMA		SIGMA Steinheim, Germany	P-1585
Ionomycin		SIGMA Steinheim, Germany	I-0634
24 Well Platte		Greiner, Germany	662160
FACS-Puffer	500ml PBS, 5g BSA, 0,5g NaN ₃		
PHA		Biochrom	M 5030

8.5 Tabelle 6: ELK Klassifikation

Organbeteiligung	Anamnese
E oberer Respirationstrakt	Blutiger Schnupfen, verlegte Nasenatmung, chron. Nebenhöhlenentzündung, Heiserkeit, Ohrgeräusche, Mittelohrentzündungen, Taubheit, Schwindel
L Lunge	Bluthusten, Luftnot
K Niere	Hämaturie, Ödeme, schaumiger Urin
Ey Auge	Schmerzhafte Rötung, Tränengangsstenose, Visusverlust
H Herz	Infarkte, pektanginöse Beschwerden, Rhythmusstörungen
GI Gastrointestinaltrakt	Krämpfe, blutige Durchfälle
S Haut	Erhabene flohstichartige Effloreszenzen (palpable Purpura), Ulzera
P peripheres Nervensystem	Taubheitsgefühl, Missempfindungen, Fußheberschwäche
C zentrales Nervensystem	Kopfschmerzen, Sehstörung, Lähmungen, Hirnnervenlähmungen
A rheumatische Beschwerden	
B -Symptome	Adynamie, Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust

Erweiterte ELK-Klassifikation (nach deRemee 1976, erweitert nach de Groot und Reinhold-Keller 1996), Anamnestische Hinweise auf Wegener'sche Granulomatose und interdisziplinäre Diagnostik.

8.6 Tabelle 7: ACR-Kriterien zur Klassifikation von Vaskulitiden

Kriterien für die Klassifikation der Wegener'schen Granulomatose

Kriterium	Beschreibung
Nasale oder orale Entzündung	Schmerzhafte nasale oder orale Ulzerationen oder purulenter oder blutiger Schnupfen
Abnormale Thorax Radiographie	Knoten, fixe Infiltrate oder Höhlen
Urinsediment	Mikroskopische Hämaturie (>5 Erythrozyten/high-power Feld) oder Erythrozyten casts
Granulomatöse Entzündung in der Biopsie	Granulomatöse Entzündung innerhalb der Wand einer Arterie oder in der peri- oder extravaskulären Gegend

Das Vorkommen von zwei oder mehr dieser Kriterien bei einem Patient mit Vaskulitis deutet auf die Diagnose Wegener'sche Granulomatose (Leavitt 1990).