

Aus der Klinik für Nephrologie / Hypertensiologie der
Franz-Volhard-Klinik
Medizinische Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Klinische Relevanz der Membran-PR3 Expression von
neutrophilen Granulozyten

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Björn Otto
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. Kettritz

2. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. M. Gollasch

3. Prof. Dr. med. K. H. Neumann

Datum der Promotion: 18.09.2009

1	Einleitung	6
1.1	Vaskulitiden	6
1.2	Wegener'sche Granulomatose	7
1.3	Ziel der Arbeit	24
2	Material und Methoden	25
2.1	Kohorten	25
2.2	Klinische Datenbank	26
2.3	Labordaten	29
2.4	Histologie	30
2.5	Therapie	30
2.6	Bestimmung der mPR3-Expression neutrophiler Granulozyten	31
2.7	Statistik	33
2.8	Material	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Gesamtkohorte	35
3.2	WG-Kohorte	36
3.3	mPR3-Expression in der WG- und Kontrollkohorte	37
3.4	WG-Kohorte im Verlauf (Jahres- und Rezidivdaten)	41
3.5	Klinik und Organbeteiligung (Erstdiagnose- und Rezidivdaten)	49
3.6	Paraklinik (Erstdiagnose-, Jahres- und Rezidivdaten)	55
3.7	Biopsien und Histologien	60
3.8	Therapie (Erstdiagnose-, Jahres- und Rezidivdaten)	61
4	Diskussion	63
4.1	Membrangebundene Proteinase 3	63
4.2	Einschränkungen	67
4.3	Biopsien	68
4.4	Jahreszeiten	68
4.5	Bewertungssysteme	69
4.6	Organbeteiligung	69

4.7	Remission, Rezidiv und Verlauf	70
4.8	Aussichten	71
5	Zusammenfassung	73
6	Summary	74
7	Literaturverzeichnis	75
8	Abkürzungsverzeichnis	90
9	Abbildungsverzeichnis	91
10	Anhang	94

Wir müssen unbedingt Raum für Zweifel lassen, sonst gibt es keinen Fortschritt, kein Dazulernen. Man kann nichts Neues herausfinden, wenn man nicht vorher eine Frage stellt. Und um zu fragen, bedarf es des Zweifelns. Die Leute suchen immer nach Gewissheit. Es gibt aber keine Gewissheit. Und sie haben schreckliche Angst - wie kann man leben und nicht wissen? Das ist gar nicht so schwer. Tatsache ist, sie glauben lediglich, etwas zu wissen. Und die meisten ihrer Handlungen gründen auf unvollständigem Wissen - in Wirklichkeit wissen sie nicht, was das alles soll, kennen Sie den Sinn und Zweck der Welt nicht. (Feynman 2003)

Richard P. Feynman (1918 - 1988), 1965 Nobelpreis für Physik

1 Einleitung

1.1 Vaskulitiden

Primäre Vaskulitiden unterteilt man nach der *Chapel Hill Consensus Conference* 1992 (Jennette and Falk 1997) in drei Gruppen. In der ersten Gruppe finden sich Vaskulitiden der kleinen Gefäße, in der Zweiten jene der mittelgroßen und in der Dritten, die der großen Gefäße. Das Augenmerk dieser Arbeit ist auf die erste Gruppe gerichtet. Sie umfasst die ANCA-assoziierten Vaskulitiden der kleinen Gefäße. Zu ihnen gehören die Wegener'sche Granulomatose (WG), das Churg-Strauss-Syndrom (CSS), die mikroskopische Polyangiitis (mPA) sowie die isolierte nekrotisierende extrakapillär-proliferative Glomerulonephritis (nCGN).

Diese Vaskulitiden sind durch massive vaskuläre und perivaskuläre inflammatorische Prozesse gekennzeichnet, die letztendlich zur Ausbildung von fibrinoiden Gefäßwandnekrosen führen. Charakteristisch ist dabei der serologische Nachweis großer Antikörpermengen. Sie werden als Anti-Neutrophile-Cytoplasmatische-Antikörper (ANCA) bezeichnet, da sie gegen Proteine neutrophiler Granulozyten gerichtet sind.

Davies et al. berichteten erstmals über Patienten mit einer nekrotisierenden Glomerulonephritis, bei denen ANCA an Ethanol-fixierten Granulozyten durch indirekte Immunfluoreszenz (iIF) nachgewiesen werden konnten (Davies / Moran et al. 1982).

Die Assoziation zwischen dem Auftreten von ANCA mit der WG beschrieb van der Woude 1985 (van der Woude / Rasmussen et al. 1985). Seine Arbeitsgruppe beobachtete mit der indirekten Immunfluoreszenz zwei unterschiedliche Fluoreszenztypen an Ethanol-fixierten Granulozyten: einen als cytoplasmatischer ANCA (c-ANCA) bezeichneter Antikörper, der granuläre cytoplasmatische Strukturen anfärbt, und einen als perinukleärer ANCA (p-ANCA) bezeichneter, welcher perinukleäre Strukturen anfärbt.

Als Hauptzielantigen der c-ANCA ist eine 29-kDa-Serin-Protease, Proteinase 3 (PR3) (Goldschmeding / van der Schoot et al. 1989; Niles / McCluskey et al. 1989) sowie für p-ANCA die Myeloperoxidase (MPO) (Falk and Jennette 1988) beschrieben. Als seltenere Zielantigene wurden Serin-Proteasen, der azurophilen Granula, wie *bactericidal permeability increasing Protein* (Schultz / Weiss et al. 2001), *humane neutrophile Elastase* (Wiesner / Russell et al. 2004), Kathepsin G (Halbwachs-Mecarelli

/ Nusbaum et al. 1992) und aus den sekundären Granula Laktoferrin (Coremans / Hagen et al. 1992; Hauschild / Schmitt et al. 1993) sowie Lysozym (Schmitt / Csernok et al. 1993) beschrieben.

Bei der WG erhält man in 80 – 90 % einen positiven ANCA-Nachweis. In 80 – 95 % (Hoffman and Specks 1998) besteht ein cytoplasmatisches Färbemuster mit spezifischen Antikörpern gegen PR3 (van der Woude / Rasmussen et al. 1985; Specks / Wiegert et al. 1997). Ein perinukleäres Färbemuster mit einer Spezifität gegen MPO besteht bei der mPA, dem CSS und der nCGN mit Halbmondbildung (Hoffman and Specks 1998).

1.2 Wegener'sche Granulomatose

Geschichte

Der deutsche Pathologe Friedrich Wegener (geboren am 7. April 1907 in Varel; verstorben am 9. Juli 1990 in Lübeck) beschrieb 1936 an drei Patienten eine eigenartige Kleingefäßerkrankung mit granulomatösen Entzündungsherden (Wegener 1936). Wegener arbeitete am pathologischen Institut in Kiel und interessierte sich für verschiedene granulomatöse Erkrankungen. Er vermutete, dass es sich hierbei um eine eigene Entität handele und beschrieb diese 1939 als rhinogene sowie pneumogene granulomatöse Entzündung des arteriellen Systems sowie der Nieren (Wegener 1939). Es folgten Veröffentlichungen von Ringertz (1947) und Johnson (1948). In einer Übersichtsarbeit von Godman und Churg über 22 Fallberichte und sieben selbst behandelte Patienten wurde erstmals der Begriff „Wegener'sche Granulomatose“ verwandt. Durch ihre Veröffentlichung prägten sie das Eponym und machten es international bekannt (Godman and Churg 1954). Unter dieser Bezeichnung ist die Erkrankung bis zum heutigen Tage bekannt und mit ihrem Erstbeschreiber verbunden. Seit dem Jahre 2000, bis zum Zeitpunkt der Niederlegung dieser Arbeit, diskutiert man eine Aberkennung des Eponyms „Wegener'sche Granulomatose“ (Woywodt and Matteson 2006), aufgrund einer Beteiligung Friedrich Wegeners am NS-Regime (im Zeitraum 1933-1945: seit 1932 Sturmabteilungsmitglied, seit 1933 NSDAP-Mitglied, NS-Ärztbund, Sanitätsobersturmbannführer der SA sowie ziviler Pathologe im polnischen Lodz in der Nähe eines jüdischen Ghettos). Eine ähnliche Diskussion wurde im Herbst 2007 durch das *American College of Chest Physicians* geführt, da Wegener 1989 dort

mit dem „*Master Clinician Award*“ geehrt worden war. Eine Aberkennung wurde bisher abgelehnt (Rosen 2007).

Klinik

Klassischerweise präsentieren sich die Patienten mit einer Beteiligung des oberen Respirationstraktes bzw. der Lungen (ein Drittel dieser Patienten ist asymptomatisch) sowie der Nieren (Hoffman / Kerr et al. 1992; Duna / Galperin et al. 1995).

Die Klinik des oberen Respirationstraktes besteht überwiegend aus Symptomen wie persistierender Rhinorrhoe mit purulentem oder blutigem Auslauf, oralen und / oder nasalen Ulcerationen oder Sinusschmerz.

Im Rahmen der nekrotisierenden alveolären Kapillariitis kommt es oft zu Dyspnoe, Husten, Hämoptysen sowie pleuralem Schmerz. Im Röntgen der Lunge finden sich Rundherde, Kavernen oder diffuse Verschattungen, die alveoläre Hämorrhagien widerspiegeln (Cordier / Valeyre et al. 1990).

Weniger häufige Symptome des oberen Respirationstraktes sind Heiserkeit, Stridor, Otagie, fortleitungsbedingter und / oder sensorischer Hörverlust oder Otorrhoe (Seo and Stone 2004).

Die Nierenbeteiligung manifestiert sich als akutes Nierenversagen (AKI) oder als rapid progressive Glomerulonephritis mit Mikrohämaturie (aktives Sediment) und Proteinurie (Hoffman / Kerr et al. 1992; Seo and Stone 2004).

Weitere Organbeteiligungen können sein:

- Gelenke: Myalgien, Arthralgien, Arthritis
- Augen: Konjunktivitis, corneale Ulcera, Episkleritis / Scleritis, Opticus-neuropathie, Obstruktion des Ductus nasolacimalis, Proptosis, Diplopie, retinale Vasculitis, Uveitis (Harper / Letko et al. 2001; Fechner / Faquin et al. 2002)]
- Haut: blasenförmige, palpable Purpura, Ulcera und hämorrhagische Läsionen (Daoud / Gibson et al. 1994)
- Nervensystem: Mononeuritis multiplex, ZNS-Beteiligung, Ophthalmoplegie, Hörsturz ggf. mit bleibendem Hörverlust

Sehr seltene Manifestationsorte sind beschrieben im Gastrointestinaltrakt (Pagnoux / Mahr et al. 2005; Strivens / Bateman et al. 2005; Radhakrishnan / Kay et al. 2006; Deniz / Ozseker et al. 2007; Singhal / Goodyear et al. 2007; Yamaguchi / Yoshioka et

al. 2007), am Herzen mit Perikarditis und Myokarditis (Grant / Levy et al. 1994; Goodfield / Bhandari et al. 1995; Klisnick / Souweine et al. 1998; Skare and Zappi 1998), im unteren genitourinalen Trakt inklusive Prostata (Huong / Papo et al. 1995; Davies and Wathen 1997; Gunnarsson / Omdal et al. 2004; Gaber / Ryley et al. 2005; Heldmann / Brandt et al. 2006), des Weiteren an der Parotis (Kavanaugh and Huston 1988; Stuckey and Smart 1992; Lustmann / Segal et al. 1994; Saravanappa / Bibas et al. 2000; Imamoglu / Bahadir et al. 2003; Chegar and Kelley 2004; Jones / Lukaris et al. 2005; Yamamoto / Takahashi et al. 2008), an der Schilddrüse (Schuerwegh / Verhelst et al. 2007), der Leber (Iampol'skaia 1977; Boissy / Bernard et al. 1997) und der Brust (Goebel / Kettritz et al. 1995; Trueb / Pericin et al. 1997; Ivanov 1999; Boucelma / Hakem et al. 2005; Naz and Fairburn 2005; Neralic-Meniga / Ivanovi-Herceg et al. 2006).

In ca. einem Viertel der Fälle kommt es zu einer sogenannten *limited disease*, welche isoliert den oberen Respirationstrakt bzw. die Lunge befällt. Diese Form tritt überwiegend bei jungen weiblichen Patienten auf. Sie zeichnet sich sowohl durch einen chronischen Verlauf mit einer höheren Rückfallquote als auch durch eine höhere Prävalenz von Destruktionen des oberen Respirationstraktes (z. B. Sattelnase) aus. Treten weitere Organbeteiligungen (kardiale, gastrointestinale oder zentrale) auf, manifestieren sich diese weit ausgeprägter und münden lebensbedrohlichen. Im Rahmen der Krankheitsentwicklung können bis zu 80 % dieser Patientengruppe eine Nierenbeteiligung entwickeln (Stone 2003).

In einer prospektiven multizentrischen Studie mit 180 Patienten (Merkel / Lo et al. 2005) wurde eine hohe Rate von tiefen Beinvenenthrombosen oder Lungenarterienembolien beobachtet (7 pro 100 Personenjahre, zum Vergleich sind es bei dem systemischem Lupus erythematodes 1 pro 100). Ähnliches konnten auch Weidner et al. sowie Stassen et al. zeigen (Weidner / Hafezi-Rachti et al. 2006; Stassen / Derks et al. 2008).

Therapie und Verlauf

Um 1950 betrug das mediane Überleben von Patienten mit WG fünf Monate (Walton 1958). Führt man sich vor Augen, dass unbehandelte Patienten innerhalb von zwei Jahren zu 90 % an den Folgen Ihrer Grunderkrankung, durch Komplikationen des

respiratorischen oder renalen Versagens verstarben (Hoffman / Kerr et al. 1992), dann haben aggressive Therapieschemata eine Berechtigung.

Die Standardtherapie zur Remissionsinduktion für Patienten mit organgefährdender oder lebensbedrohlicher Manifestation stellt die Kombination aus Glucocorticoiden mit Cyclophosphamid dar.

Time from entry (weeks)	Prednisolone dosage mg/kg/day	Prednisolone dosage mg/day for 60 kg
0	1	60
1	0.75	45
2	0.5	30
3	0.4	25
4	0.4	25
6	0.33	20
8	0.25	15
	Prednisolone dosage (mg/day)	
12	15	15
16	12.5	12.5
6 months	10	10
During months 12–15	7.5	7.5
During months 15–18	5	5

1. Aktuelles Konsensus Prednisolonschema der EUVAS - (1995)

Die Kombination aus Glucocorticoiden mit täglich verabreichtem oralem Cyclophosphamid (cCyc; 1,5 - 2 mg/kg Körpergewicht pro Tag für drei bis sechs Monate bis zum Erreichen der Remission) induzierte in 85 – 93 % der Fälle eine Remission, wovon 75 % in kompletter Remission waren (Andrassy / Erb et al. 1991; Jayne / Rasmussen et al. 2003; WGET 2005). Im CYCAZAREM Trial wurden 93 % der Remissionen in sechs Monaten erreicht, davon bereits 77 % in den ersten drei Monaten (Jayne / Rasmussen et al. 2003).

Um die Toxizität und damit das Nebenwirkungspotential der Therapie zu senken, änderte man das Therapieschema auf eine einmalige intravenöse Gabe pro Monat (pCyc; 0,5 - 1,0 g/m² Körperoberfläche für drei bis sechs Monate bzw. bis zum Erreichen der Remission) und senkte somit die kumulative Gesamtdosis von Cyclophosphamid. Haubitz et al. konnten eine 57-prozentige Reduktion der kumulativen

Dosis in der pCyc Gruppe zeigen, bei gleichem Überleben, gleicher Zeit bis zur Remission, gleicher Remissions- und Rezidivrate sowie gleichem Nierenüberleben. Die Nebenwirkungen in Form von Leukopenien, schweren Infektionen sowie Gonadentoxizität konnten signifikant vermindert werden (Haubitz / Schellong et al. 1998). De Groot et al. konnten 2001 in einer Meta-Analyse zeigen, dass in der Gesamtheit das Potential der Remissionsinduktion von pCyc dem vom cCyc entsprach und wie erwartet die toxischen Nebeneffekte von pCyc geringer ausfielen. Andererseits fand man in den pCyc Gruppen insgesamt eine höhere Rezidivrate und bei Patienten mit starker Krankheitsaktivität ein schlechteres Therapieansprechen (de Groot / Adu et al. 2001).

Um diese Beobachtungen, offenen Fragen und teils widersprüchlichen Ergebnisse genauer zu beleuchten, wird aktuell ein direkter Vergleich zwischen cCyc und pCyc durchgeführt (CYCLOPS Trial). Die Ergebnisse stehen noch aus.

Patienten mit nicht-lebensbedrohlicher Manifestation zum Zeitpunkt der Erstmanifestation, in der Literatur als *limited disease* aufgeführt, d.h. Patienten, die eine normale Nierenfunktion, aber eine Augenbeteiligung, pulmonale Granulome oder Infiltrate ohne respiratorische Beeinträchtigung aufweisen, sollten Methotrexat (initial 0,3 mg/kg pro Woche, nicht über 15 mg, weitere Steigerung um 2,5 mg pro Woche auf maximal 20 – 25 mg pro Woche) in Kombination mit Glucocorticoiden erhalten, da es für diese Patienten eine gute Alternative zu Cyclophosphamid darstellt (Buhaescu / Covic et al. 2005; WGET 2005).

Nach heutigem Wissensstand sollten Patienten mit schwerer Krankheitsmanifestation, z. B. mit rapid progressiver Glomerulonephritis mit neuer Dialysepflichtigkeit oder lebensbedrohlichem Lungenbluten zum Zeitpunkt der Erstmanifestation, zusätzlich plasmapheriert werden (Pusey / Rees et al. 1991; Jayne / Gaskin et al. 2007). Pusey et al. konnten zeigen, dass von 19 initial dialysepflichtigen Patienten, zehn von elf, die zusätzlich zur medikamentösen Therapie plasmapheriert wurden, ihre Nierenfunktion wiedererlangten im Vergleich zu drei von acht Patienten, die ausschließlich medikamentös behandelt wurden. Ähnliches zeigten Jayne et al. in der MEPEX-Studie. Bereits nach drei Monaten wurde eine Dialyseunabhängigkeit nachgewiesen (in 70 % der zusätzlich mit Plasmapherese behandelten, verglichen mit 50 % der rein medikamentös behandelten Patienten; $p = 0,02$). Überleben und Nebenwirkungen stellten sich in beiden Gruppen gleich dar. Im Mittel wurden sieben Plasmapheresen

über zwei Wochen (60 ml/kg Körpergewicht pro Sitzung), abhängig vom Therapieerfolg durchgeführt (Jayne / Gaskin et al. 2007).

Wie in den zuvor erwähnten Absätzen beschrieben, besteht bei einer Langzeittherapie mit Cyclophosphamid mit wachsender Kumulativdosis ein steigendes Risiko für toxische Nebenwirkungen (Hoffman / Kerr et al. 1992; de Groot / Reinhold-Keller et al. 1996).

Aus diesem Grunde wird nach Remissionsinduktionstherapie (Dauer in der Regel drei bis sechs Monate) auf weniger toxische Substanzen wie Azathioprin oder Methotrexat zurückgegriffen.

Bezüglich therapieresistenter Krankheitsverläufe werden neue Behandlungsansätze gesucht. So konnte eine Open-Label-Studie bei zehn c-ANCA-positiven therapieresistenten WG-Patienten eine erfolgreiche Remissionsinduktion nach drei Monaten mittels Rituximab zeigen (Keogh / Ytterberg et al. 2006). Ergebnisse einer großen randomisierten kontrollierten Studie mit Rituximab bei ANCA-assoziiierter Vaskulitis (RAVE) stehen noch aus.

Pathophysiologie

Mögliche Ursachen und Risikofaktoren

Die Ursache der Erkrankung ist bis zum heutigen Tag ungeklärt. Mögliche Hinweise lassen sich für infektiöse, umgebungsbedingte und / oder genetische Ursachen herleiten.

Aufgrund eines klinisch als infektiöses Geschehen im Vordergrund stehenden Prozesses mit Jahreszeitenabhängigkeit und primären Manifestationsort in der Lunge sowie im Hals-Nasen-Ohren-Bereich stellten Popa et al. Arbeiten zusammen, die sich mit dieser Beobachtung befassten. In der Zusammenschau fand sich das Superantigen von *Staphylokokkus aureus* als mögliche Ursache für die chronisch entzündliche Aktivität sowie als Auslöser der Erkrankung (Popa and Tervaert 2003). Andere infektiöse Ursachen ließen sich nicht zeigen.

Stegeman et al. entdeckten als Erste einen Zusammenhang zwischen nasalem *Staphylokokkus aureus*-Nachweis und dem Auftreten eines Rezidivs. Sie quantifizierten dies mit einem relativen Risiko für das Auftreten eines Rezidivs von 9,0 (Stegeman / Tervaert et al. 1994). Um diese These zu untermauern, konnte 1996 die gleiche Arbeitsgruppe zeigen, dass eine prophylaktische Cotrimoxazolgabe zu einer 60-prozentigen Reduktion der Rezidive führte (Stegeman / Tervaert et al. 1996).

In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass das Staphylokokkus aureus-Antigen mittels Ladungsinteraktionen besonders an die Basalmembran der Niere bindet, gefolgt von der Verbindung mit dem verwandten Antikörper (Brons / Bakker et al. 2000).

Pendergraft et al. fanden bei Patienten mit Antikörpern gegen das bekannte Autoantigen PR3 zusätzlich Antikörper, die einerseits das Proteinprodukt der Antisense-DNA von PR3 (*complementary PR3*, cPR3) andererseits auch das Epitop des c-ANCA des Patienten erkannten (Pendergraft / Preston et al. 2004). Die Arbeitsgruppe konnte ebenfalls zeigen, dass Mäuse, die mit dem Antisense-Protein von PR3 oder mit der Antisense-Proteinsequenz (cPR3 105-201) immunisiert wurden, nicht nur cPR3-spezifische Antikörper, sondern auch c-ANCA entwickelten. Interessanterweise zeigen einige Peptide von Staphylokokkus aureus eine starke Homologie zu diesem Antisense-Protein.

Betrachtet man den oben beschriebenen Manifestationsort (HNO-Bereich) und nimmt eine nicht-infektiöse Genese an, so muss man Inhalate in Erwägung ziehen. Hogan et al. konnten z. B. eine vierfach höhere Exposition zu Silikatstaub bei Patienten mit c-ANCA assoziierter Kleingefäßvaskulitis im Vergleich zum Kontrollkollektiv nachweisen (Hogan / Satterly et al. 2001). Beaudreuil et al. beschrieben ein 2,6-fach höheres Risiko ANCA zu bilden für Silikatstaub-exponierte Personen verglichen zu einem 3,4-fach höherem Risiko für beruflich mit Silikat belasteten Patienten (Beaudreuil / Lasfargues et al. 2005).

Es gibt schwache Hinweise für eine genetische Disposition zu geben. So wurde eine signifikante Assoziation eines verkürzten Allels des zytotoxischen T-Lymphozyten assoziierten Antigens 4 (variierende Länge einer Dinukleotidsequenz $(AT)_n$) mit WG beschrieben (Huang / Giscombe et al. 2000). Bezüglich einer HLA-Assoziation gibt es widersprüchliche Daten. Einerseits fanden Zhang et al. keine Assoziation zu einzelnen HLA Merkmalen (Zhang / Jayne et al. 1995), andererseits konnten von Vietinghoff et al. einen Zusammenhang einer HLA-Antigengruppe mit der Diagnose WG sowie paraklinischen Daten und der PR3-Expression neutrophiler Granulozyten aufzeigen (von Vietinghoff / Busjahn et al. 2006).

Weiterhin konnte man, wie bereits von anderen Autoimmunerkrankungen bekannt, ein signifikant häufigeres Vorkommen eines funktionellen Polymorphismus (620W), des Gens einer intrazellulären Tyrosinphosphatase (PTPN22), in einer Population von WG-Patienten finden (Jagiello / Aries et al. 2005).

Bei einer bekannten Dysbalance zwischen Serinproteasen und deren natürlichem Inhibitor α -1 Antitrypsin aufgrund des PiZZ-Genotyps, konnte eine Häufung von ANCA mit nicht klassischen Zielantigenen und fehlender systemischer Vaskulitis festgestellt werden (Audrain / Sesboue et al. 2001). Elzouki et al. sahen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer WG, wenn eine heterozygote PiZ-Genvariante vorlag (Elzouki / Segelmark et al. 1994). Diese Assoziation legt nahe, dass α -1 Antitrypsin den Zugang der ANCA zu ihrem Zielantigen mPR3 kontrolliert (Esnault / Testa et al. 1993). Dies wird unterstützt durch die Beobachtung in Vollblutversuchen, in denen keine ANCA an Neutrophilen gefunden werden konnten, wenn α -1 Antitrypsin an mPR3 gebunden vorlag (Rooney / Taggart et al. 2001).

Betrachtet man das Zielantigen der c-ANCA, die PR3, so nimmt man heute an, dass ihr eine tragende Rolle im Pathomechanismus, als Risikofaktor oder Verlaufsparemeter und gleichsam als prognostischer Faktor von WG-Erkrankten zukommt.

T-Zellen und ihre Bedeutung

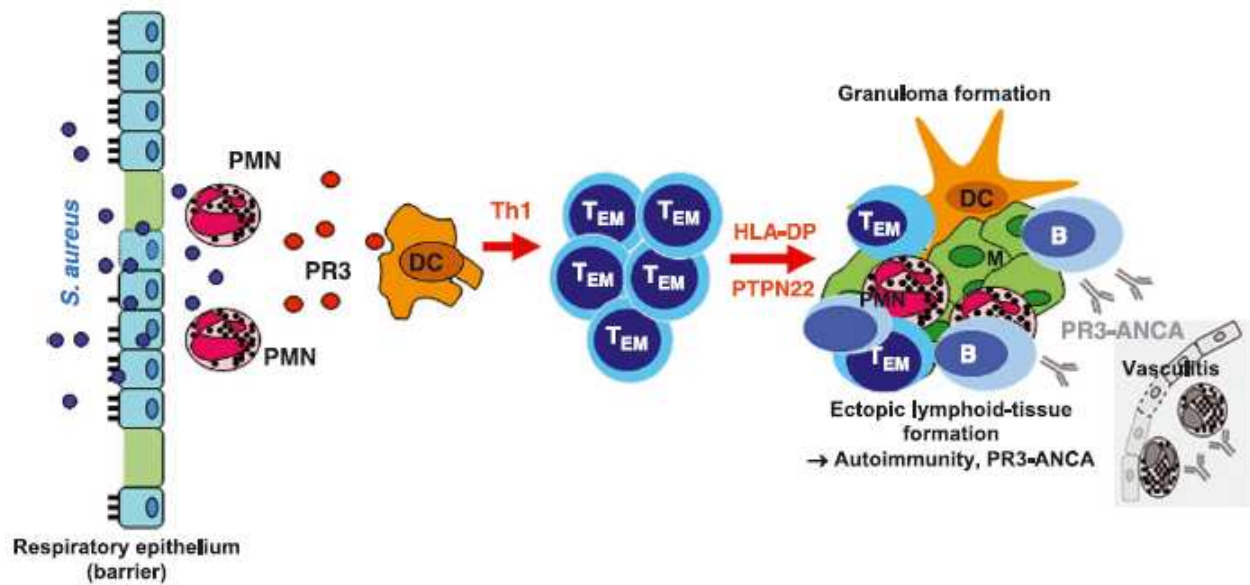
Man geht davon aus, dass es sich im Entstehungsprozess der Erkrankung um zwei Phasen handelt. Fienbergs Hypothese besagt, dass in der ersten Phase eine lokalisierte Entzündungsreaktion mit Granulombildung als Entstehungszentrum für den Autoimmunprozess angesehen werden muss (Fienberg 1989).

Diesbezüglich weiß man aus Daten von WG-Patienten, dass sich in nasalen Biopsien und Bronchiallavagen T-Zellen nachweisen lassen, die auf unspezifische Stimuli ausgeprägte Zytokinantworten mit dominantem T-Helferzell-Muster liefern (Ludviksson / Sneller et al. 1998; Csernok / Trabandt et al. 1999). Eine Ursache hierfür scheint zu sein, dass zu Beginn der Erkrankung eine überwiegende und gesteigerte Expression des *chemokine c-c motif receptors* auf zirkulierenden sowie in Granulomen befindlichen T-Zellen vorherrscht, die zu einer gesteigerten T-Helferzellantwort führt (Lamprecht / Bruhl et al. 2003; Lamprecht / Erdmann et al. 2003). Neuere Daten weisen darauf hin, dass es sich außerdem um eine Vermehrung einer veränderten Subklasse von T-Zellen ($CD4^+$) handelt, denen der co-stimulatorische Faktor CD28 fehlt (Moosig / Csernok et al. 1998). Der Grund hierfür ist unklar. Man weiß aber, dass es nach Aktivierung dieser Zellen zu einer überschießenden Zytokinantwort in Form einer T-Helferzellantwort vom Typ 1 kommt. Interleukin 2, Interferon γ und Tumornekrosefaktor- α (TNF α) führen zur Aktivierung von Makrophagen bzw. neutrophilen Granulozyten und zytotoxischen T-Zellen ($CD8^+$) (Sneller 2002). Betrachtet man diese hochdifferenzierten Effektor-

Gedächtniszellen genauer, dann findet man bei ihnen eine fehlende Apoptose aufgrund einer gesteigerten Expression des Protoonkogens Bcl-2 (Vallejo / Schirmer et al. 2000). Dieses wiederum ist durch eine gesteigerte Expression von zytotoxischem T-Lymphozyten assoziierten Antigen 4 verursacht (Pandiyan / Gartner et al. 2004). Zusammenfassend führt dies zu einer persistierenden, apoptoseresistenten Aktivierung dieser T-Zell-Population, die das Entzündungsgeschehen dauerhaft unterhält.

Signifikante Unterschiede in der Proliferation von T-Zellen als Reaktion auf eine Degranulation aktivierter Neutrophiler zwischen WG-Patienten und gesunden Kontrollen konnte man nicht finden (Rasmussen and Petersen 1993; van der Geld / Huitema et al. 2000). Ein gehäuftes Vorkommen von PR3-spezifischen T-Zellen bei WG-Patienten ist nicht beschrieben (Winek / Mueller et al. 2004).

Zusätzlich ist in der Literatur berichtet, dass WG-Patienten ein gehäuftes Vorkommen fehlerhafter regulatorischer T-Zellen aufweisen. So konnten Abdulahad et al. zeigen, dass in WG-Patienten signifikant mehr zirkulierende regulatorische T-Zellen ($CD4^+ CD25^{high} FoxP3+$) vorkommen. Diese veränderten Zellen führten zu einer verminderten bzw. fehlenden Suppression der reaktiven T-Zellproliferation und somit zu einer verminderten Antigentoleranz (Abdulahad / Stegeman et al. 2007).



- Ein exogener Trigger (z. B. Staphylokokkus aureus) führt zur Schrankendysfunktion, PR3 wird von aktivierten Neutrophilen freigesetzt. Antigen-präsentierende Zellen wie dendritische Zellen werden aktiviert und induzieren eine T-Helferzellantwort. T-Zellen reagieren mit klonaler CD28 Vermehrung. T-Gedächtniszellen unterhalten die chronisch granulomatöse Entzündung und begünstigen eine ektopye Formation von *lymphoid-like tissue* mit granulomatösen Läsionen. Es kommt zur PR3-ANCA Bildung durch autoreaktive Plasmazellen. Die Vasculitis ist geboren. B: B-Zelle, Plasmazelle; DC: dendritische Zelle; PMN: Neutrophile, TEM: T-Gedächtniszelle (Lamprecht / Csernok et al. 2006) – reprinted by permission

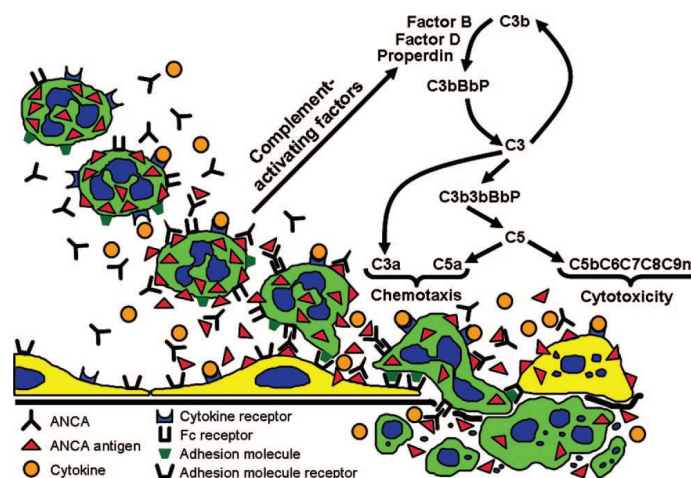
B-Zellen

Culton et al. untersuchten den co-stimulatorischen Komplex (CD21 – CD19 – CD81) des B-Zellrezeptors reifer B-Zellen genauer. Sie fanden bei Patienten mit WG und systemischem Lupus erythematoses eine um ca. 20 % verminderte Expression von CD19 in naiven B-Zellen (CD19^{lo}) sowie eine Subgruppe von Gedächtnis B-Zellen (ca. 30 %), die eine zwei- bis vierfach erhöhte CD19-Expression aufwiesen (CD19^{hi}). Diese Beobachtungen müssen noch interpretiert werden. Als mögliche Folge nimmt man an, dass eine verminderte Signalstärke des B-Zellrezeptors bei CD19^{lo} einerseits einen Immundefekt (Qian / Santiago et al. 2001), andererseits eine gestörte Differenzierung widerspiegelt (Yurasov / Wardemann et al. 2005) und in der Summe zu einer Umgehung der Toleranzselektion führt, da diese abhängig ist von einem starken Signal des B-Zellrezeptors (Culton / Nicholas et al. 2007).

PR3-spezifische sowie kreuzreaktive B-Zellen (kreuzreaktiv mit Superantigen von *Staphylokokkus aureus*) von WG-Patienten weisen ein Immunglobulin-Genrepertoire mit prädominanter variabler schwerer Kette-3 auf (Voswinkel 2004). Culton et al. konnten dies allerdings nicht bestätigen (Culton / Nicholas et al. 2007).

Komplementsystem

Xiao et al. konnten in einem Tiermodell erste Hinweise finden, dass es zu einer ANCA-vermittelten Freisetzung von Faktoren der neutrophilen Granulozyten kommt, die eine Aktivierung des Komplementsystems über den alternativen Weg mittels C3b, zur Folge haben. Nach einer Komplementdepletion oder in Abwesenheit von Neutrophilen war dies nicht der Fall (Xiao / Schreiber et al. 2007).



3. Komplementsystemaktivierung im Rahmen der Vaskulitis (Xiao / Schreiber et al. 2007) – reprinted by permission

Anti-Neutrophile-Cytoplasmatische-Antikörper

Die Frage wie die ANCA induziert werden bleibt bestehen. Eine Hypothese ist die der *molecular mimicry* (Jennette / Xiao et al. 2006). Wie zuvor dargestellt handelt es sich um einen Verlust immunologischer Toleranz insofern, dass körpereigene Antigene nicht mehr als eigene erkannt werden. Ursächlich dafür sieht man Sequenzhomologien körperfremder und körpereigener Proteine, die durch erregerabgeleitete Kreuzreaktivierung von autoreaktiven T- oder B-Zellen eine autoimmunologische Antwort gegen körpereigene Gewebe anstoßen.

ANCA mit dem Zielantigen PR3 sind charakteristisch für die Wegener'sche Granulomatose, kommen aber auch bei anderen Erkrankungen wie dem CSS oder der mPA vor (van der Woude 1985; Goldschmeding / van der Schoot et al. 1989; Niles / McCluskey et al. 1989; Ludemann / Utecht et al. 1990).

Es wird immer wieder diskutiert, welchen Stellenwert die ANCA im Rahmen der Diagnostik und dem Verlauf der Erkrankung haben. Klar ist offenbar, dass der ANCA-Titer einen Spiegel der Krankheitsaktivität darstellt. Diese klinische Beobachtung bestärkt den Verdacht eines kausalen Zusammenhangs der ANCA in der Krankheitsentstehung (Tervaert / Huitema et al. 1990; Kerr / Fleisher et al. 1993) sowie im Verlauf. In mehreren Untersuchungen konnte außerdem beobachtet werden, dass einem bevorstehenden Rezidiv ein Anstieg des ANCA-Titers vorausgehen kann (Tervaert / van der Woude et al. 1989; Egner and Chapel 1990; Kerr / Fleisher et al. 1993; Hoffman and Kerr 1995; Jayne / Gaskin et al. 1995). Eine Arbeitsgruppe um Tervaert et al. konnte durch prophylaktische Therapie (mit Prednisolon und Cyclophosphamid) ein Rezidiv verhindern (Tervaert / Huitema et al. 1990). Dies konnte hingegen von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden (Kerr / Fleisher et al. 1993; Nowack / Grab et al. 2001).

Gegen eine unmittelbar schädigende Wirkung der ANCA selbst spricht das pathologische Bild der „*pauci-immune*“-Glomerulonephritis. Allerdings wiesen Hattar et al. einen Primingeffekt (mittels TNF α) auf humanen renalen Tubulusepithelien mit konsekutiver Hochregulation von mPR3 nach. Weiterhin konnten sie eine c-ANCA-Interaktion mit den renalen Tubuluszellen zeigen. Als Folge dieser Interaktion waren erhöhte intrazelluläre cAMP-Spiegel mit resultierendem oxidativen Stress zu verzeichnen (Hattar / Grandel et al. 2002).

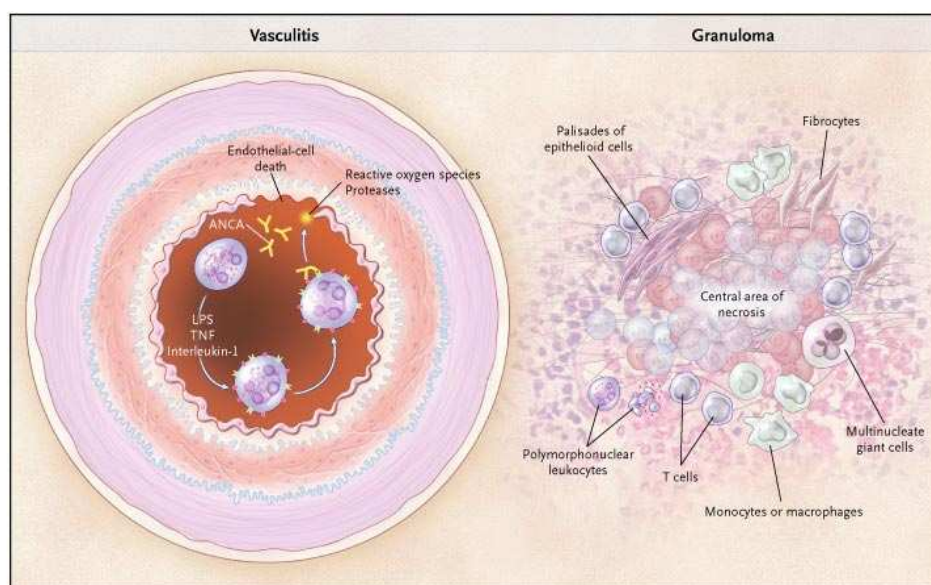
Endothelzellen

Subaktivierte Neutrophile werden durch ANCA vollständig aktiviert. Es kommt zur Bildung von Sauerstoffradikalen, gesteigerter Adhäsion, Degranulation sowie dysregulierter Apoptose (Falk / Terrell et al. 1990; Kettritz / Jennette et al. 1997). Infolge der Aktivierung der neutrophilen Granulozyten und deren Effektormechanismen kann es zu einer Schädigung des Endothels (Ewert / Jennette et al. 1992; Savage / Pottinger et al. 1992) und zur Ausbildung einer fibrinoiden Gefäßwandnekrose kommen. Das Endothel entzündeter Kleingefäße produziert Chemokine [z. B. Interleukin-8 (IL-8), Plättchen aktivierter Faktor, Leukotrien B₄ etc.], die an den Proteoglykanen der luminalen Zelloberfläche gefangen werden. IL-8 stellt einen selektiven Lockreiz für Neutrophile, ohne Effekt auf Monozyten, dar (Premack and Schall 1996; Rollins 1997). Begünstigend für die Interaktion zwischen den neutrophilen Granulozyten und dem Endothel wirkt sich eine Hochregulation von Zelladhäsionsmolekülen auf zirkulierende Zellen wie den Neutrophilen und Monozyten aber auch auf den Endothelzellen aus. Dies konnte durch ANCA in vitro induziert werden (Mayet and Meyer zum Buschenfelde 1993; Johnson / Alexander et al. 1997; Nowack / Schwalbe et al. 2000). Auch durch in vivo Untersuchungen von Haller et al. wurde dieser Effekt der ANCA demonstriert (Haller / Eichhorn et al. 1996). Andere Gruppen konnten dieses Phänomen jedoch nicht bestätigen (Muller Kobold / Kallenberg et al. 1998).

In verschiedenen Arbeiten wurde untersucht, wie es zu der Schädigung der endothelialen Barriere kommen könne. Einerseits vermutete man eine direkte Interaktion der ANCA mit Strukturen der Endothelzellen, die mit der PR3 konformationsabhängige Epitope teilen (De Bandt / Meyer et al. 1999). Andere Arbeiten konnten die Bindung der von Neutrophilen ausgeschütteten Antigene PR3 und MPO an Endothelzellen zeigen (Savage and Cooke 1993; Ballieux / Zondervan et al. 1994; Taekema-Roelvink / Van Kooten et al. 2000). Es wurde beobachtet, dass in deren Folge es zur Apoptose der Endothelzellen und damit zur Unterbrechung der endothelialen Barriere kommt (Yang / Kettritz et al. 1996; Taekema-Roelvink / van Kooten et al. 1998). Eine weitere Hypothese ist die TNF α -induzierte Expression von PR3 auf den Endothelzellen selbst (Mayet / Csernok et al. 1993; Sibelius / Hattar et al. 1998). Diese Ergebnisse konnten von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden (King / Adu et al. 1995; De Bandt / Meyer et al. 1999; Pendergraft / Alcorta et al. 2000) .

Die endotheliale Schrankenschädigung scheint diagnostische Aspekte aufzuweisen. So kommt es zur Freisetzung nekrotischer und prokoagulatorischer Endothelzellen, die

einen zusätzlichen diagnostischen Seromarker darstellen. Haubitz et al. konnten zeigen, dass Patienten mit aktiver Grunderkrankung eine signifikant höhere Anzahl zirkulierender Endothelzellen aufweisen als Patienten der gesunden Kontrollgruppe oder als Patienten in Remission, mit einem Rezidiv oder einer Infektion. Bei einem Schwellenwert von ca. 25 Zellen/ml erreichten sie eine 100-prozentige Spezifität mit einer 92-prozentigen Sensitivität. Eine Standardisierung dieser diagnostischen Untersuchungen sei nötig, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten (Woywodt / Streiber et al. 2003).



4. Links sieht man den Pathomechanismus der ANCA vermittelten Vaskulitis. Im Gefäßlumen sind geprimte neutrophile Granulozyten und deren Interaktion mit ANCA dargestellt. Rechts ist das resultierende Granulom mit zahlreichen unterschiedlichen Zellen gezeigt (Bacon 2005) – reprinted by permission

Neutrophile Granulozyten

Die tragende Rolle im Krankheitsbild der WG stellt die Interaktion der Autoantikörper mit den neutrophilen Granulozyten dar.

Auffällig ist, dass die ANCA gegen Antigene gerichtet sind, die sich innerhalb der Zelle in den intrazellulären Granula befinden.

In-vitro-Experimente haben gezeigt, dass das Priming von Neutrophilen mit proinflammatorischen Mediatoren, wie z. B. $\text{TNF}\alpha$ (Falk / Terrell et al. 1990; Charles /

Caldas et al. 1991; Csernok / Ernst et al. 1994) eine erhöhte Membranexpression von PR3 und MPO induziert (Charles / Caldas et al. 1991; Porges / Redecha et al. 1994; Reumaux / Vossebeld et al. 1995). Dies erklärt, warum Infekte mit entzündlicher Genese zum Triggern der Grunderkrankung führen: die Zielantigene werden vermehrt auf der Oberfläche exprimiert und sind so den ANCA leichter zugänglich. Unterstützt wird diese Hypothese durch Noronha et al., die bei Patienten mit systemischen Vaskulitiden erhöhte TNF α -Konzentrationen messen konnten (Noronha / Kruger et al. 1993). Eine andere Möglichkeit des Primings wurde von Gilligan et al. beschrieben, welche in Abwesenheit von TNF α eine Translokation der Antigene in apoptotischen Neutrophilen fanden (Gilligan / Bredy et al. 1996). Dieser Befund wurde durch eine Studie von Harper bestätigt (Harper / Cockwell et al. 2001).

Stegeman et al. zeigten, dass *Staphylokokkus aureus* für die Auslösung von Krankheitsrezidiven von Bedeutung ist und mit einer antibiotischen Sanierung und Dauertherapie das Risiko eines Rezidivs reduziert werden kann (Stegeman / Tervaert et al. 1994).

Die z. B. durch TNF α subaktivierten neutrophilen Granulozyten können mittels ANCA vollständig aktiviert werden (Brouwer / Tervaert et al. 1991; Keogan / Esnault et al. 1992). Es kommt zur Produktion von Sauerstoffradikalen (Falk / Terrell et al. 1990; Kettritz / Jennette et al. 1997) und zur Degranulation (Reumaux / Vossebeld et al. 1995; Franssen / Huitema et al. 1999). In der Zusammenschau kommt es zu einer lokalen destruierenden Entzündung.

Ein Charakteristikum nekrotisierender Vaskulitiden ist die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten und Monozyten innerhalb der Mikrozirkulation, wie z. B. den Glomeruli. Intravaskuläres IL-8 führt, im Gegensatz zu extravaskulär gebildetem, zur Sequestration der Neutrophilen innerhalb der Mikrozirkulation und zur verminderten transendothelialen Migration (Hechtman / Cybulsky et al. 1991; Simonet / Hughes et al. 1994). Cockwell et al. bestimmten hohe in vivo IL-8-Konzentrationen innerhalb der betroffenen Glomeruli und wiesen den hemmenden Einfluss von IL-8 auf die transendotheliale Migration von Neutrophilen in vitro nach (Cockwell / Brooks et al. 1999). Des Weiteren konnte durch Kettritz et al. gezeigt werden, dass IL-8 die TNF α -induzierte Apoptose der Neutrophilen hemmt und es zu einer verminderten Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffradikalen kommt (Kettritz / Gaido et al. 1998).

ANCA können die autokrine Produktion von IL-8 durch Neutrophile und Monozyten stimulieren (Berger / Seelen et al. 1996; Ralston / Marsh et al. 1997).

In der Summe der autokrinen Produkte (Sauerstoffradikale, proteolytische Enzyme) wird die Adhäsion und Migration der Neutrophilen moduliert (Mayet and Meyer zum Buschenfelde 1993; Radford / Luu et al. 2001) und eine F-Actin-Polymerisation induziert, die zur Zellversteifung führt. Es resultiert eine Akkumulation von Neutrophilen in glomerulären Kapillaren (Buttrum / Drost et al. 1994; Radford / Luu et al. 2001; Tse / Nash et al. 2005).

Um die Schlüsselrolle der neutrophilen Granulozyten im aktiven Krankheitsgeschehen zu unterstreichen, zeigten Xiao et al. in einem ANCA-assoziierten Vaskulitis- / Glomerulonephritis-Mausmodell, dass eine Neutrophilen-Depletion in vivo mittels monoklonaler Antikörper einen kompletten Schutz vor der Entwicklung nCGN bietet (Xiao / Heeringa et al. 2005).

Proteinase 3

Was macht den neutrophilen Granulozyten so wichtig? Wie eingangs beschrieben, ist die Interaktion subaktivierter Neutrophiler mit c-ANCA ausschlaggebend für den Aktivierungsprozess. Wie wir wissen, ist das Hauptzielantigen der c-ANCA die neutrophile Serinproteinase 3 (PR3) (Campanelli / Melchior et al. 1990).

PR3 ist eine von vier homologen neutralen Serinproteinasen, welche überwiegend in azurophilen Granula und zu einem geringen Teil in sekretorischen oder spezifischen Granula von Neutrophilen und in Lysosomen von Monozyten vorkommt (Dewald / Rindler-Ludwig et al. 1975; Gabay / Heiple et al. 1986; Rao / Wehner et al. 1991). Im Laufe der Zeit fand man heraus, dass das initial beschriebene Zielantigen p29 identisch mit PR3 ist (Niles / McCluskey et al. 1989; Gupta / Niles et al. 1990; Jenne / Tschopp et al. 1990). PR3 war zuvor auch unter den Namen azurophiles Granula-Protein 7 (Wilde / Snable et al. 1990) oder unter Myeloblastin bekannt (Labbaye / Musette et al. 1991). Es wurde als Myeloblastin bezeichnet, da der Einfluss auf das Wachstum sowie die Differenzierung von Leukämiezellen bekannt war (Bories / Raynal et al. 1989).

Weiterhin wissen wir, dass Neutrophile ein klares bimodales PR3-Expressionsmuster von 10 – 90 % aufweisen (Halbwachs-Mecarelli / Bessou et al. 1995; Witko-Sarsat / Lesavre et al. 1999) und dies bereits im ruhenden Zustand. Im Gegensatz dazu benötigt die Myeloperoxidase eine ausreichende Zellaktivierung, um an der Zelloberfläche nachweisbar zu sein (Halbwachs-Mecarelli / Bessou et al. 1995).

Die bimodale PR3-Expression steht für zwei Subpopulationen von Neutrophilen. Man gibt den Anteil der mPR3-exprimierenden Neutrophilen prozentual von der Gesamtzellzahl an. Weißt ein Individuum eine Expression von 50 % auf, sind beide Populationen gleich groß. Weist ein Individuum eine mPR3-Expression von 90 % auf, so exprimieren 90 % der gesamten neutrophilen Granulozyten PR3, die restlichen 10 % exprimieren kein PR3. Die bimodale Expression ist intraindividuell stabil und spezifisch, unabhängig vom Aktivitätsgrad der Neutrophilen (Halbwachs-Mecarelli / Bessou et al. 1995; Witko-Sarsat / Lesavre et al. 1999).

Dieses typische Expressionsmuster war bisher als einzigartige Eigenschaft speziell für PR3 beschrieben. Von Vietinghoff et al. konnten jedoch zeigen, dass PR3 abhängig von einem weiteren Molekül mit exakt dem gleichen Expressionsmuster auf der Zelloberfläche von Neutrophilen exprimiert wird (von Vietinghoff / Tunnemann et al. 2007).

Stellt man sich nun vor, dass bei einer durchschnittlichen Lebensdauer eines neutrophilen Granulozyten von ca. sechs Stunden die mPR3-Expression in einem Individuum über Jahre hinweg stabil bleibt und nicht durch chronische Entzündungen oder Aktivität der Grunderkrankung beeinflusst wird, dann liegt eine genetische Regulation nahe (Halbwachs-Mecarelli / Bessou et al. 1995; Witko-Sarsat / Lesavre et al. 1999; Schreiber / Busjahn et al. 2003; van Rossum / Limburg et al. 2003; Borgmann and Haubitz 2004; Schreiber / Otto et al. 2005). Ein gewichtiges Argument lieferten Schreiber et al. mit ihren Untersuchungen an Zwillingen. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass monozygote Zwillinge im Gegensatz zu heterozygoten, das gleiche Expressionsmuster aufweisen (Schreiber / Busjahn et al. 2003).

c-ANCA-stimulierte Neutrophile aus der Subpopulation mit mPR3-Expression weisen eine signifikant höhere Sauerstoffradikalbildung und Degranulation auf als Neutrophile aus der Subpopulation mit geringer bzw. keiner mPR3-Expression (Schreiber / Luft et al. 2004). Eine hohe mPR3-Expression ist mit einem erhöhten Risiko für ANCA-assoziierte Vaskulitiden sowie Rheumatoide Arthritis vergesellschaftet (Muller Kobold / Kallenberg et al. 1998; Witko-Sarsat / Lesavre et al. 1999).

1.3 Ziel der Arbeit

Es besteht ein experimenteller Zusammenhang zwischen der Menge an membrangebundener Proteinase 3 (mPR3) sowie der Größe der mPR3 exprimierenden Subpopulation von neutrophilen Granulozyten zu ihrer Reaktion nach PR3-ANCA Stimulation.

Aufgabenstellung dieser Arbeit ist es, einen Zusammenhang zwischen der mPR3 Expression Neutrophiler Granulozyten und dem klinischen Schweregrad der Erkrankung zum Zeitpunkt der Erstdiagnose sowie dem Verlauf (z.B.: Nierenüberleben) von Patienten mit Wegener'scher Granulomatose zu zeigen.

Zu diesem Zwecke wurde eine relationale Datenbank mittels Filemaker® erstellt. Die Daten sollten es erlauben:

- eine Kohortenbeschreibung (Demographie, Klinik, Organbeteiligung, Paraklinik, Histologie, Therapie)
- Verlaufsdaten (ein Jahr nach Erstdiagnose, Ende des Beobachtungszeitraumes, Rezidive)
- die mPR3-Expression neutrophiler Granulozyten von Patienten sowie gesunden Kontrollen

zu erfassen.

Arbeitshypothesen waren:

- die mPR3-Expression ist intraindividuell stabil
- WG-Patienten haben eine höhere mPR3-Expression als gesunde Kontrollen
- eine höhere mPR3-Expression führt zu objektivierbaren schlechteren klinischen und / oder paraklinischen Parametern zum Zeitpunkt der Präsentation und im Krankheitsverlauf.

2 Material und Methoden

2.1 Kohorten

Ziel war es von 100 WG-Patienten, den Prozentsatz mPR3-positiver Neutrophiler, also die mPR3-Expression, zu ermitteln (Typisierung) und deren kompletten Krankheitsverlauf aufzuarbeiten. Die Typisierung erfolgte nach Einwilligung des Patienten im Zeitraum von 19.04.2000 bis 31.08.2006 im Rahmen einer Vorstellung in unserer Abteilung. Es wurden 28 Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, elf Patienten im Rahmen eines Rezidivs sowie 61 Patienten bei Routineuntersuchungen in unserer Poliklinik oder im Rahmen eines therapeutischen Aufenthaltes gesehen. Eingeschlossen wurden WG-Patienten, die typisiert waren und deren Krankheitsverlauf vom Zeitpunkt der Erstdiagnose an nachvollziehbar war. Die Datenauswertung erfolgte mit dem Datenstand des Stichtags, dem 04.09.2006.

Die Diagnose wurde mittels der Kriterien der *Chapel Hill Consensus Conference* (Jennette / Falk et al. 1994) und denen des *American College of Rheumatology* (Leavitt / Fauci et al. 1990) gestellt.

Wir gehen davon aus, dass die 100 WG-Patienten, die im Folgenden diskutiert werden, repräsentativ für unsere Gesamtkohorte von insgesamt 172 WG-Patienten (Stand 04.09.2006) sind. Von den restlichen 72 WG-Patienten sind von 27 nur Basisdaten zur Person und von 45 Patienten Daten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bekannt [damaliges Alter ($56,9 \pm 15,5$ Jahre), Geschlecht (w : m, 30 : 42), maximales Kreatinin ($351 \pm 304,6$) und *Birmingham vasculitis activity score* (BVAS; $17,7 \pm 7,4$)].

Wichtig erscheint der Hinweis, dass von diesen 72 WG-Patienten bereits neun verstorben sind (drei im Rahmen der WG, drei an anderen Ursachen, wie gastrointestinale Blutung, pneumogene Sepsis, Blastenschub bei Osteomyelofibrose; bei den restlichen drei Patienten fehlt eine Information).

Die Kohorte spiegelt einen Beobachtungszeitraum von 1985 bis 2006 wider.

Eine zusätzliche Kohorte aus insgesamt 232 gesunden und freiwilligen Spendern wurde zu Kontrollzwecken untersucht.

Alle 332 Personen wurden nach Einwilligung bezüglich ihrer mPR3-Expression untersucht und der Krankheitsverlauf der 100 Patienten aufgearbeitet.

2.2 Klinische Datenbank

Die Datenerfassung erfolgte über eine eigens von mir erstellte relationale Filemaker® Datenbank, die ihren täglichen Routineeinsatz in der Poliklinik sowie im Stationsalltag findet. Sie wurde speziell für WG-Patienten entworfen. Angelehnt an den Stand der heutigen Wissenschaft ist eine Aktivitäts- bzw. Schadenseinschätzung anhand von automatisierten klinischen und paraklinischen Punktesystemen wie BVAS und *Vasculitis damage index* (VDI) möglich (Kallenberg / Tervaert et al. 1990; Exley / Bacon et al. 1997). Mit Hilfe des BVAS ist die aktuelle Krankheitsaktivität (Remission bzw. Rezidiv) des Patienten zu objektivieren [komplette Remission: BVAS 0, partielle Remission: BVAS 0 - 2, kleines Rezidiv (minor Relaps): BVAS > 2 - 5, großes Rezidiv (major Relaps): BVAS > 5; Bestimmung erfolgt im Abstand von drei Monaten (Kallenberg / Tervaert et al. 1990)].

Tick box only if abnormality is newly present or worsening within the previous 4 weeks and ascribable to vasculitis.

<u>1. SYSTEMIC</u>	<u>4. ENT</u>	<u>7. ABDOMINAL</u>
malaise <input type="radio"/> yes	nasal discharge obstruction <input type="radio"/> yes	abdominal pain <input type="radio"/> yes
myalgia <input type="radio"/> yes	sinusitis <input type="radio"/> yes	bloody diarrhoea <input type="radio"/> yes
arthralgia / arthritis <input type="radio"/> yes	epistaxis <input type="radio"/> yes	gall bladder perforation <input type="radio"/> yes
fever less 38,5°C <input type="radio"/> yes	crusting <input type="radio"/> yes	gut infarction <input type="radio"/> yes
fever more then 38,5°C <input type="radio"/> yes	aural discharge <input type="radio"/> yes	pancreatitis <input type="radio"/> yes
wt loss 1 to 2kg <input type="radio"/> yes	otitis <input type="radio"/> yes	
wt loss more then 2kg <input type="radio"/> yes	new deafness <input type="radio"/> yes	
	hoarseness laryngitis <input type="radio"/> yes	
	subglottic involment <input type="radio"/> yes	
<u>2. CUTANEOUS</u>	<u>5. CHEST</u>	<u>8. RENAL</u>
infarct <input type="radio"/> yes	dyspnoe wheeze <input type="radio"/> yes	hypertension (diast. >90) <input type="radio"/> yes
purpura <input type="radio"/> yes	nodules or fibrosis <input type="radio"/> yes	proteinuria >0,2g/d <input type="radio"/> yes
other scin vasculitis <input type="radio"/> yes	pleural effusion, plearisy <input type="radio"/> yes	haematuria >10rbc/ml <input type="radio"/> yes
ulcer <input type="radio"/> yes	infiltrate <input type="radio"/> yes	creatinine 125-249µmol/l <input type="radio"/> yes
gangrene <input type="radio"/> yes	haemoptysis, haemorrhage <input type="radio"/> yes	creatinine 249-500µmol/l <input type="radio"/> yes
multiple digit gangrene <input type="radio"/> yes	massive haemoptysis <input type="radio"/> yes	creatinine >500µmol/l <input type="radio"/> yes
		rise in creatinine >10% <input type="radio"/> yes
<u>3. MUCOUS MEMBRANES</u>	<u>6. CARDIOVASCULAR</u>	<u>9. NERVOUS SYSTEM</u>
mouth ulcer <input type="radio"/> yes	bruits <input type="radio"/> yes	organic confusion dementia <input type="radio"/> yes
genital ulcer <input type="radio"/> yes	new loss of pulses <input type="radio"/> yes	seizures <input type="radio"/> yes
conjunctivitis <input type="radio"/> yes	aortis incompetence <input type="radio"/> yes	stroke <input type="radio"/> yes
episcleritis <input type="radio"/> yes	pericarditis <input type="radio"/> yes	cord lesion <input type="radio"/> yes
uveitis <input type="radio"/> yes	new myocardial infarct <input type="radio"/> yes	motor mononeuritis simplex <input type="radio"/> yes
retinal exsudats <input type="radio"/> yes	CCF, cardiomyopathy <input type="radio"/> yes	peripheral neuropathy <input type="radio"/> yes
retinal haemorrhages <input type="radio"/> yes		
		Data complete <input type="radio"/> yes
		SCORE:

5. Die Abbildung zeigt ein Bildschirmfoto des *BVAS-Scores* unserer Vaskulitisedatenbank. Die Auswahl wird per Mausklick getroffen. Der endgültige Punktestand wird nach dem Anklicken von *Data complete* errechnet und erst dann in der Datenbank erfasst.

Mittels VDI wird dokumentiert, welchen bleibenden Schaden die Grundkrankheit hinterlassen hat. Somit erhält man in Kürze detaillierte Informationen über den Krankheits- sowie Therapieverlauf der Patienten. Kumulativdosen gewisser Zytostatika werden automatisch berechnet und halten den behandelnden Arzt auf dem neuesten Stand.

Tick box only if damage has been present for at least 3 months.

<p>Peripheral vascular Disease</p> <ul style="list-style-type: none"> absent peripheral pulses in one limbs <input type="radio"/> yes Subsequent fresh loss of periph. pulses <input type="radio"/> yes absent peripheral pulses in >= 2 limbs <input type="radio"/> yes Major vessel stenosis <input type="radio"/> yes Claudication > 3 months <input type="radio"/> yes Minor tissue loss <input type="radio"/> yes Major tissue loss <input type="radio"/> yes Subsequent major tissue loss <input type="radio"/> yes Complicated venous thrombosis <input type="radio"/> yes 	<p>Pulmonary</p> <ul style="list-style-type: none"> Pulmonary hypertension <input type="radio"/> yes Pulmonary fibrosis/cavity <input type="radio"/> yes Pulmonary infarction <input type="radio"/> yes Pleural fibrosis <input type="radio"/> yes Chronic asthma <input type="radio"/> yes Significant chronic breathlessness <input type="radio"/> yes Impaired pulmonary function tests <input type="radio"/> yes 	<p>Cardiovascular</p> <ul style="list-style-type: none"> Angina or coronary artery bypass <input type="radio"/> yes Myocardial infarction <input type="radio"/> yes second myocardial infarction <input type="radio"/> yes Cardiomyopathy <input type="radio"/> yes Valvular disease <input type="radio"/> yes Pericarditis > 3 months or pericardiectomy <input type="radio"/> yes Hypertension (diastolic BP > 95) or requiring anti-hypertensive drugs <input type="radio"/> yes
<p>Neuropsychiatric</p> <ul style="list-style-type: none"> Cognitive impairment <input type="radio"/> yes major psychosis <input type="radio"/> yes Seizures requiring therapy <input type="radio"/> yes Cerebrovascular accident <input type="radio"/> yes Subsequent cerebrovascular accident <input type="radio"/> yes Cranial nerve lesion (excl. sensorineural deafness and optic nerve lesions) <input type="radio"/> yes Peripheral motor or sensory neuropathy <input type="radio"/> yes Transverse myelitis <input type="radio"/> yes 	<p>Ocular</p> <ul style="list-style-type: none"> Any cataract <input type="radio"/> yes Retinal change <input type="radio"/> yes optic atrophy <input type="radio"/> yes Visual impairment/diplopia <input type="radio"/> yes Blindness in one eye <input type="radio"/> yes Blindness in sec. eye <input type="radio"/> yes Orbital wall destruction (Xray/CT/MRI) <input type="radio"/> yes 	<p>ENT</p> <ul style="list-style-type: none"> Hearing loss <input type="radio"/> yes Nasal blockage/chronic nasal discharge/crusting <input type="radio"/> yes Nasal bridge collapse/sept. perforation <input type="radio"/> yes Chronic sinusitis/radiological evidence of bone destruction <input type="radio"/> yes Subglottal stenosis: without surgical intervention <input type="radio"/> yes with surgical intervention <input type="radio"/> yes
<p>Gastrointestinal</p> <ul style="list-style-type: none"> Gut infarction or resection <input type="radio"/> yes Mesenteric insufficiency or pancreatitis <input type="radio"/> yes chronic peritonitis <input type="radio"/> yes esophageal stricture or upper gastrointestinal tract surgery <input type="radio"/> yes 	<p>Skin/Mucous Membranes</p> <ul style="list-style-type: none"> Alopecia <input type="radio"/> yes Cutaneous ulcerations <input type="radio"/> yes oral ulcerations <input type="radio"/> yes 	<p>Musculoskeletal</p> <ul style="list-style-type: none"> sign. muscle atrophy and weakness <input type="radio"/> yes Deforming or erosive arthritis <input type="radio"/> yes A vascular necrosis <input type="radio"/> yes osteoporosis with fractures or vertebral collapse <input type="radio"/> yes Osteomyelitis <input type="radio"/> yes
<p>Renal</p> <ul style="list-style-type: none"> Estimated or measured GFR < 50% <input type="radio"/> yes Proteinuria 24hr > 0,5g <input type="radio"/> yes End stage renal disease (on renal replacement therapy) <input type="radio"/> yes 	<p>other damage/ drug reaction</p> <ul style="list-style-type: none"> premature gonadal failure <input type="radio"/> yes marrow failure <input type="radio"/> yes diabetes <input type="radio"/> yes chronic chemical cystitis <input type="radio"/> yes malignancy <input type="radio"/> yes 	<p>Data complete <input type="radio"/> yes</p> <p style="font-size: 24pt; text-align: center;">/ 64</p>

6. Die Abbildung zeigt ein Bildschirmfoto des VDI-Scores unserer Vaskulitisdatenbank. Die Auswahl wird mittels eines Mausklicks getroffen. Der endgültige Punktestand wird nach dem Anklicken von *Data complete* errechnet und erst dann in der Datenbank erfasst.

In ähnlicher Weise sind einige Formeln integriert, die automatisch Werte wie z. B. die Cockroft-Clearance / MDRD, Körperoberfläche, Body-Mass-Index und das Alter zur jeweiligen Erhebung angeben.

Gewicht	69,0	kg	BMI	24,4
Größe	168	cm	KO	1,78

7. Bildschirmfoto des *Body Mass Index (BMI)* und Körperoberfläche (KO) als Beispiel der automatisch berechneten Werte

Durch die gute Zusammenarbeit der Ärzte konnte die Datenbank maximal optimiert werden. In diesem Zusammenhang entstanden eine benutzerfreundliche Oberfläche und der Wunsch, die Datenbank für Patienten mit CSS, Lupus erythematodes und MPO-positiven Vaskulitiden anzupassen.

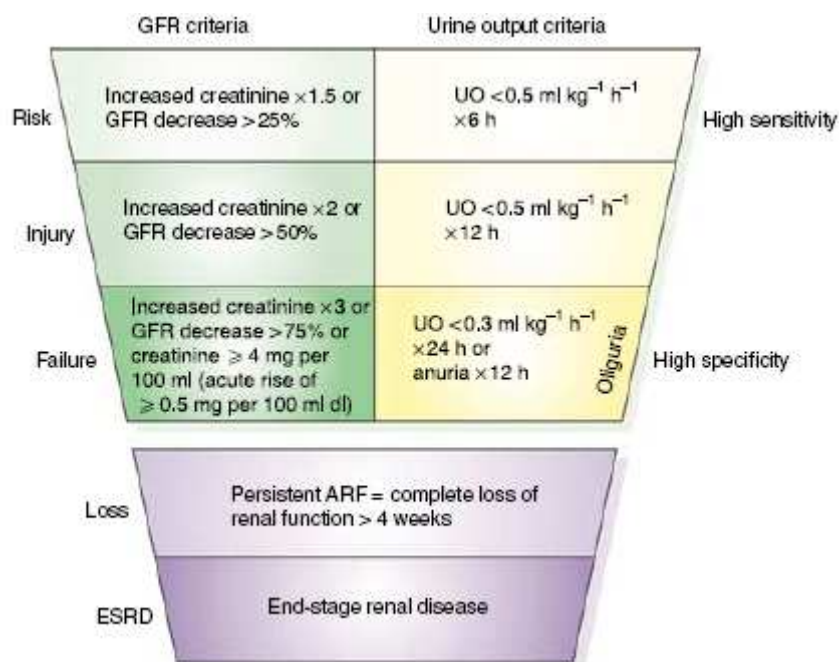
2.3 Labordaten

Routinelaborwerte [Hämoglobin, Thrombozyten, Leukozyten, C-reaktives Protein (CrP), Gesamteiweiß, Albumin und Kreatinin] wurden in der Abteilung für Labormedizin des Klinikums Berlin-Buch bestimmt. ANCA wurden mittels iIF bestimmt. Eine Austitration erfolgte leider nicht immer. Weiterhin wurden im angegebenen Beobachtungszeitraum verschiedene ELISA zur Quantifizierung der c-ANCA verwendet. Aus diesem Grunde werteten wir Patienten ANCA-positiv, wenn die iIF einen Titer von $\geq 1:8$ aufwies und der ELISA einen Nachweis des Zielantigens PR3 oder MPO erbrachte.

Zur Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) wurde die Cockcroft-Gault- / MDRD-Formel verwendet.

Auf dieser Basis erfolgte die Einteilung des akuten Nierenversagens (*acute kidney injury*, AKI) gemäß der RIFLE-Kriterien, wie durch die Arbeitsgruppe *Acute Dialysis Quality Initiative* sowie die drei nephrologischen Gesellschaften (ASN, ISN, und NKF) und die Europäische Gesellschaft für Intensivmedizin empfohlen (Bellomo / Ronco et al. 2004).

Entgegen der folgenden Darstellung wurden keine Ausscheidungsmengen erfasst und fanden somit auch keine Berücksichtigung bei der Einteilung.



8. Schematische Darstellung der RIFLE-Kriterien, separat für Serumkreatinin und / oder Urinmenge (Ricci / Cruz et al. 2008) – reprinted by permission

2.4 Histologie

Die Durchführung der Nierenbiopsien unterlag in der Regel dem zum jeweiligen Zeitpunkt zuständigen Oberarzt. Die Prozedur wurde in Bauchlage des Patienten, ultraschallgestützt mit einer Stanzpistole, vollzogen. Nach Durchführung erfolgte eine 24-stündige Überwachungsphase mit absoluter Bettruhe und gesteigerter Volumenzufuhr. Die Aufsicht wurde nach Ausschluss eines Hämatoms im Punktionsareal der Niere aufgehoben.

Die histologische Aufarbeitung erfolgte zum größten Teil in nephro-histopathologischen Laboren von Prof. Dr. med. W. Schneider. In Einzelfällen wurde die Diagnostik extern durchgeführt.

2.5 Therapie

Die Therapieschemata richteten sich nach dem jeweiligen Wissensstand zum Zeitpunkt der Therapieeinleitung. Eine genauere Darstellung finden Sie im Kapitel 3.8.

2.6 Bestimmung der mPR3-Expression neutrophiler Granulozyten

Isolierung der Zellen

Die Isolation der neutrophilen Granulozyten aus dem Vollblut erfolgte sofort nach venöser Blutentnahme von WG-Patienten bzw. von gesunden erwachsenen Spendern. Als Materialien dienten eine 19 GA Valu-Set Flügelkanüle und eine heparinisierte 20 ml Spritze. Im Anschluss wurden 6 ml Dextran (1 g Dextranpulver in 25 ml 0,9-prozentiger NaCl-Lösung) beigefügt und durch Drehen der Spritze sowie vorsichtiges Schwenken vermischt. Der Überstand, der nach einer Stunde Sedimentationszeit bei Raumtemperatur entstand, wurde mit einer 19GA Flügelkanüle in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Um eine vorzeitige Aktivierung der Zellen zu vermeiden, wurden alle nachfolgenden Schritte bei 4°C durchgeführt.

Der Überstand wurde mit 7,5 ml Histopaque 1083 unterschichtet. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt von 30 Minuten, wobei die ersten 15 Minuten bei 1200 Umdrehungen pro Minute und die folgenden 15 Minuten bei 1050 Umdrehungen pro Minute erfolgten. Aufgrund bestehender Dichteunterschiede führte dies zu einer Trennung der neutrophilen Granulozyten von anderen Zellen. Der nach diesem Zentrifugationsschritt entstandene Überstand wurde verworfen und das Zellpellet weiterverwendet. Im Pellet noch vorhandene Erythrozyten wurden durch eine hypotone Lyse entfernt. Diesbezüglich wurde das Pellet in 10 ml sterilem dH₂O für 15 Sekunden resuspendiert und anschließend 3,33 ml sterile 3,6-prozentige NaCl-Lösung hinzugegeben. Hiermit wurde die physiologische Tonizität wieder hergestellt. Nach erneuter Zentrifugation von 10 Minuten bei 1050 Umdrehungen und Verwerfung des Überstandes wurden die Neutrophilen in *Hanks Balanced Salt Solution* (HBSS⁺⁺-Puffer) mit einer Zellkonzentration von 1×10^7 Zellen pro Milliliter resuspendiert. Durch eine 1:5-Verdünnung mit Trypanblau und anschließendem Auszählen in einem Hämozytometer, welches eine genaue Zellkonzentrationsbestimmung und Unterscheidung lebender und toter Zellen ermöglicht, wurde die Konzentrationseinstellung der Suspension sichergestellt. Diese Isolierungsmethode ergab immer einen Anteil toter Zellen von weniger als einem Prozent und einen mehr als 95-prozentigen Reinheitsgrad neutrophiler Granulozyten – bestimmt mit Lichtmikroskopie nach Wright-Giemsa-Färbung.

Bestimmung der Expression von Proteinase 3 und Myeloperoxidase

Die Oberflächenexpressionen der klassischen Zielantigene der ANCA, PR3 und MPO wurden mit der Durchflusszytometrie (FACS) bestimmt. Frisch isolierte neutrophile Granulozyten in einer Konzentration von 1×10^7 /ml HBSS^{+/+} wurden mit 2 ng/ml TNF α bzw. Pufferkontrolle (HBSS^{+/+}) für 20 Minuten bei 37°C in einem Wasserbad stimuliert. Im Anschluss an diese Primingphase erfolgte ein Wasch- und Zentrifugationsschritt (7 Minuten 200 g, 4°C). Darauffolgend wurden die Primärantikörper der jeweiligen Zielantigene (CLB 12.8 gegen PR 3, MPO-7 gegen MPO und eine Isotypen-Kontrolle) in einer Endkonzentration von 5 μ g/ml hinzugegeben und 25 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach einem erneuten Wasch- und Zentrifugationsschritt wurde ein FITC-konjugiertes anti-Maus-F(ab)2-Fragment der Ziege zur Detektion des Primärantikörpers in das System gegeben. Die Auswertung der Zellen in einem FACS-Scan erfolgte nach erneutem Waschen und Zentrifugieren.

Die Granulozyten wurden durch „*Light-Scatter*“ (Lichtstreuung) identifiziert. Deren Fluoreszenzintensität wurde im FL-1-Kanal (515 – 545 nm für die grüne Fluoreszenz) bestimmt. Jeweils 10 000 Ereignisse wurden gezählt und mittels Software ausgewertet. Angegeben ist die mittlere Fluoreszenzintensität (*Mean-Fluorescence-Intensity*). Die Grundfluoreszenz der FITC-markierten Sekundärantikörper – bestimmt durch den Isotypen – wurde in jedem Experiment abgezogen.

2.7 Statistik

Die Messresultate der FACS-Analysen sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Alle anderen Werte wurden als Mittelwerte \pm SD festgehalten. Bei kleinen Fallzahlen mit quantitativen, stetigen Merkmalen sind unter der Annahme des Nichtvorliegens einer Normalverteilung Medianwerte angegeben. Vergleiche wurden mit dem Students-t-Test (bei Normalverteilung) oder Mann-Whitney-U-Test (unverbundene, nicht normal verteilte Merkmale) durchgeführt. Nichtparametrische Korrelationen, die einen Zusammenhang zwischen untersuchten Merkmalen und der mPR3-Expression zeigen, wurden mittels Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman angegeben. Allen Daten wurde ein Signifikanzlevel von $p < 0,05$ zugrunde gelegt.

Die Daten wurden mittels einer eigens für diese Untersuchung erstellten Filemaker®-Datenbank gesammelt. Die statistischen Auswertungen sowie deren grafische Umsetzung erfolgten mittels Excel und SPSS.

2.8 Material

Eine 19 GA Valu-Set-Flügelkanüle (Becton Dickinson; Luer-Lok) und eine heparinisierte 20 ml Spritze (Braun; Luer) wurden für die Blutabnahmen verwendet. Zur Antikoagulation der Proben wurde Heparin-Natrium-25000 (Ratiopharm® Injektionslösung) eingesetzt.

Ficoll-Hypaque wurde bezogen von der Firma Sigma Deisenhofen FRG, Histopaque 1083 von Sigma Diagnostics USA, Dextran 500 von Amersham Biosciences, HBSS^{+/+} (Hanks Based Salt Solution mit Ca²⁺ und Mg²⁺) von Biochrom AG, Trypan blue von Biochrom AG, Aquadest von Braun / Fresenius, 0,9%ige Natrium-Chlorid-Lösung (NaCl-Lösung) von Fresenius und PBS von Biochrom AG Berlin FRG. Rekombinantes TNF α wurde von R&D Systems (Minneapolis, FRG) erworben. Der monoklonale Maus-Antikörper gegen PR3 (Klon CLB-12.8) wurde von der Firma Sanquin (Amsterdam, Niederlande), der monoklonale Maus-Antikörper gegen MPO (Klon MPO-7), die Isotyp-Kontrolle (IgG1 κ) und ein FITC-konjugiertes F(ab)2-Fragment des Ziege-IgG-anti-Maus wurden von Dako (Hamburg, FRG) erworben. Endotoxinfreie Lösungen und Plastikmaterialien wurden in allen Experimenten benutzt. Die 50 ml Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen wurden von TPP (Schweiz) bezogen.

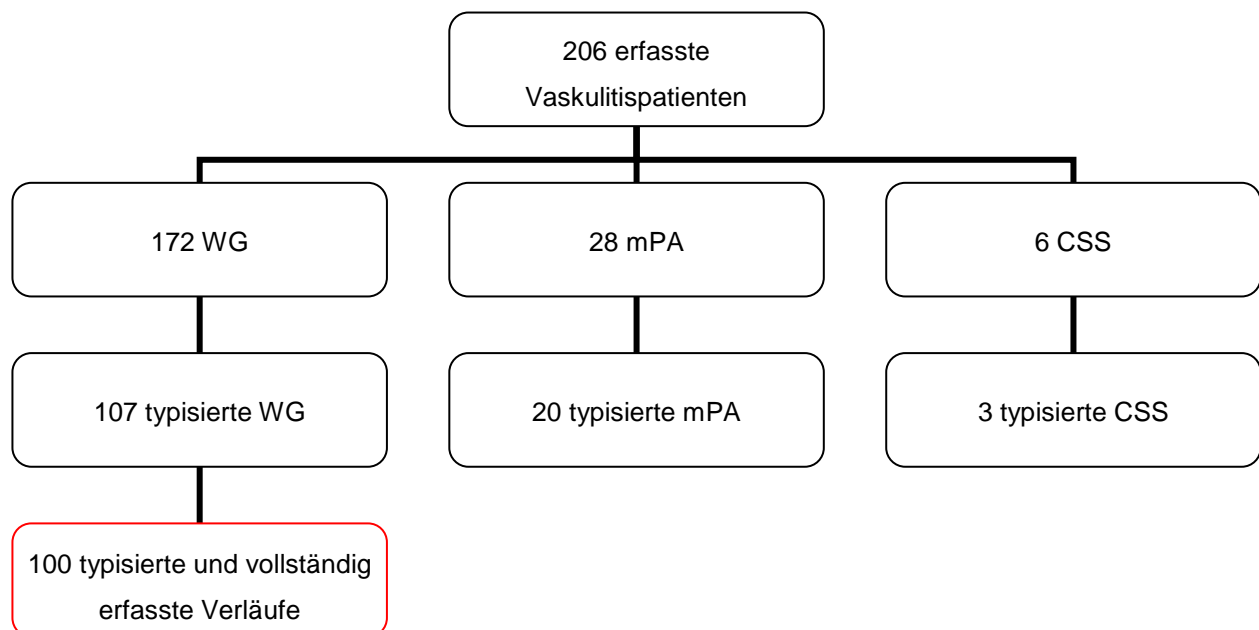
Die FACS-Messungen wurden mit dem Gerät FACScan durchgeführt und mittels der Software CellQuestPro (beides von BD Biosciences, Germany, Heidelberg) analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Gesamtkohorte

Seit 2000 wurden 206 Patienten mit Vaskulitis retro- sowie anterograd erfasst, sodass sich ein Zeitraum von 1985 – 2006 widerspiegeln lässt. Davon hatten 172 Patienten eine WG, 28 eine mPA und sechs ein CSS (siehe Abbildung 9).

Für 130 der 206 erfassten Patienten gelang bis einschließlich 2006 eine mPR3-Typisierung (für weitere Details, wie Auswahlkriterien, Zeitraum siehe Kapitel 2.1). Es waren 107 WG-, 20 mPA- und drei CSS-Patienten. Das durchschnittliche Alter der Patienten in der typisierten Kohorte lag bei 58 ± 14 Jahren. Das durchschnittliche Alter der Kontrollkohorte betrug 35 ± 9 Jahre. Die Geschlechterverteilung der 130 Patienten war ausgeglichen (Absolutzahlen m : w, 67 : 63). In der Kontrollkohorte überwog das weibliche Geschlecht (Absolutzahlen m : w, 95 : 137).



9. Anteil der WG-Patienten an der Gesamtkohorte

Von 206 erfassten Vaskulitispatienten wurden 20 Todesfälle verzeichnet (19 WG, ein mPA).

3.2 WG-Kohorte

Von den 107 typisierten WG-Patienten konnten 100 Patienten mit vollständigem Krankheitsverlauf dokumentiert und deren Verlauf nachvollzogen werden.

Die Geschlechterverteilung war ausgewogen (w : m, 48 : 52). Das durchschnittliche Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose belief sich auf $51,7 \pm 14,1$ (Min. 18, Max. 83) Jahre.

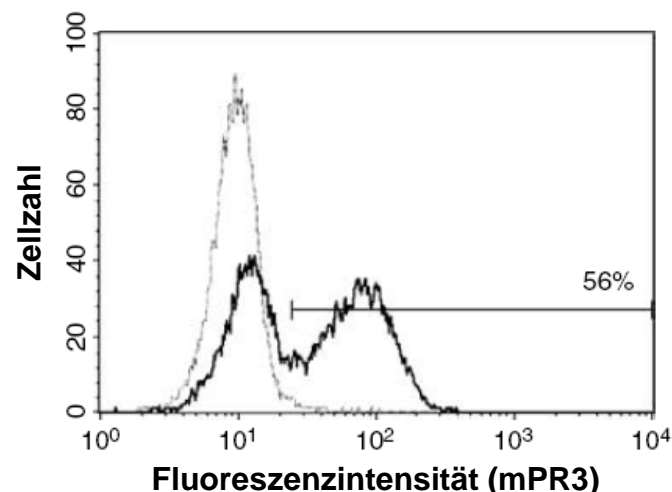
85 % der Patienten waren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose ANCA-positiv. Es wurden ausschließlich c-ANCA nachgewiesen. Der durchschnittliche BVAS lag bei $19,3 \pm 7,6$. Von fünf Patienten lagen keine Werte vor.

In unserer Kohorte erfolgte die Diagnosestellung in 35 % der Fälle in den Sommermonaten, in 24 % im Herbst und in 21 % im Frühling. 20 % unserer Kohorte wurden in den Wintermonaten diagnostiziert. Die Zeit des Symptombeginns bis zur Diagnose konnte zum Großteil nicht nachvollzogen werden, da es retrograde Daten waren.

Der durchschnittliche Beobachtungszeitraum betrug 87 ± 64 Monate.

3.3 mPR3-Expression in der WG- und Kontrollkohorte

Die mPR3-Expression ist überwiegend bimodal. Die Bimodalität spiegelt zwei Subpopulationen der Neutrophilen wider. Eine mit kaum nachweisbaren mPR3 (mPR3^{low}) sowie einer weiteren Population mit mPR3 (mPR3^{high}) auf der Oberfläche. In Abbildung 10 wurde eine Person gewählt, die die klassische bimodale mPR3-Verteilung visualisiert.

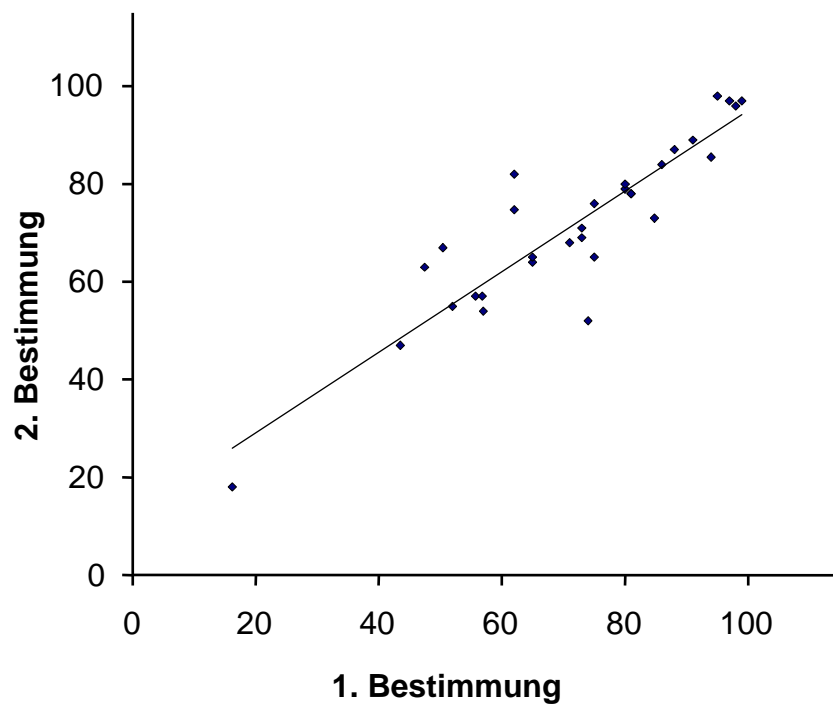


10. Das FACS-Bild zeigt ein bimodales mPR3-Expressionsmuster von einem repräsentativen Patienten mit einer mPR3-Expression von 56 %. Auf der Ordinate (y-Achse) wird linear die Zellzahl dargestellt und auf der Abszisse (x-Achse) logarithmisch die Fluoreszenzintensität. Die gestrichelte, graue Linie stellt eine Negativ-Kontrolle dar. Die schwarze Linie repräsentiert die Patientendaten. Man sieht zwei Peaks, wobei der linke bei 10^1 die mPR3^{low} und der rechte bei 10^2 die mPR3^{high} exprimierende Neutrophilen Subpopulation widerspiegelt.

Die Modalitätenverteilung unserer Kohorte ist in Tabelle 9 dargestellt.

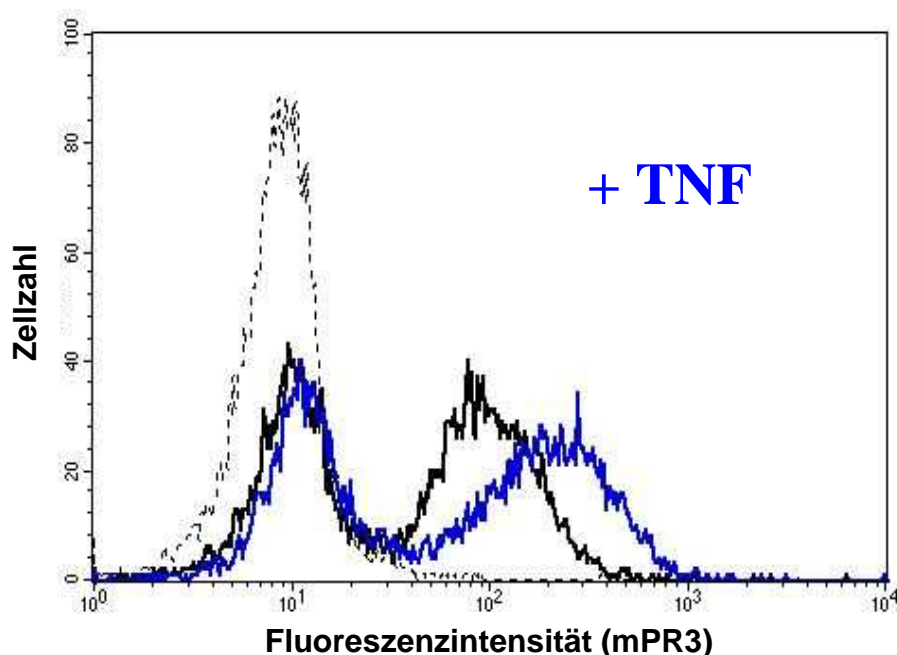
Insgesamt wurden 31 Doppelbestimmungen der mPR3-Expression durchgeführt (16 WG sowie 15 Kontrollen). Von den 16 Doppelbestimmungen der WG-Kohorte wurden sieben während eines aktiven Zeitraumes (mittlerer BVAS 9,8) und neun in Remission (BVAS 0) durchgeführt. Damit sollten einerseits die Reliabilität, andererseits die Abhängigkeit der mPR3-Expression vom Aktivitätsgrad der WG gezeigt werden.

Es fanden sich in allen durchgeführten Untersuchungen stabile mPR3-Expressionen, unabhängig von der Aktivität der Grunderkrankung. Die sieben aktiven Patienten hatten im Mittel $79,1 \pm 16$ % mPR3-positive Neutrophile im ersten Test. Zum Zeitpunkt der Wiederholung befanden sich die Patienten in Remission und wiesen eine gleichgroße Subpopulation auf ($78,2 \pm 12,8$ %). Die anderen neun Patienten, welche initial sowie zur Zweittestung in Remission waren, hatten $77,7 \pm 16$ % mPR3-positive Neutrophile in der Ersttestung und $78,9 \pm 12$ % in der Wiederholung.



11. Darstellung der mPR3 Expression aller Doppelbestimmungen (n = 31, 16 WG-Patienten und 15 Kontrollen; R^2 0,82)

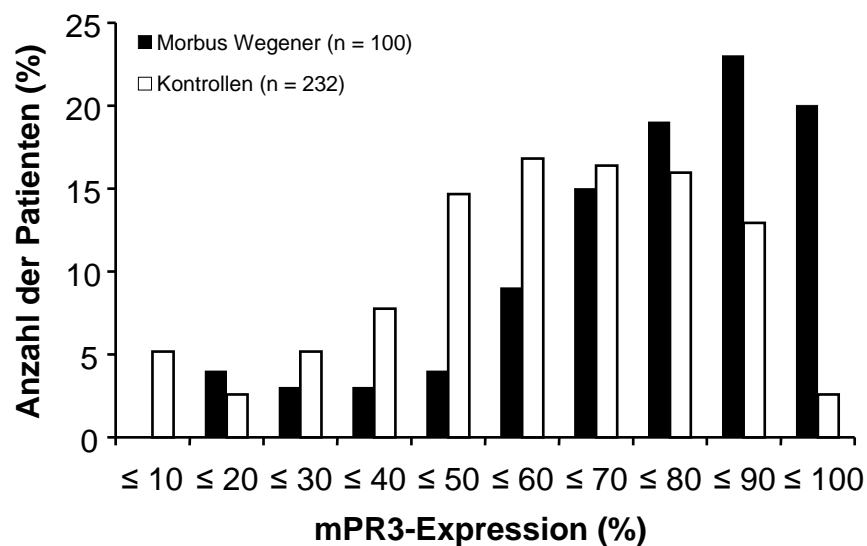
Bei stabiler prozentualer Verteilung mPR3-positiver und mPR3-negativer Neutrophiler in einem Individuum fanden sich bei aktiven Patienten tendenziell mehr mPR3 auf der Oberfläche der mPR3-positiven Population exprimiert als bei inaktiven Individuen. Die durchschnittliche mPR3-Fluoreszenzintensität, der sich in der Remission befindlichen Patienten, betrug $222,4 \pm 87,7$ MFI. Im Vergleich dazu betrug sie bei sieben Patienten im aktiven Stadium durchschnittlich $276,6 \pm 122$ MFI. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$).



12. FACS-Bild: Auf der Ordinate (y-Achse) wird linear die Zellzahl (counts) dargestellt und auf der Abszisse (x-Achse) logarhythmisch die Fluoreszenzintensität der gezählten Zellen. Die gestrichelte graue Linie stellt die Negativ-Kontrolle dar. Die schwarze und die blaue Linie zeigen eine bimodale mPR3-Expression. Das Augenmerk liegt auf der blauen Linie, die den gleichen Patienten (dicke schwarze Linie: inaktiv) nach TNF α -Priming (blaue Linie) darstellt. Man sieht deutlich, wie nur die Fluoreszenzintensität der rechten Population (mPR3^{high}) zunimmt.

Die mPR3-Expression der 100 phänotypisierten WG-Patienten wurde mit der von 232 gesunden Kontrollen verglichen und ist im Folgenden dargestellt. Die mPR3-Expression in der WG-Kohorte betrug im Mittel 72 ± 21 %, Median 79 %, SEM 7,3. In der Kontrollkohorte hingegen 57 ± 23 %, Median 59 %, SEM 3,9 (siehe Abbildung 13).

Diese Differenz erwies sich als signifikant (Mann-Whitney-U-Test $p = < 0,05$). 64 % der Patienten wurden in Remission (BVAS 0) typisiert und 36 % im aktiven Stadium (BVAS-Mittelwert 16).



13. mPR3-Expression der WG- und der Kontrollkohorte angegeben in Prozent (Ordinate), Anzahl der Personen in Prozent der jeweiligen Gesamtkohorte (Abszisse)

Im weiteren Verlauf der Arbeit wird die Gesamtkohorte der 100 WG-Patienten geteilt. Dies geschieht anhand des Mittelwertes der mPR3-Expression ($72 \% \pm 21$). Die Gruppe 1 spiegelt die Patienten mit einer mPR3-Expression von kleiner als 70 % und die Gruppe 2 die Patienten mit einer mPR3-Expression von größer oder gleich 70 % wider. Die durchschnittliche mPR3-Expression lag in Gruppe 1 bei $49,5 \pm 17,0$ % und in Gruppe 2 bei $85,1 \pm 8,6$ %. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose befanden sich in Gruppe 1 36 Patienten (w : m, 18 : 18) mit einem durchschnittlichen Alter von $48,8 \pm 15,3$ Jahren. Die Gruppe 2 umfasste 64 Patienten (w : m, 30 : 34) mit einem Durchschnittsalter von $53,4 \pm 13,3$ Jahren. Der Beobachtungszeitraum der beiden Gruppen unterschied sich um vier Monate (Gruppe 1: $89,5 \pm 65,5$, Gruppe 2: $85,1 \pm 62,9$ Monate). Rezidivfrei blieben im angegebenen Beobachtungszeitraum in Gruppe 1 56 % und in Gruppe 2 44

% der Patienten. Das mediane rezidivfreie Überleben betrug in Gruppe 1 22,9 und in Gruppe 2 22,2 Monate. Der durchschnittliche BVAS war in Gruppe 1 $18,7 \pm 6,8$ und in Gruppe 2 $19,6 \pm 8,0$. In Gruppe 1 waren 74 % (zwei ohne Angaben) und in Gruppe 2 84 % (drei ohne Angaben) c-ANCA-positiv ($p > 0,05$).

3.4 WG-Kohorte im Verlauf (Jahres- und Rezidivdaten)

Vier Patienten von 100 verstarben im Beobachtungszeitraum von 1985 – 2006, einer an Komplikationen der Erkrankung (rezidivierende Sinusitiden mit Hirnabszess), zwei an den Folgen der Grunderkrankung bei einem Rezidiv. Der Vierte verstarb an den Komplikationen eines Plattenepithelcarcinoms.

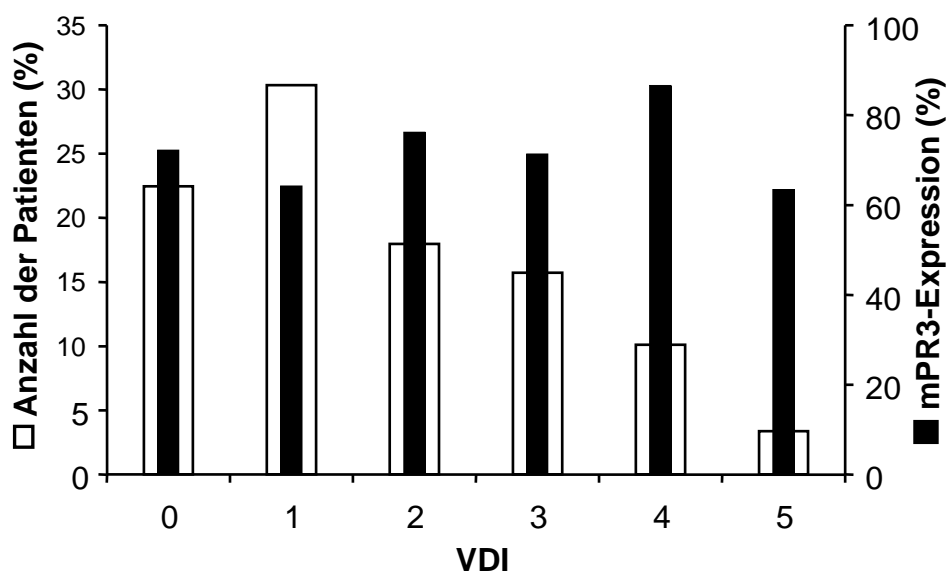
Jahresdaten der WG-Kohorte

Ein Jahr nach Erstdiagnose waren 89 Patienten (42 Frauen und 47 Männer) mit einem mittleren Alter von $52,9 \pm 13,9$ (Min. 19, Max. 84 Jahre) unter weiterer Beobachtung. Die anderen elf Patienten wiesen einen Beobachtungszeitraum von unter zwölf Monaten auf.

53 % (47 von 89) der Patienten waren ein Jahr nach Erstdiagnose weiterhin c-ANCA-positiv.

Der durchschnittliche BVAS lag bei $1,3 \pm 3,5$ (Median 0, Min. 0, Max. 18). 19 % der Patienten waren nicht in kompletter Remission (BVAS > 0).

78 % hatten bereits einen bleibenden Schaden von ihrer Grunderkrankung (VDI > 0; Mittelwert $1,7 \pm 1,4$, Median 1, Min. 0, Max. 5; siehe Abbildung 14).



14. Abszisse zeigt VDI nach einem Jahr. Die linke Ordinate steht für die weißen Säulen und gibt die Anzahl der Patienten an. Die rechte Ordinate steht für die schwarzen Säulen und gibt die mittlere mPR3-Expression in der jeweiligen Gruppe wieder.

Ein Einfluss der mPR3-Expression auf die Ausprägung bzw. Stärke von bleibenden Organschäden, die mittels VDI objektiviert wurden, zeigte sich nicht.

Im Laufe der hier abgebildeten Jahre blieb die mPR3-Expression trotz Fallzahlabnahme bis zu einem Beobachtungszeitraum von 5 Jahren stabil. Somit erscheint eine Selektion in diesem Beobachtungszeitraum unwahrscheinlich.

1. Tabelle: Übersicht der Jahresdaten – Darstellung bis zum 10. Jahr (7. und 9. Nicht dargestellt)

	1. Jahr	2. Jahr	3. Jahr	4. Jahr	5. Jahr	6. Jahr	8. Jahr	10. Jahr
Geschlecht								
M	47 (53%)	36 (48%)	32 (48%)	24 (44%)	25 (47%)	21 (45%)	16 (44%)	10 (35%)
W	42 (47%)	39 (52%)	35 (52%)	31 (56%)	28 (53%)	26 (55%)	20 (56%)	19 (65%)
Insgesamt	89 (100%)	75 (100%)	67 (100%)	55 (100%)	53 (100%)	47 (100%)	36 (100%)	29 (100%)
Durchschnittsalter (Jahre ± SEM [Min., Max.])	52,9 ± 14 [19, 84]	53,7 ± 14 [20, 85]	56,2 ± 14 [21, 86]	56,8 ± 13 [22, 79]	56,3 ± 13 [23, 80]	57,3 ± 12 [24, 76]	58,7 ± 12 [26, 78]	59,3 ± 13 [27, 75]
BVAS	1,3 ± 3,5	1,8 ± 4,5	1,5 ± 4,1	1,2 ± 3,6	1,1 ± 3,0	0,6 ± 2,3	1,2 ± 4,2	0,3 ± 1,0
Active Disease (BVAS >2)	13 (15%)	12 (16%)	8 (12%)	7 (13%)	7 (13%)	3 (6%)	3 (8%)	1 (3%)
VDI	1,7 ± 1,4	1,8 ± 1,4	2,0 ± 1,6	2,2 ± 1,6	2,4 ± 1,8	2,6 ± 2,2	2,7 ± 1,7	2,3 ± 1,4
mPR3-Expression (%)	71,5 (± 21,7)	73,6 (± 21,2)	73,8 (± 21,9)	72,5 (± 22,7)	71,2 (± 23,1)	70,3 (± 23,6)	65,8 (± 24,7)	64,0 (± 24,7)
ANCA-Positivität (%)	47 (53%)	45 (60%)	47 (70%)	38 (69%)	36 (68%)	34 (72%)	22 (61%)	19 (66%)

Demographische Rezidivdaten

In den 87 Monaten der Beobachtungszeit erlitten 53 von 100 WG-Patienten ein Rezidiv. Von diesen 53 Patienten hatten 18 ein Rezidiv, 16 zwei und 19 mehr als zwei Rezidive. Die durchschnittliche Rezidivanzahl lag bei $1,3 \pm 1,7$.

Die mediane rezidivfreie Zeit für die Rezidivpatienten betrug 22,3 Monate.

Im Schnitt erfuhren die Patienten nach ca. zwei Jahren ihr erstes Rezidiv, nach vier Jahren ihr Zweites, nach sechs Jahren ihr Drittes, nach acht Jahren ihr Viertes und nach ca. zehn Jahren das Fünfte. Dies ist wichtig zur Wertung der Rezidivdaten.

Tendenziell konnte man in unserer Kohorte sehen, dass das Geschlechterverhältnis bis zum zweiten Rezidiv ausgewogen war (w : m, 0,96 : 1,04). Es verschob sich im weiteren Verlauf zu zwei Drittel Männer und einem Drittel Frauen (2,5 : 1), obwohl sich die Kohorte invers verhielt (Tabelle 1).

Mit steigender Anzahl der Rezidive nahm der VDI zu (Tabelle 2).

Die Rezidivanzahl korreliert nicht mit der mPR3-Expression (Tabelle 2).

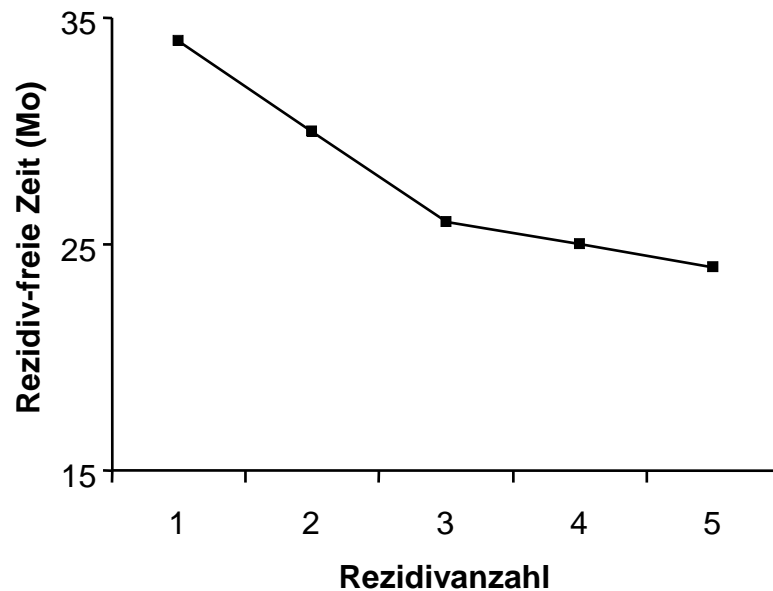
Zum Zeitpunkt eines Rezidivs waren durchschnittlich 88 % unserer Patienten c-ANCA-positiv und dieser Befund war unabhängig von der mPR3-Expression (keine Korrelation). Ein Wechsel von c-ANCA zu p-ANCA wurde nicht beobachtet.

In der Rangreihenfolge aller fünf Rezidive ist die häufigste Jahreszeit, in der es in unserer Kohorte zu einem Rezidiv kam, der Herbst (zweiter Rang: Frühling und Winter, dritter Rang: Sommer).

2. Tabelle: Übersicht der Rezidivdaten (Darstellung bis zum fünften Rezidiv, da die Fallzahlen im weiteren Verlauf zu klein sind. sechstes Rezidiv: drei Patienten, siebentes Rezidiv: ein Patient)

	1. Rezidiv	2. Rezidiv	3. Rezidiv	4. Rezidiv	5. Rezidiv
Geschlecht					
m	25 (47%)	19 (54%)	10 (53%)	9 (64%)	5 (71%)
w	28 (53%)	16 (46%)	9 (47%)	5 (36%)	2 (29%)
Insgesamt	53 (100%)	35 (100%)	19 (100%)	14 (100%)	7 (100%)
Alter (Jahre) MW ± SEM [Min., Max.]	52,9 ± 15 [20, 85]	53,4 ± 11 [23, 72]	54,1 ± 14 [28, 73]	57,4 ± 12 [36, 78]	63,3 ± 6 [54, 72]
BVAS	9,4 ± 5,7	9,3 ± 5,8	10,1 ± 5,3	9,0 ± 5,1	12,1 ± 6,5
VDI	2,0 ± 1,6	2,1 ± 1,6	2,6 ± 1,5	3,4 ± 1,7	4,0 ± 2,6
mPR3-Expression (%)	76,0 ± 17,4	74,0 ± 18,8	74,0 ± 18,5	72,4 ± 19,2	70,6 ± 19,6
Follow-up (Mo)	108 ± 56	119 ± 54	137 ± 54	142 ± 53	140 ± 61
Zeit bis zum Rezidiv (Mo) MW ± SEM [Min., Max.]	34 ± 33 [3,8, 134]	30 ± 32 [2,8, 131]	26 ± 31 [3,8, 129]	25 ± 20 [5,6, 65]	24 ± 15 [6,7, 42]
Jahreszeitenverteilung F=Frühling, S=Sommer, H=Herbst, W=Winter	18 (34%) W 13 (24,5%) H 13 (24,5%) F 9 (17%) S	12 (34%) F 11 (31%) S 8 (23%) H 4 (11%) W	7 (37%) H 6 (32%) W 4 (21%) F 2 (11%) S	6 (43%) S 3 (21%) H 3 (21%) W 2 (14%) F	3 (43%) F 3 (43%) W 1 (14%) H 0 S
c-ANCA-Positivität (%)	46 (87%)	29 (83%)	19 (100%)	12 (86%)	6 (86%)

Die Werte der Tabelle 2 sind in Abbildung 15 visualisiert. Es zeichnet sich eine Verkürzung des Zeitraumes bis zum Auftreten des nächsten Rezidivs mit steigender Rezidivanzahl ab.



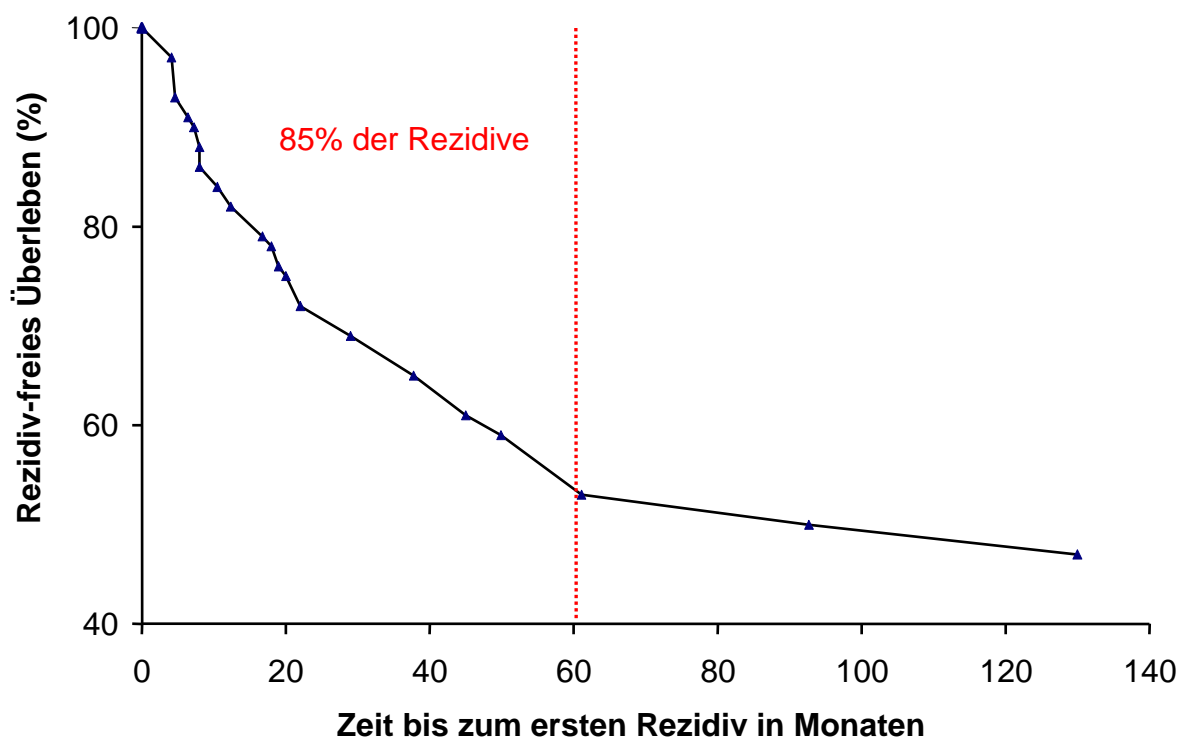
15. Mittlere rezidivfreie Zeit (Punkt 1: Zeit in Monaten von der Erstdiagnose bis zum ersten Rezidiv, 2: vom ersten bis zum zweiten Rezidiv etc.)

Die Tabelle 3 verdeutlicht, dass in unserer Kohorte in den ersten zwei Jahren nach Erstdiagnose das höchste Rezidivaufreten beobachtet wurde. In dieser Zeitspanne erreichten bereits 55 %, der insgesamt 53 Rezidivpatienten, ihr erstes Rezidiv. Nach fünf Jahren begegneten bereits 85 % ihrem ersten Rezidiv.

3. Tabelle: Zeit nach Erstdiagnose bis zum Erreichen des 1. Rezidivs (durchschnittlich drei Jahre)

1 Jahr	2 Jahre	3 Jahre	4 Jahre	5 Jahre	Bis zum 12. Jahr
18 (34 %)	11 (21 %)	4 (7,5 %)	6 (11 %)	6 (11 %)	8 (15 %)

Die restlichen 15 % der Patienten mit einem Rezidiv verteilen sich auf einen Zeitraum von weiteren sieben Jahren (siehe Abbildung 16).

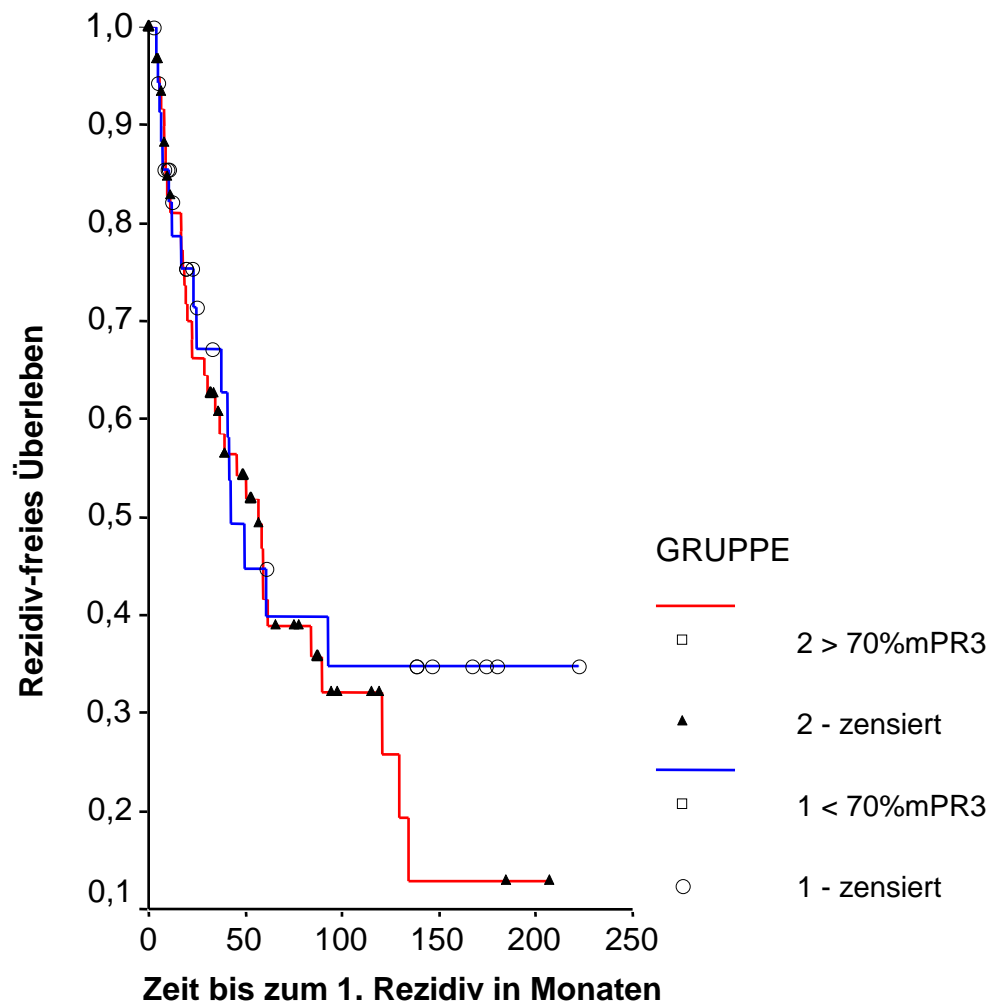


16. Erreichen des ersten Rezidivs aller 53 Rezidivpatienten der Gesamtkohorte in zeitlicher Abfolge

In der folgenden Kaplan-Meier-Funktion (Abbildung 17) sieht man zum jeweiligen Zeitpunkt des Eintretens des ersten Rezidivs die 53 Rezidivpatienten sowie zensierte Fälle (Dies sind Patienten, deren Beobachtungszeit vor dem Erreichen des Rezidivs endeten) abgebildet und von der Gesamtkohorte (n = 100) abgezogen.

Die Gesamtkohorte wurde in eine Gruppe 1 mit einer mPR3-Expression unter 70% (blau, n = 36, 17 Rezidive) und eine Gruppe 2 mit einer mPR3-Expression über 70% (rot, n = 64, 36 Rezidive) geteilt (Kapitel 3.4).

Im zeitlichen Verlauf der Kaplan-Meier-Funktion findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($\chi^2 = 0,6804$, $p = 0,4095$). Betrachtet man das erste Rezidiv als Endpunktes, so sieht man, dass in der Gruppe 1 53 % (19 von 36) der Patienten kein Rezidiv widerfährt. In der Gruppe 2 hingegen zeigen 56 % (36 von 64) der Patienten ein Rezidiv. Dieser Unterschied ist nicht signifikant, da die ROC-Kurven-Fläche für mPR3 mit dem Endpunkt erstes Rezidiv 0,568 beträgt, was die Nullhypothese (kein signifikanter Unterschied) verifiziert.

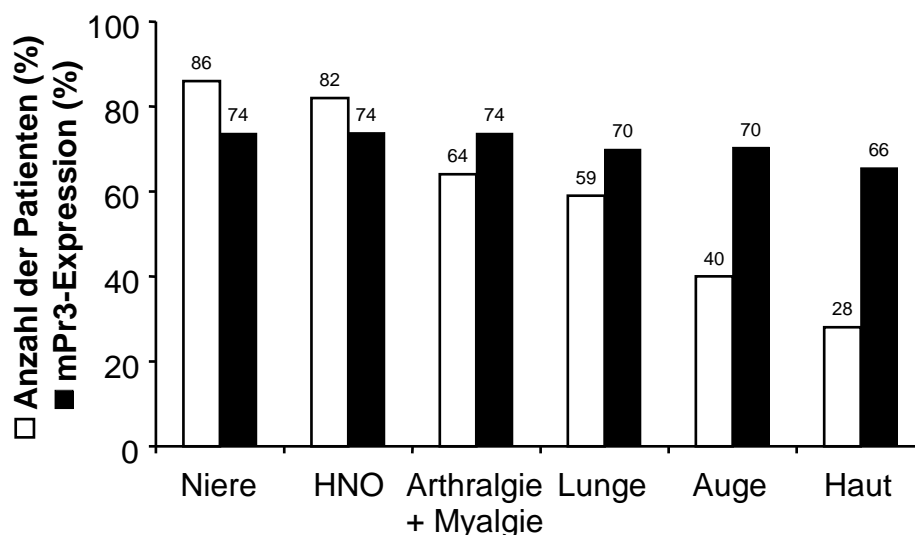


17. Darstellung des rezidivfreien Überlebens der 53 Rezidivpatienten sowie der zensierten Fälle bis zum Erreichen des ersten Rezidivs unterteilt in die zwei Gruppen mPR3-Expression kleiner bzw. größer oder gleich 70 %

3.5 Klinik und Organbeteiligung (Erstdiagnose- und Rezidivdaten)

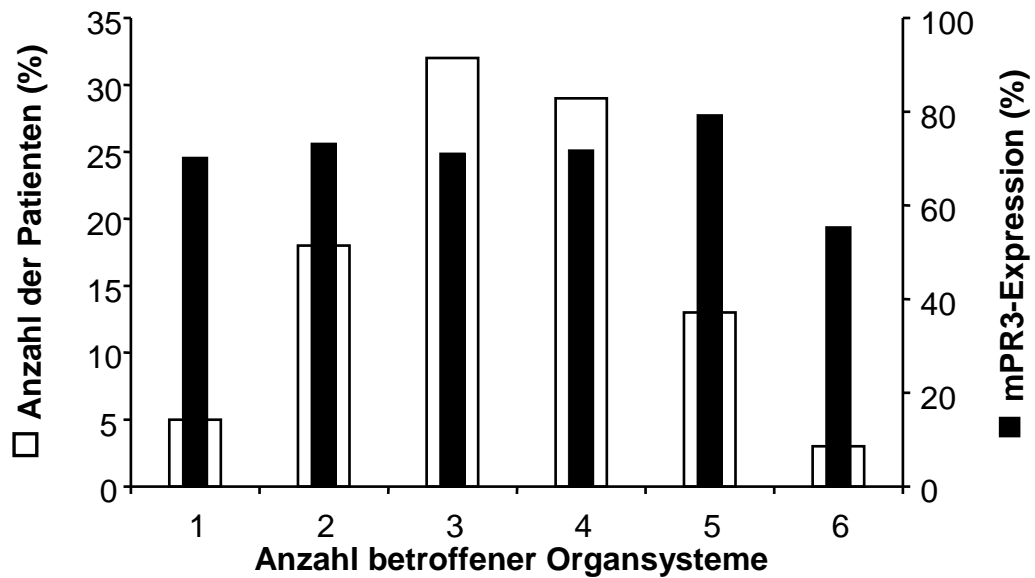
Klinik und Organbeteiligung zum Zeitpunkt der Erstdiagnose

44 von 100 Patienten präsentierten sich zum Zeitpunkt der Erstdiagnose mit Fieber. Im Vordergrund stehende klinische Symptome werden in der Abbildung 18 dargestellt und befanden sich zu 82 % im HNO-Bereich (Nase: Schleimhautulzera, granulierte Schleimhaut, blutige Rhinitis, chronische Rhinitis, borkige Beläge, Sicca-Symptomatik, Anosmie, Knochen- / Knorpeldestruktion [Sattelnase], Epistaxis; Nasennebenhöhlen: röntgenologische Verschattung ohne oder mit Spiegel, Sinusitis; Ohr: Otitis media, Otitis externa, Schwerhörigkeit, Hörsturz, Tinnitus, Mastoiditis, Tubenkatarrh; Mund: Ulzera, Aphten), zu 64 % Arthralgien und Myalgien, zu 59 % pulmonaler Ursache (Rundherde, diffuse Infiltrationen, Kavernen, Husten ohne oder mit Hämoptoe, Dyspnoe, Asthma, Trachealstenose, subglottische Granulation), zu 40 % im Augenbereich (Konjunktivitis, Episkleritis, Uveitis, Orbita-beteiligung, Skleritis, Sicca-Syndrom) und zu 28 % kutaner Genese (Purpura, Ulcera, Raynaud-Syndrom, Bulla, Pyoderma gangraenosum). Grafisch nicht dargestellt kam es in 6 % zu Herz- (vier Perikarditiden, ein Infarkt, einmal höhergradige Rhythmusstörungen), in 4 % zu ZNS- (drei klinische Insulte mit Vaskulitis sowie ein Herdbefund in zentraler Bildgebung) und in 1 % zu abdomineller Beteiligung (Hb-wirksame gastrointestinale Blutung).



18. Organbeteiligung zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (n = 100) mit der jeweiligen mPR3-Expression

Durchschnittlich hatten die Patienten 3,5 Organmanifestationen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der mPR3-Expression von Patienten mit nur einer Organmanifestation im Vergleich zu Patienten mit mehreren beteiligten Organsystemen (Abbildung 19).

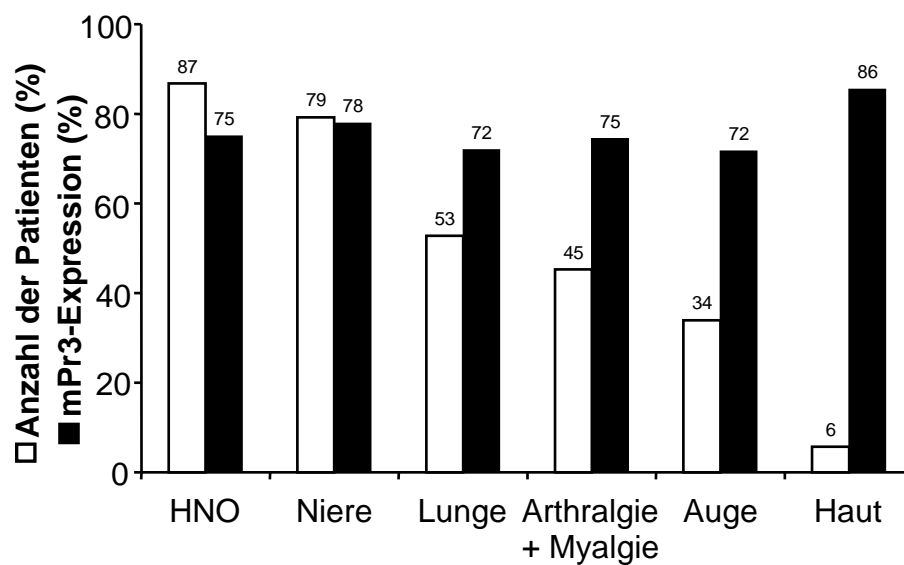


19. Anzahl der Organbeteiligungen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose; Die linke Ordinate steht für die weißen Säulen und gibt die Anzahl der Patienten an. Die rechte Ordinate steht für die schwarzen Säulen und gibt die mittlere mPR3-Expression in der jeweiligen Gruppe wider.

Klinik und Organbeteiligung zum Zeitpunkt eines Rezidivs

Acht von 53 (15 %) Patienten präsentierten sich zum Zeitpunkt des ersten Rezidivs mit Fieber. Deutlich im Vordergrund standen klinische Symptome die zu 87 % im HNO-Bereich waren, zu 53 % pulmonal, gefolgt von 45 % Arthralgien und Myalgien, 34 % Augen- sowie 6 % Hautbeteiligung. Grafisch nicht dargestellt kam es in 28 % zur Beteiligung peripherer Nerven.

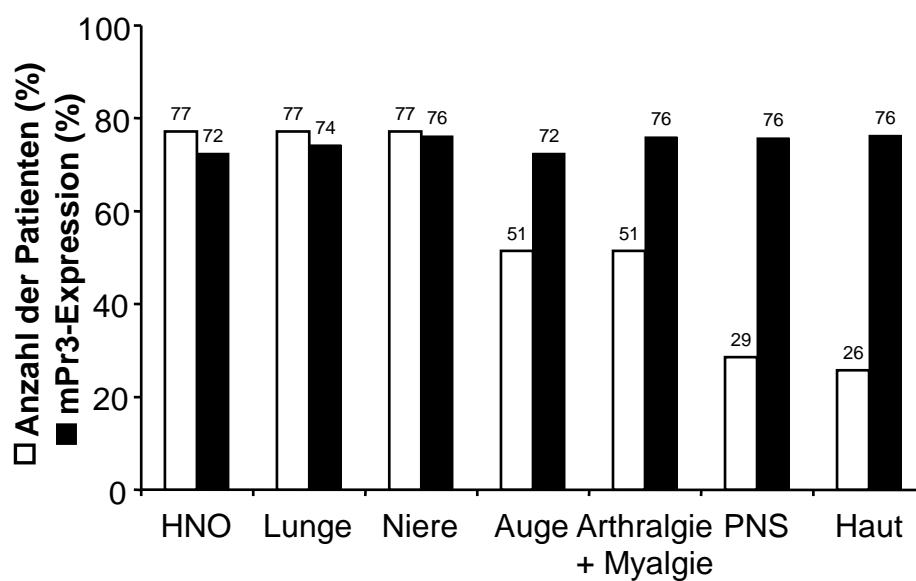
Auch zu diesem Zeitpunkt hat die mPR3-Expression keinen Einfluss auf die Beteiligung eines bestimmten Organsystems (Abbildung 20).



20. Organbeteiligung zum Zeitpunkt des 1. Rezidivs (n = 53) mit der jeweiligen mPR3-Expression

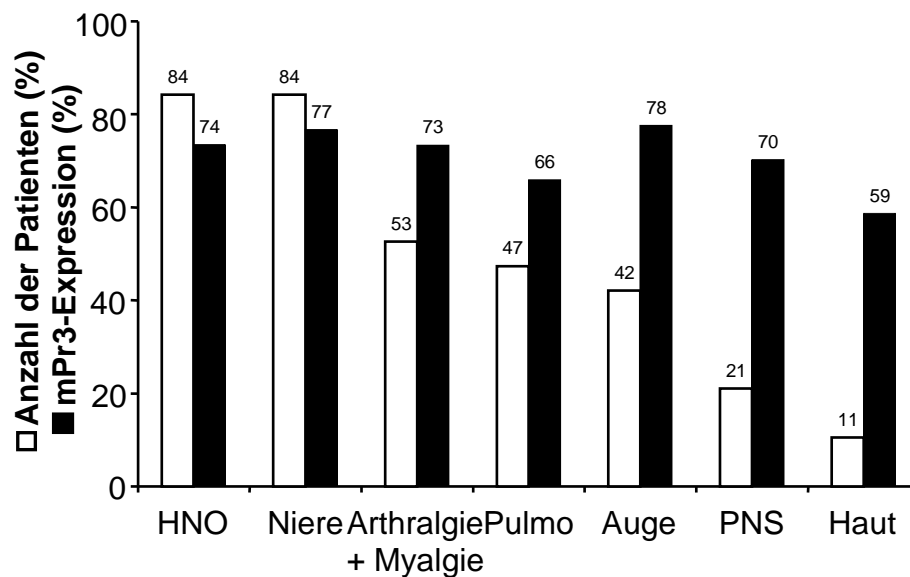
Zum Zeitpunkt des zweiten Rezidivs waren die Organsysteme HNO, Lunge und Niere gleich stark mit 77 % betroffen. 51 % der Patienten hatten Augen- oder Gelenk- und / oder Muskelbeteiligung. 29 % hatten eine Manifestation an den peripheren Nerven und 26 % an der Haut.

Grafisch nicht dargestellt kam es in 6 % zu ZNS-Beteiligung (Bild eines Apoplex, generalisierte Krampfanfälle mit hirnorganischem Psychosyndrom bei neuen Vaskulitiszeichen in zentraler Bildgebung) und in 3 % zu abdomineller Beteiligung (akutes Abdomen mit vaskulitisbedingten Schleimhautulcera in der Koloskopie).



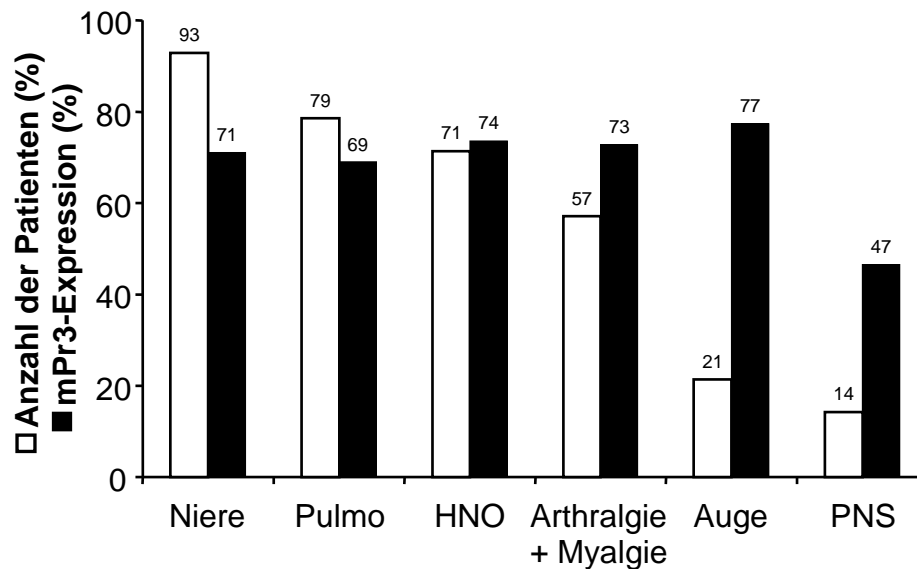
21. Organbeteiligung zum Zeitpunkt des zweiten Rezidivs (n = 35) mit dem Durchschnitt der jeweiligen mPR3-Expression

Zum dritten Rezidiv präsentierte sich keiner der 19 Patienten mit Fieber, aber in 84 % mit HNO- oder Nierenbeteiligung. 53 % wiesen Gelenk- und / oder Muskelschmerzen auf. 47 % hatten eine Beteiligung der Lunge, 42 % der Augen, 21 % der peripheren Nerven und 11 % der Haut. Es findet sich kein signifikanter Einfluss der mPR3-Expression auf eines der erwähnten Organsysteme.



22. Organbeteiligung zum Zeitpunkt des dritten Rezidivs (n = 19) mit dem Durchschnitt der jeweiligen mPR3-Expression

Ein Patient präsentierte sich mit Fieber zum vierten Rezidiv. 93 % wiesen eine renale, 79 % eine pulmonale Beteiligung, 72 % eine HNO-Beteiligung, 57 % Gelenk- und / oder Muskelschmerzen, 21 % eine Augen- und 14 % eine periphere Nervenbeteiligung auf.



23. Organbeteiligung zum Zeitpunkt des vierten Rezidivs (n = 14) mit dem Durchschnitt der jeweiligen mPR3-Expression

86 % der Patienten (n = 7) präsentierten sich zum fünften Rezidiv mit pulmonaler oder HNO-, 71 % mit renaler Beteiligung. 29 % wiesen Gelenk- und / oder Muskelschmerzen oder eine Beteiligung der peripheren Nerven auf. 14 % hatten eine Augenbeteiligung. Ein Patient präsentierte sich mit Fieber.

3.6 Paraklinik (Erstdiagnose-, Jahres- und Rezidivdaten)

Erstdiagnosedaten der Paraklinik

Hinsichtlich paraklinischer Befunde zeigten Patienten mit einer höheren mPR3-Expression eine deutlich stärkere Krankheitsausprägung zum Zeitpunkt der Erstdiagnose mit signifikant höheren Werten für Kreatinin, CrP sowie niedrigeren Werten für Hämoglobin, Albumin und GFR. Es bestand keine signifikante Korrelation zwischen der mPR3-Expression und der Thrombozyten- sowie Leukozytenzahl bzw. dem Gesamtprotein (Tabelle 4).

4. Tabelle: Korrelation von Paraklinik und der mPR3-Expression zum Zeitpunkt der Erstdiagnose

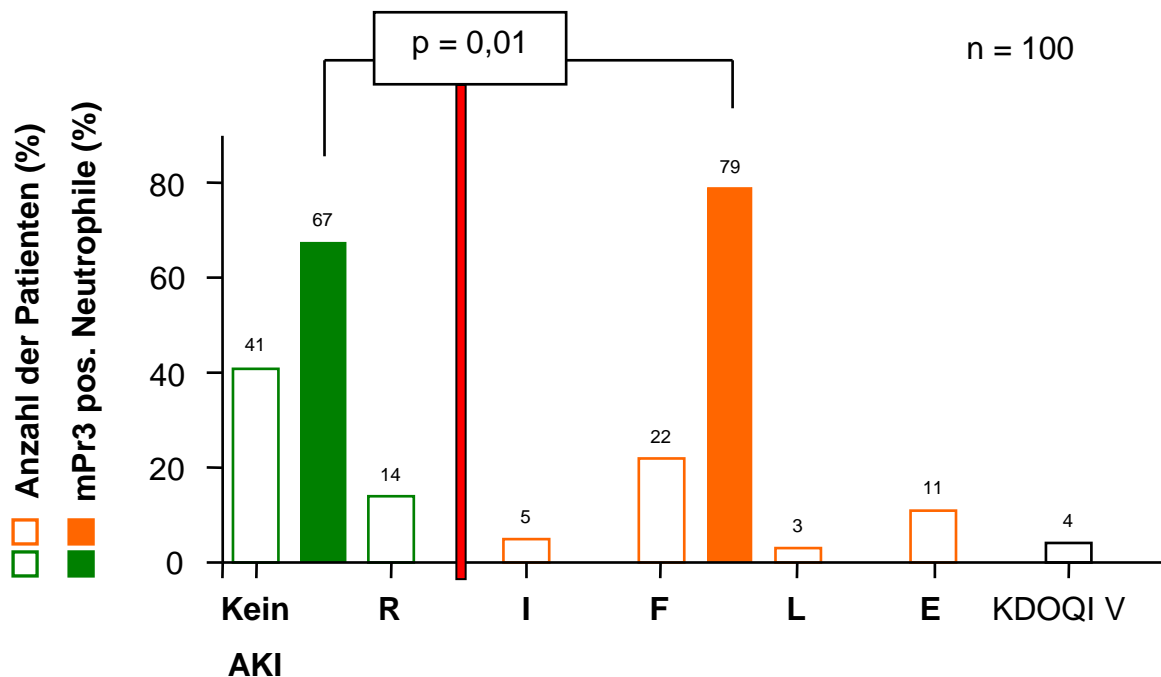
Parameter	Werte (SI)	Korrelationskoeffizient	P Wert
Hämoglobin	6,9 ± 1,3	-0,211	0,035
Thrombozyten	376 ± 159	0,023	0,818
Leukozyten	12,3 ± 5,4	0,098	0,332
Kreatinin	305 ± 326	0,248	0,013
GFR	37,9 ± 29,7	-0,278	0,005
CrP	87,1 ± 89	0,221	0,027
Gesamtprotein	67,5 ± 8,3	-0,153	0,130
Albumin	35,7 ± 7,5	-0,307	0,002
BVAS	19,3 ± 7,5	0,109	0,279

Die mPR3-Expression korrelierte nicht mit der ANCA-Positivität (Korrelationskoeffizient -0,109, $p = 0,294$).

Betrachtet man den Kreatininanstieg zum Zeitpunkt der Erstdiagnose genauer, so fanden sich 55 Patienten mit AKI. Gruppirt man diese nach den RIFLE-Kriterien, dann waren 14 Patienten *Risk*, fünf *Injury*, 22 *Failure*, drei *Loss* und elf *ESRD* (*end-stage renal disease*). Vier Patienten präsentierten sich bereits mit einer bestehenden terminalen Niereninsuffizienz KDOQI V. 41 Patienten erfüllten keine dieser Kriterien.

Betrachtet man folgend die mPR3-Expression der einzelnen Gruppen (kein AKI 67 % ± 22, „R“ 69 % ± 27, „I“ 80 % ± 7,2, „F“ 77 % ± 22,7, „L“ 85 % ± 13,4, „E“ 82 % ± 18,4), so findet sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten ohne AKI und den Patienten *at risk* verglichen mit den Patienten, die ein ausgeprägteres Nierenversagen

(*injury, failure, loss* und *ESRD*) aufwiesen (Mann-Whitney-U-Test, $p = 0,01$; siehe Abbildung 24).



24. Die Nierenfunktionsveränderungen wurden gemäß der RIFLE-Kriterien zum Zeitpunkt der Erstdiagnose gruppiert (nicht ausgefüllte Balken). Die ausgefüllten Balken stehen für die durchschnittliche mPR3-Expression der entsprechenden Gruppe.

Von den 36 Patienten mit AKI im Stadium „F“ (später „L“ und „E“) mussten 27 Patienten (75 %) akut dialysiert werden. Von diesen gelangten 41 % (elf Patienten) in das Stadium „E“, die nach einem Vierteljahr im Stadium der terminalen Niereninsuffizienz verblieben und chronisch dialysiert werden mussten. In der Gruppe ohne AKI und dem Stadium „R“ wurden 15 % (8 von 55 Patienten) chronisch dialysepflichtig.

Die Patientengruppe mit akuter Dialysepflicht präsentierte sich mit deutlich schwerer Erkrankung. Im Vergleich mit der restlichen Kohorte (73 Patienten) wiesen sie signifikant höhere BVAS-Werte ($24 \pm 6,4$ vs. $18 \pm 7,3$; $p = 0,001$) sowie eine signifikant höhere mPR3-Expression ($80 \pm 18,3$ % vs. $70 \pm 21,5$ %, $p = 0,001$) auf.

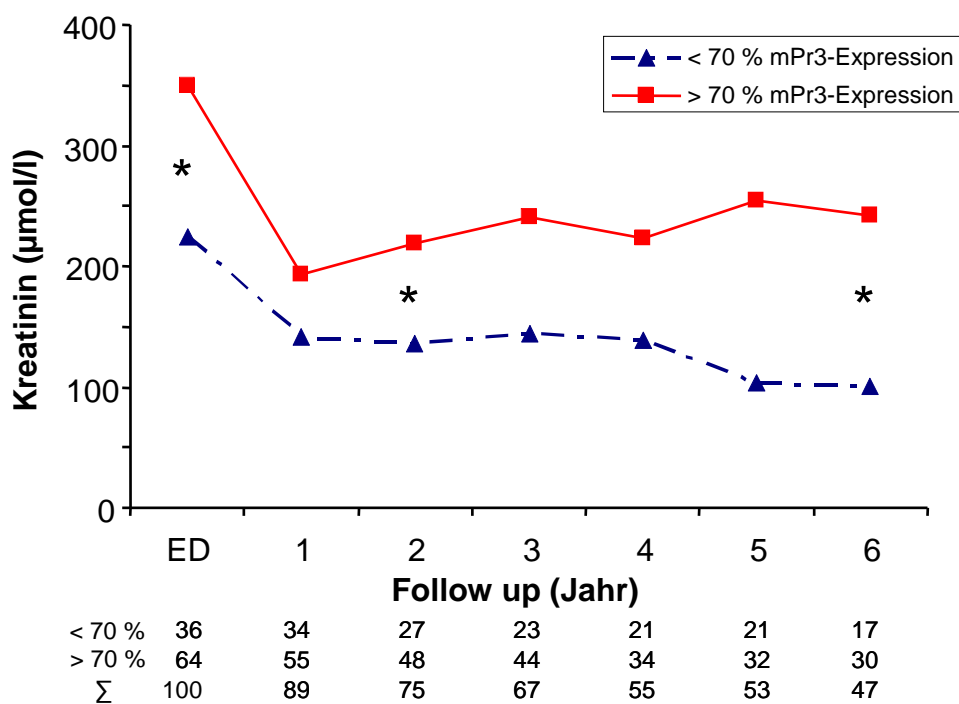
Jahresdaten der Paraklinik

Die Korrelationen zwischen der mPR3-Expression und den paraklinisch erfassten Werten, die sich zum Zeitpunkt der Erstdiagnose zeigten, lassen sich, mit Ausnahme die Parameter Kreatinin und GFR in den Jahresverläufen, keine Nachweise erbringen (siehe Tabelle 5 als repräsentatives Beispiel für alle anderen Jahre).

5. Tabelle: Labordaten fünf Jahre nach Erstdiagnose

Parameter	Werte (SI)	Korrelationskoeffizient	P Wert
Hämoglobin	8,7 ± 1,5	-0,055	0,7
Thrombozyten	244 ± 81	-0,17	0,23
Leukozyten	12 ± 37	0,18	0,19
Kreatinin	201 ± 248	0,413	0,002
Cockcroft-GFR	42,3 ± 22,2	-0,428	0,001
CrP	19,7 ± 36	0,15	0,297
Gesamtprotein	70,5 ± 5,0	-0,24	0,083
Albumin	42 ± 5,4	-0,244	0,078
BVAS	1,1 ± 3,0	0,13	0,35

Gruppiert man die Kohorte wie unter 3.4 erläutert mit einem Schwellenwert von 70 % für die mPR3-Expression, und betrachtet die Nierenfunktion im Verlauf, so zeigt sich eine signifikante positive Korrelation eines erhöhten Anteils mPR3-positiver neutrophiler Granulozyten zu erhöhtem Kreatinin, verbunden mit einer negativen Korrelation für die GFR über einen Zeitraum von sechs Jahren.



25. Darstellung des Kreatininverlaufes über sechs Jahre gruppiert in unter 70 % und über 70 % mPR3-Expression (Mann-Whitney-U signifikant für Erstdiagnose [ED], zweites und sechstes Jahr mit $p < 0,05$)

Ein Zusammenhang zwischen mPR3-Expression und ANCA-Positivität lässt sich auch im Verlauf nicht aufzeigen.

Vergleicht man die ANCA-positiven Patienten mit den ANCA-negativen Patienten, so zeichnet sich in der ANCA-positiven Gruppe ein deutlich höherer Anteil mit Aktivität der Grunderkrankung (BVAS > 2) ab. In dieser Gruppe finden sich mehr Organschäden sowie Rezidive im Verlauf verglichen mit Patienten, die ANCA-negativ sind.

6. Tabelle: Vergleichende Darstellung von ANCA-positiven und ANCA-negativen Patienten (alle Differenzen $p > 0,05$)

ANCA + / -	ED	1 Jahr	2 Jahre	3 Jahre	4 Jahre	5 Jahre
Gesamt	81 (85 %) / 14 5 keine Werte	47 (53 %) / 42	45 [60 %] / 30	47 [70 %] / 20	38 [69 %] / 17	36 [68 %] / 17
mPR3-Expression (%)	74 / 66	69 / 75	74 / 72	73 / 77	71 / 73	73 / 68
„Active Disease“ BVAS > 2	100 %	9 [19 %] / 4 [10%]	11 [15 %] / 1	8 [17 %] / 0	7 [18 %] / 0	7 [19 %] / 1
BVAS		1,7 / 0,7	2,7 / 0,6	2,1 / 0,2	1,7 / 0	1,5 / 0,4
VDI		1,8 / 1,6	1,8 / 1,8	2,2 / 1,7	2 / 2	2,5 / 2,2
Rezidivanzahl		1,6 / 1,2	1,8 / 1,2	1,9 / 1,1	2,0 / 1,4	1,8 / 2,2
Rezidiv im Verlauf		31 [66 %] / 18 [43 %]	32 [71 %] / 14 [47 %]	31 [66 %] / 10 [50 %]	28 [74 %] / 8 [47 %]	24 [67 %] / 12 [71 %]
mPR3-Expression < 70 %	28 (76 %) / 6 2 keine Werte	22 [65 %] / 12	16 [64 %] / 9	17 [74 %] / 5	13 [65 %] / 7	13 [62 %] / 8
mPR3-Expression > 70 %	53 (80 %) / 8 3 keine Werte	26 [47 %] / 29	29 [58 %] / 21	30 [67 %] / 15	25 [71 %] / 10	23 [74 %] / 9

Paraklinik zum Zeitpunkt eines Rezidivs

Wie bei den Jahresdaten lassen sich nur zwischen der mPR3-Expression und den Nierenfunktionsparametern (Kreatinin und GFR) Korrelationen zu jedem Rezidiv nachweisen. Es findet sich keine stetige Korrelation zu Hb, Thrombozyten- oder Leukozytenzahl, CrP, Gesamteiweiß, Albumin, Proteinurie, ANCA-Positivität.

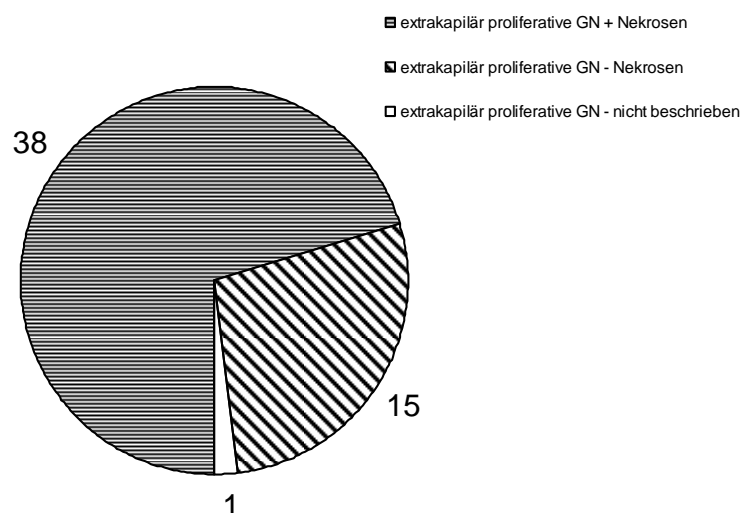
Zu den Rezidivzeitpunkten zeichnet sich der Trend ab, dass Patienten mit einer hohen mPR3-Expression eher ANCA-positiv sind.

7. Tabelle: ANCA-Positivität zum Zeitpunkt eines Rezidivs

ANCA + / -	1. Rezidiv	2. Rezidiv	3. Rezidiv	4. Rezidiv	5. Rezidiv
Gesamt	44 (83 %) / 9	29 (83 %) / 6	19 (100 %) / 0	12 (86 %) / 2	6 (86 %) / 1
mPR3-Expression (%)	76 / 71	76 / 63	74 / 0	74 / 60	70 / 55
BVAS	9 / 10	10,1 / 6,2	10,1 / 0	8,5 / 12	11,8 / 9
VDI	2,0 / 1,6	2,6 / 2,3	2,6 / 0	3,5 / 3	4,2 / 3
Rezidivanzahl	1,6 / 1,2	3,1 / 4,0	4,3 / 0	4,5 / 6,5	5,5 / 6
mPR3-Expression < 70 %	13 [77 %] / 4	9 [75 %] / 3	7 [100 %] / 0	5 [83 %] / 1	2 [67 %] / 1
mPR3-Expression > 70 %	33 [92 %] / 3	20 [87 %] / 3	12 [100 %] / 0	7 [88 %] / 1	4 [100 %] / 0

3.7 Biopsien und Histologien

Allen 100 WG-Patienten wurden während des Verlaufs Biopsien entnommen. 39 Patienten wurden mehr als einmal bioptiert (einer viermal, sieben dreimal, 31 zweimal). 87 Biopsien wurden bei Erstdiagnose durchgeführt, davon waren 57 Nierenbiopsien und 30 betrafen andere Organe. Von den initial durchgeführten 57 Nierenbiopsien hatten 50 eine extrakapillär proliferative Glomerulonephritis. Weiterhin fanden sich zwei fokal segmental proliferative Glomerulonephritiden und fünf Normalbefunde (Abbildung 26 folgt so gleich).



26. Darstellung aller extrakapillären Glomerulonephritiden (Erstdiagnose 50 plus vier im Verlauf)

Von den 50 extrakapillär proliferativen Glomerulonephritiden wiesen 68 % Nekrosen auf. Die mPR3-Expression der Patienten mit Nekrosen war signifikant höher (78 % ±

21,8 vs. 64 % \pm 22,1, Mann-Whitney-U-Test, $p = 0,007$) als jene der Patienten ohne Nekrosen.

Die 30 Biopsien anderen Ortes stellten sich aus zwölf Nasen-, neun Lungen-, fünf Haut-, zwei Augen-, einer Nasennebenhöhlen- und einer Ohrenbiopsie zusammen. Im Verlauf gelang bei 13 Patienten keine Diagnosesicherung mittels Biopsie.

3.8 Therapie (Erstdiagnose-, Jahres- und Rezidivdaten)

Erstdiagnosedaten der Therapie

Infolge der Erstdiagnose wurden 91 Patienten mit Prednisolon und Cyclophosphamid behandelt (40 oral, 51 intravenös). 60 % von ihnen erhielten initial Prednisolonstöße. 11 % wurden zusätzlich mit Plasmapherese behandelt.

Vergleicht man die beiden Gruppen oral vs. intravenös, so findet sich in beiden Fraktionen eine ähnliche mPR3-Expression (po: $70,3 \pm 23,4$ % vs. iv: $72,2 \pm 20,5$ %; $p > 0,05$) mit ähnlichem BVAS ($19,8 \pm 6,87$ vs. $20,1 \pm 7,7$).

Ein signifikanter Unterschied zeigte sich in der Zeit von der Erstdiagnose bis zum Erreichen der Remission (BVAS < 2 in Tagen – per BVAS-Definition mindestens drei Monate). Der Median in der oralen Gruppe betrug 175 verglichen mit 94 Tage in der intravenösen Gruppe ($p < 0,05$).

In der intravenösen Gruppe erreichten im Beobachtungszeitraum zwei Patienten nicht die Remission.

Rezidivdaten der Therapie

Auf der anderen Seite tritt bei nur 47 % der intravenösen Gruppe und bei 68 % der oralen Gruppe mindestens ein Rezidiv im Verlauf auf.

Die Zeit von der erreichten Remission bis zum ersten Rezidiv unterscheidet sich signifikant.

Der Median beträgt in der oralen Gruppe 829 vs. 378 Tage in der intravenösen Gruppe ($p < 0,05$). Therapiekomplicationen traten in der oralen Gruppe bei 2,5 % (Leukopenie) und in der intravenösen Gruppe bei 5,9 % (hämorrhagische Zystitis, Leukopenie, Infektion mit Pneumonie) auf ($p > 0,05$).

Unter Therapie traten bei 16 % der intravenösen Gruppe und 10 % der oralen Gruppe die ersten Rezidive auf ($p > 0,05$).

Jahresdaten der Therapie

91 % (81) der Patienten waren ein Jahr nach Erstdiagnose unter Therapie. 15 % wiesen noch Aktivität ihrer Grundkrankheit auf (BVAS > 2). 52 Patienten (58 %) erhielten Prednisolon und Cyclophosphamid (26 oral und 26 intravenös), davon erhielten drei Prednisolonstöße. Es wurden keine Plasmapheresen durchgeführt. Von den weiteren 29 Patienten erhielten neun Prednisolon in Kombination mit Azathioprin und ein Patient Azathioprin als Monotherapie. Acht Patienten wurden mit Prednisolon und Mycophenolatmofetil sowie einer mit Mycophenolatmofetil mono behandelt. Ein Patient erhielt Prednisolon in Kombination mit Methotrexat, zwei Patienten eine Cotrimoxazol Monotherapie und sieben Prednisolon oder Methylprednisolon allein.

4 Diskussion

Die Leukozytenfraktion besteht zu 50 bis 80 % aus Granulozyten, wovon neben Eosinophilen und Basophilen der Hauptanteil mit 80 bis 90 % aus Neutrophilen besteht. Die zentrale Rolle von Neutrophilen im Krankheitsgeschehen der WG wurde durch Xiao et al. in einem ANCA-assoziierten Vaskulitis- / Glomerulonephritismodell an Mäusen gezeigt. Hier schützte eine Neutrophilen-Depletion in vivo mittels monoklonaler Antikörper komplett vor der Entwicklung einer nCGN (Xiao / Heeringa et al. 2005).

Es wurde experimentell gezeigt, dass Neutrophile durch Priming mit konsekutiver Hochregulation des Zielantigens PR3 und somit gesteigerter Interaktion mit den ANCA aktiviert werden. Es kommt lokal, bevorzugt in bzw. um Kleingefäße, zur Gewebeschädigung durch oxidativen Stress (NADPH-Oxidase) und somit zur Granulom-, Nekrose- und Fibrosebildung.

4.1 Membrangebundene Proteinase 3

Die zentrale Hypothese dieser Arbeit lautete, dass WG-Patienten einen signifikant höheren Anteil mPR3-positiver Neutrophile, also eine höhere mPR3-Expression, aufweisen als gesunde Kontrollen. Wie im Ergebnisteil dargestellt, fand sich bei den 100 WG-Patienten dieser Arbeit ein signifikant höherer Anteil mPR3-positiver Neutrophiler verglichen mit gesunden Kontrollen (Median: 79 vs. 59, Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,05$).

Dies wurde bereits in früheren Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe in einer Kohorte von 35 WG-Patienten beschrieben, sowie durch die Arbeitsgruppe von Witko-Sarsat et al. (Halbwachs-Mecarelli / Bessou et al. 1995) und Rarok et al. (Rarok / Stegeman et al. 2002) bestätigt.

Im Vergleich mit diesen beiden Arbeiten ist unsere Patientenkohorte mit 100 WG-Patienten die größte bisher phänotypisierte Kohorte (Rarok et al. 89, Witko-Sarsat et al. 37 ANCA-assoziierte Vaskulitispatienten, davon 16 WG). Rarok et al. typisierte alle WG-Patienten in einem inaktiven Stadium, was in der vorliegenden Arbeit sowie bei Witko-Sarsat et al. nicht der Fall war. Wir konnten mittels Doppelbestimmungen zeigen, dass die mPR3-Expression der Neutrophilen unabhängig vom Aktivitätsstadium der Grund-krankheit konstant bleibt und lediglich die Menge an mPR3 in der mPR3-positiven Subpopulation mit steigender Aktivität zunimmt. Zudem wurde die Autonomie

von Alter, Rezidiv, Therapie und Inflammationsstatus ausgeführt (Cantin 1995). Rarok et al. fanden in 89 WG-Patienten mit steigender mPR3-Expression ein signifikant höheres Risiko für Rezidive sowie eine höhere Rezidivrate (Rarok / Stegeman et al. 2002).

Vergleicht man die vorliegende Arbeit mit Rarok et al., so fällt auf, dass die Verteilung der mPR3-Expression deutlich divergiert.

1. In unseren Kohorten finden sich (sowohl in der Kontroll- als auch in der Patientenkohorte) homogene glockenförmige Verteilungen. Dies ist in der Veröffentlichung von Rarok et al. nicht der Fall.
2. Betrachtet man die beschriebenen mPR3-Expressionsmuster (mPR3-Expression < 10 % = monomodal low, 10 - 90 % = bimodal, > 90 % = monomodal high) in der Veröffentlichung von Rarok et al. (Rarok / Stegeman et al. 2002), so zeigt sich dort ein deutlich höherer Anteil *monomodal high* exprimierender Neutrophile (Tabelle 8). In unseren Kohorten, Kontrollen sowie Patienten, ist dagegen ein eindeutiges Überwiegen der bimodalen Verteilung zu sehen. Da in der Publikation von Witko-Sarsat ein bimodales Expressionmuster gefunden wurde, welches unserer Beobachtung entspricht, ist zu vermuten, dass es sich in der holländischen Kohorte um ein methodisches Problem handelt.
3. Berücksichtigt man diesen Unterschied (der unter Punkt zwei dargestellt wurde), sowie die bereits von Rarok et al. veröffentlichte Beobachtung, dass das rezidivfreie Überleben bei Patienten mit bimodaler Verteilung unabhängig von der mPR3-Expression ist, so wird deutlich, warum bei einer dominanten Bimodalität in unserer Kohorte (80 %) kein Einfluss auf die Rezidivhäufigkeit gezeigt werden konnte. Das mittlere rezidivfreie Überleben der bimodalen Subgruppe dieser Arbeit entspricht in etwa dem von uns beobachteten (36,6 vs. 35 Monate).

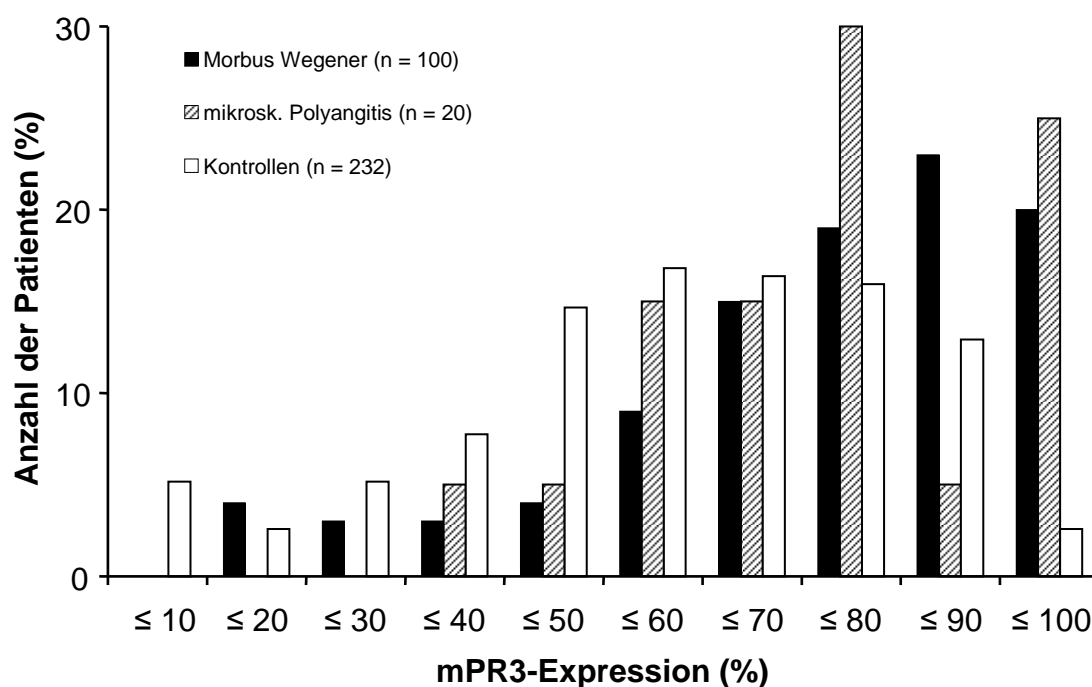
8. Vergleichende Darstellung der Modalitätsverteilungen mit Rarok et al. Monomodal low: < 10 % mPR3-positive Neutrophile, bimodal: 10 – 90 % mPR3-positive Neutrophile, monomodal high: > 90 % mPR3-positive Neutrophile

		monomodal low	bimodal	monomodal high	n
Rarok et al. 2002	WG	1 (1 %)	26 (29 %)	63 (70 %)	89
	Kontrollen	2 (3 %)	22 (30 %)	48 (67 %)	72
vorliegende Arbeit	WG	0 (0 %)	80 (80 %)	20 (20 %)	100
	Kontrollen	12 (5 %)	209 (90 %)	11 (5 %)	232

Ein weiterer Vergleich unserer Daten ist mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Witko-Sarsat et al. aus dem Jahre 1999 (Witko-Sarsat / Lesavre et al. 1999) möglich. Diese Arbeit bildet eine stark inhomogene Gruppe von 131 Patienten mit entzündlichen und / oder Autoimmunerkrankungen ab (37 Patienten mit ANCA-assoziiierter Vaskulitis, 34 Patienten mit Rheumatoider Arthritis, acht Patienten mit Spondylarthropathie, 24 Patienten mit Zystischer Fibrose sowie 28 Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1) und vergleicht diese zum Einen mit einer Kohorte von Patienten mit nicht-entzündlichen und / oder Vaskulitis-bedingten Erkrankungen (n = 53) bzw. zum Anderen mit einer gesunden Kohorte (n = 126).

Unser Augenmerk liegt auf der ersten Gruppe mit Schwerpunkt der ANCA-assoziierten Vaskulitiden. Diese Gruppe beinhaltet 16 WG- und 21 mPA-Patienten.

Abbildung 27 verdeutlicht, dass die 20 mPA-Patienten unserer Kohorte eine vergleichbare mPR3-Expression wie unsere WG-Patienten aufwiesen (in Zahlen mPA vs. WG: Mittelwerte $72,8 \pm 18,3$ vs. $72,4 \pm 21$).



27. mPR3-Expression von gesunden Kontrollen und unserer WG-Kohorte unter Hinzunahme von 20 mPA Patienten

Da sich die mPR3-Expression von WG- sowie mPA-Patienten nicht wesentlich unterscheidet, möchte ich mit dem Vergleich der 37 Vaskulitispatienten von Witko-Sarsat et al. mit unseren 100 WG- plus 20 mPA-Patienten fortfahren (Tabelle 9).

Zusammenfassend geht aus der folgenden Tabelle eine Vergleichbarkeit unserer Daten mit den Beobachtungen der Arbeitsgruppe von Witko-Sarsat et al. hervor.

9. Vergleichende Darstellung der mPR3-Expression mit Witko-Sarsat et al. (mPR3-Expression: 0 – 20 % = mPR3^{low}, 21 – 58 % = intermediär mPR3^{interm}, 59 – 100 % = mPR3^{high})

		mPR3 ^{low}	mPR3 ^{interm}	mPR3 ^{high}	n
Witko-Sarsat et al. 1999	WG + mPA	2 (5,5 %)	4 (11,1 %)	31 (83,3 %)	37
	Kontrollen	11 (9 %)	44 (36 %)	71 (57 %)	126
vorliegende Arbeit	WG + mPA	4 (3,3 %)	21 (17,5 %)	95 (79,2 %)	120
	Kontrollen	19 (8 %)	93 (40 %)	120 (52 %)	232

Wie bereits in den Ausführungen des Vergleichs auffällig, wurden unterschiedliche Definitionen für die Gruppierung der mPR3-Expression [low, bimodal / intermediär und high] verwendet. Zur besseren Vergleichbarkeit haben wir unsere Daten in den Tabellen 8 und 9 den entsprechenden Definitionen der jeweiligen Veröffentlichung angepasst.

Die mPR3-Expression ist im Wesentlichen intraindividuell stabil (Halbwachs-Mecarelli / Bessou et al. 1995; Witko-Sarsat / Lesavre et al. 1999; Rarok / Stegeman et al. 2002; Schreiber / Busjahn et al. 2003). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass mit steigendem Grad der Aktivierung / Aktivität der Neutrophilen die Menge an mPR3 in der mPR3-positiven Subpopulation zunimmt, ohne dass sich der Prozentsatz der mPR3-positiven Subpopulation verändert (Csernok / Ernst et al. 1994; Brachemi / Mambole et al. 2007; van Rossum / Huitema et al. 2007).

Aktuell gibt es Hinweise, dass mPR3 eventuell Seromarkereigenschaften aufweisen könnte. So ist von Matsumoto et al. gezeigt worden, dass bei intensivstationspflichtigen Patienten mit Sepsis / SIRS ein zeitabhängig, signifikant höherer Anteil mPR3-positiver Neutrophiler mit einer positiven Korrelation zum C-reaktiven Protein vorhanden ist. In einer gesunden Kontrollgruppe wurde die intraindividuelle Stabilität (unabhängig von der Zeit) bestätigt (Matsumoto / Kaneko et al. 2006).

4.2 Einschränkungen

Die Kohorte besteht überwiegend aus Patienten mit Nierenbeteiligung, was aufgrund heutiger Zuweisungsselektion abteilungsbedingt ist.

Aufgrund retrograder Datenerhebung und der Erfassung eines relativ langen Zeitraumes wurde kein einheitliches Therapieprotokoll eingehalten.

Informationen über unsere Patienten vor dem Zeitpunkt der Erstdiagnose waren teils nur unzureichend eruierbar.

Die ANCA-Titer konnten aufgrund des langen Zeitverlaufes der Studie mit wechselnden Assays und wechselnden Laboren nicht quantitativ, sondern nur qualitativ ausgewertet werden. Als ANCA-Positivität wurde ein Titer $\geq 1:8$ und ein bestätigender ELISA gewertet.

Der Anteil von Todesfällen ist mit 4 % beziffert und weist im Vergleich zur aktuellen Literatur [unter Therapie: Fünf-Jahres-Überleben 80 % (Booth / Almond et al. 2003)]

bzw. Acht-Jahres-Überleben 80 % (Hoffman / Kerr et al. 1992) bzw. Zehn-Jahres-Sterberate 35 % bzw. Zwölf-Jahres-Überleben 88 % (Reinhold-Keller / Beuge et al. 2000)] eine deutlich niedrigere Ereignisrate auf. Dies liegt zum Einen daran, dass wir nur lebende Patienten typisieren konnten. Patienten, die vor dem 19.04.2000 verstarben, fanden keine Berücksichtigung. Zum Anderen standen nicht alle Patienten unter langfristiger Beobachtung. Einige Patienten wiesen bei Beendigung der Studie nur eine kurze Beobachtungszeit auf.

23 % unserer Patienten wurden lediglich zwei Jahre beobachtet. 21,7 % von diesen hatten ein Rezidiv ihrer Grundkrankheit. Von den übrigen 77 Patienten, die mindestens zwei Jahre oder länger beobachtet wurden, hatten 30 % ein Rezidiv innerhalb der ersten zwei Beobachtungsjahre, in der gesamten Beobachtungszeit hatten 62,3 % ein Rezidiv. In beiden Gruppen ist die Rezidivhäufigkeit in den ersten beiden Jahren annähernd gleich. Daher ist die Rezidivhäufigkeit in den ersten beiden Jahren trotz signifikant unterschiedlicher Beobachtungszeiten (62,3 vs. 108,3 Monate, $p < 0,05$) repräsentativ für die Gesamtkohorte.

4.3 Biopsien

Geht man, wie durch Schreiber et al. (Schreiber / Luft et al. 2004) beschrieben, davon aus, dass bei steigender mPR3-Expression eine gesteigerte Sauerstoffradikalbildung neutrophiler Granulozyten vorliegt, so sollte bei WG-Patienten ein größeres Ausmaß an Gewebeschädigung mit einem schlechteren Krankheitsverlauf nachweisbar sein.

Brouwer et al. zeigten in einer WG-Kohorte einen signifikant höheren Anteil sauerstoffradikalbildender Zellen in den Nierenhistologien von Patienten mit hochgradig eingeschränkter Nierenfunktion im Vergleich zu mittel- bis leichtgradig eingeschränkter Nierenfunktion (Brouwer / Huitema et al. 1994).

Wir konnten ebenfalls zeigen, dass Patienten mit einer höheren mPR3-Expression mehr Nekrosen in ihren Nierenbiopsien aufwiesen.

4.4 Jahreszeiten

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, zeigte sich in mehreren Veröffentlichungen eine jahreszeitenabhängige Häufung des Krankheitsbeginns der WG, die die infektiöse Initiierungshypothese stützt. Dies ist in der Literatur überwiegend für den Winter

beschrieben (Falk / Hogan et al. 1990; Raynauld / Bloch et al. 1993; Carruthers / Watts et al. 1996; Tidman / Olander et al. 1998; Popa and Tervaert 2003). Auf der anderen Seite finden sich vereinzelte Veröffentlichungen, denen es nicht gelingt eine saisonale Häufung zu bestätigen (Duna / Cotch et al. 1998; Koldingsnes and Nossent 2000) oder die eine Häufung des Krankheitsbeginns im Sommer sehen (Mahr / Artigues et al. 2006).

Bezüglich unserer beobachteten Jahreszeitenhäufung zum Zeitpunkt der Erstdiagnose erfolgte bereits der Hinweis, dass aufgrund retrograder Datenerhebung der initiale Symptombeginn nicht nachvollzogen werden konnte.

4.5 Bewertungssysteme

Parallel zur Datenakquise unserer Kohorte wurden bisherige vaskulitisspezifische Bewertungssysteme, die wir in unserer Untersuchung verwendeten, weiterentwickelt. Ein Punktesystem zur Objektivierung der Krankheitsaktivität ist der BVAS, der durch Stone et al. im Rahmen eines *International Network for the Study of the Systemic Vasculites* (INSSYS) für WG spezifiziert wurde (Stone / Hoffman et al. 2001). Die maximale Punktezah von 127 wurde durch die Spezifizierung auf 68 reduziert. In den abgefragten Organsystemen wird nun eindeutig unterschieden, ob die Beschwerden neu oder schlimmer sind, persistieren oder verschwanden. Im Rahmen dessen wurde einheitlich definiert, welche Punktezah welchem Aktivitätsstadium zuzuordnen sei. So wird eine Vergleichbarkeit möglich. Gleiches gilt für den VDI.

Die vorliegende Arbeit basiert auf den nicht-spezifizierten Bewertungssystemen.

4.6 Organbeteiligung

Aus den unter 4.2 aufgeführten Gründen kann die Organbeteiligung unserer WG-Kohorte nicht der allgemeingültigen Verteilung der Literatur entsprechen. Eine ähnliche Konstellation der Kohorte (n = 350 Registerpatienten aus dem Zeitraum 1985 – 2003) mit vergleichbarer Organbeteiligung (88 % Niere, 49 % Lunge, 25 % Haut) findet sich in der Veröffentlichung von Hogan et al. aus dem Jahre 2005 (Hogan / Falk et al. 2005).

4.7 Remission, Rezidiv und Verlauf

Die von uns gezeigte Rezidivhäufigkeit von 53 % liegen am oberen Ende der von der Literatur beschriebenen Spanne von 11 – 57 % (Briedigkeit / Kettritz et al. 1993; Nachman / Hogan et al. 1996; de Groot / Adu et al. 2001; Reinhold-Keller / Fink et al. 2002). Dies wird durch das Fehlen einer remissionserhaltenden Therapie in den Anfangsjahren des hier widergespiegelten Beobachtungszeitraumes verursacht, in denen überwiegend eine orale Cyclophosphamid-Therapie verabreicht wurde (signifikant längere Remissionszeit, aber mehr rezidivierende Patienten ohne Therapie). Vergleicht man die Zeit bis zum Erreichen einer Remission, so zeigte sich dieser Endpunkt im CYCAZREM bei 77 % nach drei Monaten und bei weiteren 16 % nach drei bis sechs Monaten (Jayne / Rasmussen et al. 2003). Dies konnte im WGET bestätigt werden (WGET 2005). Die vorliegende Arbeit stützt die Angaben der in der Literatur beschriebenen Zeiträume. Wir beobachteten eine Zeitspanne von drei bis sechs Monaten bis zum Erreichen der Remission.

Die beobachtete Remissionsdauer von 13 bis 28 Monaten entspricht im Mittel der in der Literatur beschriebenen Zeitspanne. Fauci et al. beschrieben bereits 1979 im NEJM eine Remissionsdauer von ca. 22 Monaten.

Dass wir keinen Zusammenhang zwischen der Rezidivhäufigkeit und mPR3-Expression finden konnten, liegt zum Einen, wie in Kapitel 4.1 erwähnt, an der überwiegend bimodalen Verteilung unserer Kohorte, zum Anderen an den unterschiedlichen Therapieschemata.

Weiterhin muss man erwähnen, dass in unserer Kohorte Patienten mit niedrigerer mPR3-Expression (kleiner 70 %) länger beobachtet wurden bzw. einen längeren Krankheitsverlauf aufwiesen. Dies könnte einen Einfluss auf unsere Beobachtung haben, dass wir mit steigender Rezidivanzahl (längere Beobachtungszeiten) keine positive Korrelation zur mPR3-Expression finden konnten.

Immer wieder werden Zusammenhänge zwischen Aktivität der Grunderkrankung und Schwankungen des ANCA-Titers kontrovers diskutiert. Jahrelang wurde ein Anstieg des ANCA-Titers als Prädiktor für ein Rezidiv diskutiert (van der Woude / Rasmussen et al. 1985; Stegeman 2002; Hoffman / Stone et al. 2005). Unsere Daten zeigen keinen Zusammenhang von mPR3-Expression und ANCA-Positivität.

Ein Trend zeigte sich für den Zusammenhang von Krankheitsaktivität und ANCA-Positivität im Jahresverlauf sowie einen höheren Anteil ANCA-positiver Patienten zu Zeiten hoher Aktivität (definiert als Erstdiagnose und / oder Rezidiv). Die ANCA-Positivität im Jahresdurchschnitt bei 64 % verglichen mit 87 % zu Zeitpunkten mit hoher Aktivität ($p = 0,004$).

Betrachtet man die Gesamtheit der Literatur zu diesem Thema, dann ist die herrschende Meinung, dass ein ANCA-Anstieg allein keine therapeutischen Maßnahmen zur Folge haben muss, aber als Hinweis für ein mögliches Rezidiv gesehen werden sollte (Kerr / Fleisher et al. 1993; Kyndt / Reumaux et al. 1999; Boomsma / Stegeman et al. 2000; Girard / Mahr et al. 2001; Nowack / Grab et al. 2001). Anhaltende ANCA-Positivität stellt einen Risikofaktor für ein Rezidiv dar (Kyndt / Reumaux et al. 1999; Boomsma / Stegeman et al. 2000; Sanders / Huitma et al. 2006). Selbst eine prospektive multizentrische Studie im Rahmen des WGET erbrachte keine signifikanten Ergebnisse für die Variabilität der ANCA-Level (es wurden ANCA-Titer bestimmt für Pro-PR3 und reifes PR3) und ihrer prädiktiven Eigenschaften bezüglich eines Rezidivs (Finkielman / Merkel et al. 2007).

Betrachtet man das Nierenüberleben (definiert als Nicht-Erreichen der terminalen Niereninsuffizienz verursacht durch die Grunderkrankung) unserer Kohorte, so liegt es bei 81 %, was im Rahmen der aktuellen Literatur bei ungefähr 75 – 80 % liegt (Aasarod / Iversen et al. 2000; Aasarod / Bostad et al. 2001; Weidner / Geuss et al. 2004). Im Rahmen der von Aasarod et al. durchgeführten Studie von 2000 zeigte sich ein Zwei-Jahres-Nierenüberleben von 86 % und ein Fünf-Jahres-Nierenüberleben von 75 % (Aasarod / Iversen et al. 2000).

4.8 Aussichten

Der Stellenwert der Interaktion der ANCA mit ihrem Zielantigen mPR3 ist unbestritten. Trotzdem bleiben weiterhin viele Fragen offen, sei es die Frage nach der Stabilität der mPR3-Expression z. B. unter extremen Bedingungen wie Sepsis oder die Frage nach beteiligten intrazellulären Signalwegen. Die dazu bestehenden Hinweise sind bei Weitem noch nicht vollständig untersucht und interpretiert. Hier hat die

Grundlagenforschung einen großen Stellenwert, um eine Basis für anschließende experimentelle Studien zu schaffen.

Die eigens für diese Arbeit erstellte Datenbank wird weiterentwickelt. Zum jetzigen Zeitpunkt wird sie für den Poliklinikalltag und klinische Forschungszwecke genutzt.

Nachdem mit heutigen therapeutischen Ansätzen das Überleben der Patienten deutlich verlängert werden konnte (siehe Einleitung), erfolgen nun Therapieoptimierungen, um Nebenwirkungen zu vermindern, ohne den therapeutischen Nutzen zu reduzieren.

Durch weitere Kohortenbeschreibungen mit standardisierten Analysen (z. B. WGET) werden eine weitere Evaluation von Risikofaktoren sowie eine bessere klinische Einschätzung der Patienten möglich. Ziel sollte es sein, eine Risikoklassifizierung zu erreichen, mit der es möglich ist, Hochrisikopatienten zu identifizieren, um diese engermaschiger zu beobachten und ggf. diese Patientengruppe intensiveren Therapieschemata (höhere Dosen oder längere Therapie) zuzuführen. Umgekehrt müssen Patienten mit einem sehr geringen Rezidivrisiko erkannt werden, um Therapienebenwirkungen zu reduzieren.

Die Hinzunahme neuer Biomarker, wie der mPR3 Prozentsatz neutrophiler Granulozyten könnte in Schritt sein, diese Ziele zu erreichen.

5 Zusammenfassung

Die Wegener'sche Granulomatose ist eine seltene Erkrankung, die mit einer Entzündung der mittleren und kleinen Gefäße einhergeht. Viele Fragen in Bezug auf Auslöser, Entstehung und Pathophysiologie bleiben trotz intensiver Forschung bis zum heutigen Tage unbeantwortet. Die zentrale Rolle im Rahmen des pathophysiologischen Geschehens dieser Erkrankung wird der Interaktion gepimter neutrophiler Granulozyten mit Autoantikörpern gegen PR3 und konsekutiver Degranulation, Zytokin-sowie Sauerstoffradikalproduktion mit gesteigerter Adhäsion, Apoptose und Transmigration zugeschrieben.

Unter Berücksichtigung dieses Wissens wurde eine Datenbank entworfen, die der Dokumentation der mPR3-Expression sowie der Erfassung paraklinischer, klinischer und histologischer Daten dient.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass WG-Patienten eine signifikant höhere mPR3-Expression als gesunde Kontrollen aufweisen.

Diese höhere mPR3-Expression hat einen signifikanten Einfluss auf den Schweregrad der Erkrankung.

Paraklinisch konnten wir insbesondere einen Einfluss der mPR3-Expression auf die Nierenfunktionsparameter (Kreatinin und GFR) bei Erstdiagnose, im weiteren Verlauf sowie bei Rezidiven zeigen. Patienten mit einer höheren mPR3-Expression hatten sowohl ein ausgeprägteres akutes Nierenversagen bei Erstdiagnose als auch ein schlechteres Nierenüberleben während des Verlaufs. Zudem fanden sich eine signifikant ausgeprägtere Anämie, ein signifikant höheres CrP sowie ein signifikant vermindertes Albumin in Patienten mit höherer mPR3-Expression.

In den Nierenbiopsien von Patienten mit höherer mPR3-Expression fand sich eine signifikante Häufung von Nekrosen.

Für das Auftreten von Rezidiven konnte keine Korrelation zur mPR3-Expression gezeigt werden jedoch ein Bezug zur c-ANCA-Positivität.

Ein klinischer Einfluss von der mPR3-Expression auf die Anzahl betroffener Organsysteme, BVAS, VDI oder einer Organsystemprävalenz konnte nicht gezeigt werden.

Diese Arbeit zeigt in einer großen Kohorte von ausschließlich PR3-ANCA positiven WG-Patienten die Bedeutung einer hohen mPR3-Expression für den Krankheitsverlauf.

6 Summary

The Wegener'sche granulomatosis is a rare disease with an inflammation of medium and small vessels. Despite intensive research many issues related to trigger, origin and pathophysiology remain until today unanswered. The central role in the pathophysiological processes of this disease is the interaction of neutrophil granulocytes primed by auto antibodies against PR3 and consecutive degranulation, cytokine and oxygen radical production with increased adhesion, apoptosis, and transmigration.

Taking into account this knowledge, a database was designed to document the mPR3 expression on top of paraclinical, clinical and histological data. The present work shows that WG patients have a significantly higher mPR3 expression than healthy control.

This higher mPR3 expression has a significant influence on the severity of the disease. In particular we found influence of mPR3 expression on renal function parameters (creatinine and GFR) at initial diagnosis, in the further course and relapses. Patients with a higher expression of mPR3 had both a stronger acute renal failure at initial diagnosis as well as a worse renal survival during the course. In addition, there were a significantly greater anemia, a significantly higher CRP and albumin decreased significantly in patients with higher mPR3 expression.

Kidney biopsy of patients with higher mPR3 expression had a significant accumulation of necrosis.

The occurrence of relapses was not correlated to the mPR3 expression, however, a reference to c-ANCA positivity was seen.

A clinical effect of the mPR3 expression on the number of affected organ systems, BVAS, VDI or an organ system prevalence could not be shown.

This work shows in a large cohort of exclusively PR3-ANCA positive WG-patients the importance of a high mPR3 expression for disease progression.

7 Literaturverzeichnis

- (1995). „European therapeutic trials in ANCA-associated systemic vasculitis: disease scoring, consensus regimens and proposed clinical trials. European Community Study Group on Clinical Trials in Systemic Vasculitis ECSYSVASTRIAL“ Clin Exp Immunol **101 Suppl 1**: 29-34; PMID 7606858.
- Aasarod, K., L. Bostad et al. (2001). „Renal histopathology and clinical course in 94 patients with Wegener's granulomatosis“ Nephrol Dial Transplant **16**(5): 953-60; PMID 11328900.
- Aasarod, K., B. M. Iversen et al. (2000). „Wegener's granulomatosis: clinical course in 108 patients with renal involvement“ Nephrol Dial Transplant **15**(5): 611-8; PMID 10809800.
- Abdulhad, W. H., C. A. Stegeman et al. (2007). „Functional defect of circulating regulatory CD4+ T cells in patients with Wegener's granulomatosis in remission“ Arthritis Rheum **56**(6): 2080-91; PMID 17530650.
- Andrassy, K., A. Erb et al. (1991). „Wegener's granulomatosis with renal involvement: patient survival and correlations between initial renal function, renal histology, therapy and renal outcome“ Clin Nephrol **35**(4): 139-47; PMID 1855316.
- Audrain, M. A., R. Sesboue et al. (2001). „Analysis of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): frequency and specificity in a sample of 191 homozygous (PiZZ) alpha1-antitrypsin-deficient subjects“ Nephrol Dial Transplant **16**(1): 39-44; PMID 11208991.
- Bacon, P. A. (2005). „The spectrum of Wegener's granulomatosis and disease relapse“ N Engl J Med **352**(4): 330-2; PMID 15673799.
- Ballieux, B. E., K. T. Zondervan et al. (1994). „Binding of proteinase 3 and myeloperoxidase to endothelial cells: ANCA-mediated endothelial damage through ADCC?“ Clin Exp Immunol **97**(1): 52-60; PMID 8033421.
- Beaudreuil, S., G. Lasfargues et al. (2005). „Occupational exposure in ANCA-positive patients: a case-control study“ Kidney Int **67**(5): 1961-6; PMID 15840044.
- Bellomo, R., C. Ronco et al. (2004). „Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group“ Crit Care **8**(4): R204-12; PMID 15312219.
- Berger, S. P., M. A. Seelen et al. (1996). „Proteinase 3, the major autoantigen of Wegener's granulomatosis, enhances IL-8 production by endothelial cells in vitro“ J Am Soc Nephrol **7**(5): 694-701; PMID 8738804.
- Boissy, C., E. Bernard et al. (1997). „[Wegener's granulomatosis disclosed by hepato-splenic involvement]“ Gastroenterol Clin Biol **21**(8-9): 633-5; PMID 9587507.
- Boomsma, M. M., C. A. Stegeman et al. (2000). „Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of antineutrophil cytoplasmic antibody levels: a prospective study“ Arthritis Rheum **43**(9): 2025-33; PMID 11014352.
- Booth, A. D., M. K. Almond et al. (2003). „Outcome of ANCA-associated renal vasculitis: a 5-year retrospective study“ Am J Kidney Dis **41**(4): 776-84; PMID 12666064.

- Borgmann, S. and M. Haubitz (2004). „Genetic impact of pathogenesis and prognosis of ANCA-associated vasculitides“ Clin Exp Rheumatol **22**(6 Suppl 36): S79-86; PMID 15675141.
- Bories, D., M. C. Raynal et al. (1989). „Down-regulation of a serine protease, myeloblastin, causes growth arrest and differentiation of promyelocytic leukemia cells“ Cell **59**(6): 959-68; PMID 2598267.
- Boucelma, M., D. Hakem et al. (2005). „[Wegener's Granulomatosis and necrotizing ulceration of the breast. One case report]“ Rev Med Interne **26**(2): 155-7; PMID 15710266.
- Brachemi, S., A. Mambole et al. (2007). „Increased membrane expression of proteinase 3 during neutrophil adhesion in the presence of anti proteinase 3 antibodies“ J Am Soc Nephrol **18**(8): 2330-9; PMID 17634439.
- Briedigkeit, L., R. Kettritz et al. (1993). „Prognostic factors in Wegener's granulomatosis“ Postgrad Med J **69**(817): 856-61; PMID 8290430.
- Brons, R. H., H. I. Bakker et al. (2000). „Staphylococcal acid phosphatase binds to endothelial cells via charge interaction; a pathogenic role in Wegener's granulomatosis?“ Clin Exp Immunol **119**(3): 566-73; PMID 10691932.
- Brouwer, E., M. G. Huitema et al. (1994). „Neutrophil activation in vitro and in vivo in Wegener's granulomatosis“ Kidney Int **45**(4): 1120-31; PMID 8007582.
- Brouwer, E., J. W. Tervaert et al. (1991). „Predominance of IgG1 and IgG4 subclasses of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in patients with Wegener's granulomatosis and clinically related disorders“ Clin Exp Immunol **83**(3): 379-86; PMID 1848489.
- Buhaescu, I., A. Covic et al. (2005). „Systemic vasculitis: still a challenging disease“ Am J Kidney Dis **46**(2): 173-85; PMID 16112036.
- Buttrum, S. M., E. M. Drost et al. (1994). „Rheological response of neutrophils to different types of stimulation“ J Appl Physiol **77**(4): 1801-10; PMID 7836203.
- Campanelli, D., M. Melchior et al. (1990). „Cloning of cDNA for proteinase 3: a serine protease, antibiotic, and autoantigen from human neutrophils“ J Exp Med **172**(6): 1709-15; PMID 2258701.
- Cantin, A. (1995). „Cystic fibrosis lung inflammation: early, sustained, and severe“ Am J Respir Crit Care Med **151**(4): 939-41; PMID 7697269.
- Carruthers, D. M., R. A. Watts et al. (1996). „Wegener's granulomatosis--increased incidence or increased recognition?“ Br J Rheumatol **35**(2): 142-5; PMID 8612026.
- Charles, L. A., M. L. Caldas et al. (1991). „Antibodies against granule proteins activate neutrophils in vitro“ J Leukoc Biol **50**(6): 539-46; PMID 1658170.
- Chegar, B. E. and R. T. Kelley (2004). „Wegener's granulomatosis presenting as unilateral parotid enlargement“ Laryngoscope **114**(10): 1730-3; PMID 15454762.
- Cockwell, P., C. J. Brooks et al. (1999). „Interleukin-8: A pathogenetic role in antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis“ Kidney Int **55**(3): 852-63; PMID 10027922.

- Cordier, J. F., D. Valeyre et al. (1990). „Pulmonary Wegener's granulomatosis. A clinical and imaging study of 77 cases“ Chest **97**(4): 906-12; PMID 2323259.
- Coremans, I. E., E. C. Hagen et al. (1992). „Antilactoferrin antibodies in patients with rheumatoid arthritis are associated with vasculitis“ Arthritis Rheum **35**(12): 1466-75; PMID 1282009.
- Csernok, E., M. Ernst et al. (1994). „Activated neutrophils express proteinase 3 on their plasma membrane in vitro and in vivo“ Clin Exp Immunol **95**(2): 244-50; PMID 8306499.
- Csernok, E., A. Trabandt et al. (1999). „Cytokine profiles in Wegener's granulomatosis: predominance of type 1 (Th1) in the granulomatous inflammation“ Arthritis Rheum **42**(4): 742-50; PMID 10211889.
- Culton, D. A., M. W. Nicholas et al. (2007). „Similar CD19 dysregulation in two autoantibody-associated autoimmune diseases suggests a shared mechanism of B-cell tolerance loss“ J Clin Immunol **27**(1): 53-68; PMID 17195045.
- Daoud, M. S., L. E. Gibson et al. (1994). „Cutaneous Wegener's granulomatosis: clinical, histopathologic, and immunopathologic features of thirty patients“ J Am Acad Dermatol **31**(4): 605-12; PMID 8089286.
- Davies, C. W. and C. G. Wathen (1997). „Wegener's granulomatosis presenting as prostate and submandibular gland disease“ Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis **14**(2): 190-1; PMID 9306514.
- Davies, D. J., J. E. Moran et al. (1982). „Segmental necrotising glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology?“ Br Med J (Clin Res Ed) **285**(6342): 606; PMID 6297657.
- De Bandt, M., O. Meyer et al. (1999). „Anti-proteinase-3 (PR3) antibodies (C-ANCA) recognize various targets on the human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) membrane“ Clin Exp Immunol **115**(2): 362-8; PMID 9933466.
- de Groot, K., D. Adu et al. (2001). „The value of pulse cyclophosphamide in ANCA-associated vasculitis: meta-analysis and critical review“ Nephrol Dial Transplant **16**(10): 2018-27; PMID 11572891.
- de Groot, K., E. Reinhold-Keller et al. (1996). „Therapy for the maintenance of remission in sixty-five patients with generalized Wegener's granulomatosis. Methotrexate versus trimethoprim/sulfamethoxazole“ Arthritis Rheum **39**(12): 2052-61; PMID 8961911.
- Deniz, K., H. S. Ozseker et al. (2007). „Intestinal involvement in Wegener's granulomatosis“ J Gastrointest Liver Dis **16**(3): 329-31; PMID 17925931.
- Dewald, B., R. Rindler-Ludwig et al. (1975). „Subcellular localization and heterogeneity of neutral proteases in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes“ J Exp Med **141**(4): 709-23; PMID 236354.
- Duna, G. F., M. F. Cotch et al. (1998). „Wegener's granulomatosis: role of environmental exposures“ Clin Exp Rheumatol **16**(6): 669-74; PMID 9844758.
- Duna, G. F., C. Galperin et al. (1995). „Wegener's granulomatosis“ Rheum Dis Clin North Am **21**(4): 949-86; PMID 8592744.

- Egner, W. and H. M. Chapel (1990). „Titration of antibodies against neutrophil cytoplasmic antigens is useful in monitoring disease activity in systemic vasculitides“ Clin Exp Immunol **82**(2): 244-9; PMID 1978703.
- Elzouki, A. N., M. Segelmark et al. (1994). „Strong link between the alpha 1-antitrypsin PiZ allele and Wegener's granulomatosis“ J Intern Med **236**(5): 543-8; PMID 7964431.
- Esnault, V. L., A. Testa et al. (1993). „Alpha 1-antitrypsin genetic polymorphism in ANCA-positive systemic vasculitis“ Kidney Int **43**(6): 1329-32; PMID 8315946.
- Ewert, B. H., J. C. Jennette et al. (1992). „Anti-myeloperoxidase antibodies stimulate neutrophils to damage human endothelial cells“ Kidney Int **41**(2): 375-83; PMID 1313124.
- Exley, A. R., P. A. Bacon et al. (1997). „Development and initial validation of the Vasculitis Damage Index for the standardized clinical assessment of damage in the systemic vasculitides“ Arthritis Rheum **40**(2): 371-80; PMID 9041949.
- Falk, R. J., S. Hogan et al. (1990). „Clinical course of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis and systemic vasculitis. The Glomerular Disease Collaborative Network“ Ann Intern Med **113**(9): 656-63; PMID 2221646.
- Falk, R. J. and J. C. Jennette (1988). „Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis“ N Engl J Med **318**(25): 1651-7; PMID 2453802.
- Falk, R. J., R. S. Terrell et al. (1990). „Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro“ Proc Natl Acad Sci U S A **87**(11): 4115-9; PMID 2161532.
- Fechner, F. P., W. C. Faquin et al. (2002). „Wegener's granulomatosis of the orbit: a clinicopathological study of 15 patients“ Laryngoscope **112**(11): 1945-50; PMID 12439160.
- Feynman, R. P. (2003). „Es ist so einfach: Vom Vergnügen, Dinge zu entdecken“ Piper(4.): 148; PMID
- Fienberg (1989). „A morphologic and immunohistologic study of the evolution of the necrotizing palisading granuloma of pathergic (Wegener's) granulomatosis.“ Semin Respir Med **10**: 126-132; PMID
- Finkielman, J. D., P. A. Merkel et al. (2007). „Antiproteinase 3 antineutrophil cytoplasmic antibodies and disease activity in Wegener granulomatosis“ Ann Intern Med **147**(9): 611-9; PMID 17975183.
- Franssen, C. F., M. G. Huitema et al. (1999). „In vitro neutrophil activation by antibodies to proteinase 3 and myeloperoxidase from patients with crescentic glomerulonephritis“ J Am Soc Nephrol **10**(7): 1506-15; PMID 10405206.
- Gabay, J. E., J. M. Heiple et al. (1986). „Subcellular location and properties of bactericidal factors from human neutrophils“ J Exp Med **164**(5): 1407-21; PMID 3772295.
- Gaber, K. A., N. G. Ryley et al. (2005). „Wegener's granulomatosis involving prostate“ Urology **66**(1): 195; PMID 16014287.

- Gilligan, H. M., B. Bredy et al. (1996). „Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies interact with primary granule constituents on the surface of apoptotic neutrophils in the absence of neutrophil priming“ J Exp Med **184**(6): 2231-41; PMID 8976178.
- Girard, T., A. Mahr et al. (2001). „Are antineutrophil cytoplasmic antibodies a marker predictive of relapse in Wegener's granulomatosis? A prospective study“ Rheumatology (Oxford) **40**(2): 147-51; PMID 11257150.
- Godman, G. C. and J. Churg (1954). „Wegener's granulomatosis: pathology and review of the literature“ AMA Arch Pathol **58**(6): 533-53; PMID 13217569.
- Goebel, U., R. Kettritz et al. (1995). „Wegener's granulomatosis masquerading as breast cancer“ Arch Intern Med **155**(2): 205-7; PMID 7811131.
- Goldschmeding, R., C. E. van der Schoot et al. (1989). „Wegener's granulomatosis autoantibodies identify a novel diisopropylfluorophosphate-binding protein in the lysosomes of normal human neutrophils“ J Clin Invest **84**(5): 1577-87; PMID 2681270.
- Goodfield, N. E., S. Bhandari et al. (1995). „Cardiac involvement in Wegener's granulomatosis“ Br Heart J **73**(2): 110-5; PMID 7696016.
- Grant, S. C., R. D. Levy et al. (1994). „Wegener's granulomatosis and the heart“ Br Heart J **71**(1): 82-6; PMID 8297703.
- Gunnarsson, R., R. Omdal et al. (2004). „Wegener's granulomatosis of the prostate gland“ Rheumatol Int **24**(2): 120-2; PMID 12879271.
- Gupta, S. K., J. L. Niles et al. (1990). „Identity of Wegener's autoantigen (p29) with proteinase 3 and myeloblastin“ Blood **76**(10): 2162; PMID 2242436.
- Halbwachs-Mecarelli, L., G. Bessou et al. (1995). „Bimodal distribution of proteinase 3 (PR3) surface expression reflects a constitutive heterogeneity in the polymorphonuclear neutrophil pool“ FEBS Lett **374**(1): 29-33; PMID 7589506.
- Halbwachs-Mecarelli, L., P. Nusbaum et al. (1992). „Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) directed against cathepsin G in ulcerative colitis, Crohn's disease and primary sclerosing cholangitis“ Clin Exp Immunol **90**(1): 79-84; PMID 1327593.
- Haller, H., J. Eichhorn et al. (1996). „Circulating leukocyte integrin expression in Wegener's granulomatosis“ J Am Soc Nephrol **7**(1): 40-8; PMID 8808108.
- Harper, L., P. Cockwell et al. (2001). „Neutrophil priming and apoptosis in anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis“ Kidney Int **59**(5): 1729-38; PMID 11318943.
- Harper, S. L., E. Letko et al. (2001). „Wegener's granulomatosis: the relationship between ocular and systemic disease“ J Rheumatol **28**(5): 1025-32; PMID 11361183.
- Hattar, K., U. Grandel et al. (2002). „Interaction of antibodies to proteinase 3 (classic anti-neutrophil cytoplasmic antibody) with human renal tubular epithelial cells: impact on signaling events and inflammatory mediator generation“ J Immunol **168**(6): 3057-64; PMID 11884479.
- Haubitz, M., S. Schellong et al. (1998). „Intravenous pulse administration of cyclophosphamide versus daily oral treatment in patients with antineutrophil cytoplasmic antibody-

- associated vasculitis and renal involvement: a prospective, randomized study“ Arthritis Rheum **41**(10): 1835-44; PMID 9778225.
- Hauschild, S., W. H. Schmitt et al. (1993). „ANCA in systemic vasculitides, collagen vascular diseases, rheumatic disorders and inflammatory bowel diseases“ Adv Exp Med Biol **336**: 245-51; PMID 8296613.
- Hechtman, D. H., M. I. Cybulsky et al. (1991). „Intravascular IL-8. Inhibitor of polymorphonuclear leukocyte accumulation at sites of acute inflammation“ J Immunol **147**(3): 883-92; PMID 1650387.
- Heldmann, F., J. Brandt et al. (2006). „[A 46-year-old-patient with granulomatous prostatitis, arthralgia and haemorrhagic rhinitis]“ Dtsch Med Wochenschr **131**(1-2): 22-5; PMID 16374738.
- Hoffman, G. S. and G. S. Kerr (1995). „Rise in ANCA titer: to treat or not to treat“ Am J Med **98**(1): 102-3; PMID 7825611.
- Hoffman, G. S., G. S. Kerr et al. (1992). „Wegener granulomatosis: an analysis of 158 patients“ Ann Intern Med **116**(6): 488-98; PMID 1739240.
- Hoffman, G. S. and U. Specks (1998). „Antineutrophil cytoplasmic antibodies“ Arthritis Rheum **41**(9): 1521-37; PMID 9751084.
- Hoffman, G. S., J. H. Stone et al. (2005). „Implications of antineutrophil cytoplasmic antibody status when switching to maintenance therapy“ Arthritis Rheum **53**(1): 1-2; PMID 15696572.
- Hogan, S. L., R. J. Falk et al. (2005). „Predictors of relapse and treatment resistance in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated small-vessel vasculitis“ Ann Intern Med **143**(9): 621-31; PMID 16263884.
- Hogan, S. L., K. K. Satterly et al. (2001). „Silica exposure in anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis and lupus nephritis“ J Am Soc Nephrol **12**(1): 134-42; PMID 11134259.
- Huang, D., R. Giscombe et al. (2000). „Polymorphisms in CTLA-4 but not tumor necrosis factor-alpha or interleukin 1beta genes are associated with Wegener's granulomatosis“ J Rheumatol **27**(2): 397-401; PMID 10685804.
- Huong, D. L., T. Papo et al. (1995). „Urogenital manifestations of Wegener granulomatosis“ Medicine (Baltimore) **74**(3): 152-61; PMID 7760722.
- Iampol'skaia, S. A. (1977). „[Hepato-renal failure in Wegener's granulomatosis]“ Vrach Delo(11): 41-3; PMID 595558.
- Imamoglu, M., O. Bahadir et al. (2003). „Parotid gland involvement as an initial presentation of Wegener's granulomatosis“ Otolaryngol Head Neck Surg **129**(4): 451-3; PMID 14574306.
- Ivanov, S. (1999). „[Wegner granulomatosis with initial manifestation of bilateral granulomatous purulent necrotic mastitis]“ Khirurgiia (Sofia) **55**(4): 54-7; PMID 11194660.
- Jagiello, P., P. Aries et al. (2005). „The PTPN22 620W allele is a risk factor for Wegener's granulomatosis“ Arthritis Rheum **52**(12): 4039-43; PMID 16320352.

- Jayne, D., N. Rasmussen et al. (2003). „A randomized trial of maintenance therapy for vasculitis associated with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies“ N Engl J Med **349**(1): 36-44; PMID 12840090.
- Jayne, D. R., G. Gaskin et al. (1995). „ANCA and predicting relapse in systemic vasculitis“ Qim **88**(2): 127-33; PMID 7704563.
- Jayne, D. R., G. Gaskin et al. (2007). „Randomized trial of plasma exchange or high-dosage methylprednisolone as adjunctive therapy for severe renal vasculitis“ J Am Soc Nephrol **18**(7): 2180-8; PMID 17582159.
- Jenne, D. E., J. Tschopp et al. (1990). „Wegener's autoantigen decoded“ Nature **346**(6284): 520; PMID 2377228.
- Jennette, J. C. and R. J. Falk (1997). „Small-vessel vasculitis“ N Engl J Med **337**(21): 1512-23; PMID 9366584.
- Jennette, J. C., R. J. Falk et al. (1994). „Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference“ Arthritis Rheum **37**(2): 187-92; PMID 8129773.
- Jennette, J. C., H. Xiao et al. (2006). „Pathogenesis of vascular inflammation by anti-neutrophil cytoplasmic antibodies“ J Am Soc Nephrol **17**(5): 1235-42; PMID 16624929.
- Johnson, P. A., H. D. Alexander et al. (1997). „Up-regulation of the endothelial cell adhesion molecule intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) by autoantibodies in autoimmune vasculitis“ Clin Exp Immunol **108**(2): 234-42; PMID 9158091.
- Jones, G. L., A. D. Lukaris et al. (2005). „Wegener's granulomatosis mimicking a parotid abscess“ J Laryngol Otol **119**(9): 746-9; PMID 16156923.
- Kallenberg, C. G., J. W. Tervaert et al. (1990). „Criteria for disease activity in Wegener's granulomatosis: a requirement for longitudinal clinical studies“ APMIS Suppl **19**: 37-9; PMID 2285535.
- Kavanaugh, A. F. and D. P. Huston (1988). „Wegener's granulomatosis presenting with unilateral parotid enlargement“ Am J Med **85**(5): 741-2; PMID 3189382.
- Keogan, M. T., V. L. Esnault et al. (1992). „Activation of normal neutrophils by anti-neutrophil cytoplasm antibodies“ Clin Exp Immunol **90**(2): 228-34; PMID 1424279.
- Keogh, K. A., S. R. Ytterberg 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): 180-7; PMID 16224107.
- Kerr, G. S., T. A. Fleisher et al. (1993). „Limited prognostic value of changes in antineutrophil cytoplasmic antibody titer in patients with Wegener's granulomatosis“ Arthritis Rheum **36**(3): 365-71; PMID 8452581.
- Kettritz, R., M. L. Gaido et al. (1998). „Interleukin-8 delays spontaneous and tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis of human neutrophils“ Kidney Int **53**(1): 84-91; PMID 9453003.
- Kettritz, R., J. C. Jennette et al. (1997). „Crosslinking of ANCA-antigens stimulates superoxide release by human neutrophils“ J Am Soc Nephrol **8**(3): 386-94; PMID 9071707.

- King, W. J., D. Adu et al. (1995). „Endothelial cells and renal epithelial cells do not express the Wegener's autoantigen, proteinase 3“ Clin Exp Immunol **102**(1): 98-105; PMID 7554407.
- Klisnick, A., B. Souweine et al. (1998). „[Association of acute pericarditis and acute renal insufficiency: causes and prognosis]“ Presse Med **27**(33): 1668-73; PMID 9834778.
- Koldingsnes, W. and H. Nossent (2000). „Epidemiology of Wegener's granulomatosis in northern Norway“ Arthritis Rheum **43**(11): 2481-7; PMID 11083271.
- Kyndt, X., D. Reumaux et al. (1999). „Serial measurements of antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in patients with systemic vasculitis“ Am J Med **106**(5): 527-33; PMID 10335724.
- Labbaye, C., P. Musette et al. (1991). „Wegener autoantigen and myeloblastin are encoded by a single mRNA“ Proc Natl Acad Sci U S A **88**(20): 9253-6; PMID 1681549.
- Lamprecht, P., H. Bruhl et al. (2003). „Differences in CCR5 expression on peripheral blood CD4+CD28- T-cells and in granulomatous lesions between localized and generalized Wegener's granulomatosis“ Clin Immunol **108**(1): 1-7; PMID 12865065.
- Lamprecht, P., E. Csernok et al. (2006). „Effector memory T cells as driving force of granuloma formation and autoimmunity in Wegener's granulomatosis“ J Intern Med **260**(3): 187-91; PMID 16918816.
- Lamprecht, P., A. Erdmann 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; PMID 12716450.
- Leavitt, R. Y., A. S. Fauci et al. (1990). „The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Wegener's granulomatosis“ Arthritis Rheum **33**(8): 1101-7; PMID 2202308.
- Ludemann, J., B. Utecht et al. (1990). „Anti-neutrophil cytoplasm antibodies in Wegener's granulomatosis recognize an elastinolytic enzyme“ J Exp Med **171**(1): 357-62; PMID 1688612.
- Ludviksson, B. R., M. C. Sneller et al. (1998). „Active Wegener's granulomatosis is associated with HLA-DR+ CD4+ T cells exhibiting an unbalanced Th1-type T cell cytokine pattern: reversal with IL-10“ J Immunol **160**(7): 3602-9; PMID 9531324.
- Lustmann, J., N. Segal et al. (1994). „Salivary gland involvement in Wegener's granulomatosis. A case report and review of the literature“ Oral Surg Oral Med Oral Pathol **77**(3): 254-9; PMID 7695676.
- Mahr, A., N. Artigues et al. (2006). „Seasonal variations in onset of Wegener's granulomatosis: increased in summer?“ J Rheumatol **33**(8): 1615-22; PMID 16832845.
- Matsumoto, T., T. Kaneko et al. (2006). „Proteinase 3 expression on neutrophil membranes from patients with infectious disease“ Shock **26**(2): 128-33; PMID 16878019.
- Mayet, W. J., E. Csernok et al. (1993). „Human endothelial cells express proteinase 3, the target antigen of anticytoplasmic antibodies in Wegener's granulomatosis“ Blood **82**(4): 1221-9; PMID 8353286.

- Mayet, W. J. and K. H. Meyer zum Buschenfelde (1993). „Antibodies to proteinase 3 increase adhesion of neutrophils to human endothelial cells“ Clin Exp Immunol **94**(3): 440-6; PMID 7504599.
- Merkel, P. A., G. H. Lo et al. (2005). „Brief communication: high incidence of venous thrombotic events among patients with Wegener granulomatosis: the Wegener's Clinical Occurrence of Thrombosis (WeCLOT) Study“ Ann Intern Med **142**(8): 620-6; PMID 15838068.
- Moosig, F., E. Csernok et al. (1998). „Costimulatory molecules in Wegener's granulomatosis (WG): lack of expression of CD28 and preferential up-regulation of its ligands B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) on T cells“ Clin Exp Immunol **114**(1): 113-8; PMID 9764612.
- Muller Kobold, A. C., C. G. Kallenberg et al. (1998). „Leucocyte membrane expression of proteinase 3 correlates with disease activity in patients with Wegener's granulomatosis“ Br J Rheumatol **37**(8): 901-7; PMID 9734683.
- Nachman, P. H., S. L. Hogan et al. (1996). „Treatment response and relapse in antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated microscopic polyangiitis and glomerulonephritis“ J Am Soc Nephrol **7**(1): 33-9; PMID 8808107.
- Naz, S. M. and K. Fairburn (2005). „Pseudotumor of the breast: an unusual presentation of Wegener's granulomatosis“ Breast J **11**(4): 295-6; PMID 15982404.
- Neralic-Meniga, I., Z. Ivanovi-Herceg et al. (2006). „Wegener's granulomatosis of the breast“ Wien Klin Wochenschr **118**(3-4): 120-3; PMID 16703257.
- Niles, J. L., R. T. McCluskey et al. (1989). „Wegener's granulomatosis autoantigen is a novel neutrophil serine proteinase“ Blood **74**(6): 1888-93; PMID 2679910.
- Noronha, I. L., C. Kruger et al. (1993). „In situ production of TNF-alpha, IL-1 beta and IL-2R in ANCA-positive glomerulonephritis“ Kidney Int **43**(3): 682-92; PMID 8455368.
- Nowack, R., I. Grab 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; PMID 11477166.
- Nowack, R., K. Schwalbe et al. (2000). „Upregulation of CD14 and CD18 on monocytes In vitro by antineutrophil cytoplasmic autoantibodies“ J Am Soc Nephrol **11**(9): 1639-46; PMID 10966488.
- Pagnoux, C., A. Mahr et al. (2005). „Presentation and outcome of gastrointestinal involvement in systemic necrotizing vasculitides: analysis of 62 patients with polyarteritis nodosa, microscopic polyangiitis, Wegener granulomatosis, Churg-Strauss syndrome, or rheumatoid arthritis-associated vasculitis“ Medicine (Baltimore) **84**(2): 115-28; PMID 15758841.
- Pandiyan, P., D. Gartner et al. (2004). „CD152 (CTLA-4) determines the unequal resistance of Th1 and Th2 cells against activation-induced cell death by a mechanism requiring PI3 kinase function“ J Exp Med **199**(6): 831-42; PMID 15007096.
- Pendergraft, W. F., 3rd, G. A. Preston et al. (2004). „Autoimmunity is triggered by cPR-3(105-201), a protein complementary to human autoantigen proteinase-3“ Nat Med **10**(1): 72-9; PMID 14661018.

- Pendergraft, W. F., D. A. Alcorta et al. (2000). „ANCA antigens, proteinase 3 and myeloperoxidase, are not expressed in endothelial cells“ Kidney Int **57**(5): 1981-90; PMID 10792617.
- Popa, E. R. and J. W. Tervaert (2003). „The relation between Staphylococcus aureus and Wegener's granulomatosis: current knowledge and future directions“ Intern Med **42**(9): 771-80; PMID 14518661.
- Porges, A. J., P. B. Redecha et al. (1994). „Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies engage and activate human neutrophils via Fc gamma RIIa“ J Immunol **153**(3): 1271-80; PMID 8027554.
- Premack, B. A. and T. J. Schall (1996). „Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection“ Nat Med **2**(11): 1174-8; PMID 8898734.
- Pusey, C. D., A. J. Rees et al. (1991). „Plasma exchange in focal necrotizing glomerulonephritis without anti-GBM antibodies“ Kidney Int **40**(4): 757-63; PMID 1745027.
- Qian, Y., C. Santiago et al. (2001). „Lupus-specific antiribonucleoprotein B cell tolerance in nonautoimmune mice is maintained by differentiation to B-1 and governed by B cell receptor signaling thresholds“ J Immunol **166**(4): 2412-9; PMID 11160300.
- Radford, D. J., N. T. Luu et al. (2001). „Antineutrophil cytoplasmic antibodies stabilize adhesion and promote migration of flowing neutrophils on endothelial cells“ Arthritis Rheum **44**(12): 2851-61; PMID 11762946.
- Radhakrishnan, K. R., M. Kay et al. (2006). „Wegener granulomatosis mimicking inflammatory bowel disease in a pediatric patient“ J Pediatr Gastroenterol Nutr **43**(3): 391-4; PMID 16954966.
- Ralston, D. R., C. B. Marsh et al. (1997). „Antineutrophil cytoplasmic antibodies induce monocyte IL-8 release. Role of surface proteinase-3, alpha1-antitrypsin, and Fc gamma receptors“ J Clin Invest **100**(6): 1416-24; PMID 9294107.
- Rao, N. V., N. G. Wehner et al. (1991). „Characterization of proteinase-3 (PR-3), a neutrophil serine proteinase. Structural and functional properties“ J Biol Chem **266**(15): 9540-8; PMID 2033050.
- Rarok, A. A., C. A. Stegeman et al. (2002). „Neutrophil membrane expression of proteinase 3 (PR3) is related to relapse in PR3-ANCA-associated vasculitis“ J Am Soc Nephrol **13**(9): 2232-8; PMID 12191967.
- Rasmussen, N. and J. Petersen (1993). „Cellular immune responses and pathogenesis in c-ANCA positive vasculitides“ J Autoimmun **6**(2): 227-36; PMID 8499060.
- Raynauld, J. P., D. A. Bloch et al. (1993). „Seasonal variation in the onset of Wegener's granulomatosis, polyarteritis nodosa and giant cell arteritis“ J Rheumatol **20**(9): 1524-6; PMID 7909333.
- Reinhold-Keller, E., N. Beuge et al. (2000). „An interdisciplinary approach to the care of patients with Wegener's granulomatosis: long-term outcome in 155 patients“ Arthritis Rheum **43**(5): 1021-32; PMID 10817555.

- Reinhold-Keller, E., C. O. Fink et al. (2002). „High rate of renal relapse in 71 patients with Wegener's granulomatosis under maintenance of remission with low-dose methotrexate“ Arthritis Rheum **47**(3): 326-32; PMID 12115164.
- Reumaux, D., P. J. Vossebeld et al. (1995). „Effect of tumor necrosis factor-induced integrin activation on Fc gamma receptor II-mediated signal transduction: relevance for activation of neutrophils by anti-proteinase 3 or anti-myeloperoxidase antibodies“ Blood **86**(8): 3189-95; PMID 7579414.
- Ricci, Z., D. Cruz et al. (2008). „The RIFLE criteria and mortality in acute kidney injury: A systematic review“ Kidney Int **73**(5): 538-46; PMID 18160961.
- Rollins, B. J. (1997). „Chemokines“ Blood **90**(3): 909-28; PMID 9242519.
- Rooney, C. P., C. Taggart et al. (2001). „Anti-proteinase 3 antibody activation of neutrophils can be inhibited by alpha1-antitrypsin“ Am J Respir Cell Mol Biol **24**(6): 747-54; PMID 11415941.
- Rosen, M. J. (2007). „Dr. Friedrich Wegener, the ACCP, and History“ Chest **132**(3): 739-41; PMID 17873183.
- Sanders, J. S., M. G. Huitma et al. (2006). „Prediction of relapses in PR3-ANCA-associated vasculitis by assessing responses of ANCA titres to treatment“ Rheumatology (Oxford) **45**(6): 724-9; PMID 16399845.
- Saravanappa, N., A. Bibas et al. (2000). „Unilateral parotid swelling as initial manifestation of Wegener's granulomatosis“ J Otolaryngol **29**(6): 396-7; PMID 11770152.
- Savage, C. O. and S. P. Cooke (1993). „The role of the endothelium in systemic vasculitis“ J Autoimmun **6**(2): 237-49; PMID 8499061.
- Savage, C. O., B. E. Pottinger et al. (1992). „Autoantibodies developing to myeloperoxidase and proteinase 3 in systemic vasculitis stimulate neutrophil cytotoxicity toward cultured endothelial cells“ Am J Pathol **141**(2): 335-42; PMID 1323218.
- Schmitt, W. H., E. Csernok et al. (1993). „Autoantibodies directed against lysozyme: a new target antigen for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA)“ Adv Exp Med Biol **336**: 267-72; PMID 8296617.
- Schreiber, A., A. Busjahn et al. (2003). „Membrane expression of proteinase 3 is genetically determined“ J Am Soc Nephrol **14**(1): 68-75; PMID 12506139.
- Schreiber, A., F. C. Luft et al. (2004). „Membrane proteinase 3 expression and ANCA-induced neutrophil activation“ Kidney Int **65**(6): 2172-83; PMID 15149330.
- Schreiber, A., B. Otto et al. (2005). „Membrane proteinase 3 expression in patients with Wegener's granulomatosis and in human hematopoietic stem cell-derived neutrophils“ J Am Soc Nephrol **16**(7): 2216-24; PMID 15901769.
- Schuerwegh, A. J., J. Verhelst et al. (2007). „Wegener's granulomatosis presenting as a thyroid mass“ Clin Rheumatol **26**(3): 454-6; PMID 16538394.
- Schultz, H., J. Weiss et al. (2001). „The endotoxin-binding bactericidal/permeability-increasing protein (BPI): a target antigen of autoantibodies“ J Leukoc Biol **69**(4): 505-12; PMID 11310835.

- Seo, P. and J. H. Stone (2004). „The antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitides“ Am J Med **117**(1): 39-50; PMID 15210387.
- Sibelius, U., K. Hattar et al. (1998). „Wegener's granulomatosis: anti-proteinase 3 antibodies are potent inducers of human endothelial cell signaling and leakage response“ J Exp Med **187**(4): 497-503; PMID 9463400.
- Simonet, W. S., T. M. Hughes et al. (1994). „Long-term impaired neutrophil migration in mice overexpressing human interleukin-8“ J Clin Invest **94**(3): 1310-9; PMID 7521886.
- Singhal, R., S. Goodyear et al. (2007). „Macroscopic appearance of the bowel predicts microscopic involvement in gastrointestinal Wegener's granulomatosis: a previously unreported sign“ Minerva Chir **62**(2): 149; PMID 17353860.
- Skare, T. L. and D. M. Zappi (1998). „[Intracardiac mass in suspected case of Wegener's granulomatosis]“ Arq Bras Cardiol **71**(4): 609-11; PMID 10347938.
- Sneller, M. C. (2002). „Granuloma formation, implications for the pathogenesis of vasculitis“ Cleve Clin J Med **69 Suppl 2**: SII40-3; PMID 12086263.
- Specks, U., E. M. Wiegert et al. (1997). „Human mast cells expressing recombinant proteinase 3 (PR3) as substrate for clinical testing for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA)“ Clin Exp Immunol **109**(2): 286-95; PMID 9276524.
- Stassen, P. M., R. P. Derks et al. (2008). „Venous thromboembolism in ANCA-associated vasculitis--incidence and risk factors“ Rheumatology (Oxford) **47**(4): 530-4; PMID 18356178.
- Stegeman, C. A. (2002). „Anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) levels directed against proteinase-3 and myeloperoxidase are helpful in predicting disease relapse in ANCA-associated small-vessel vasculitis“ Nephrol Dial Transplant **17**(12): 2077-80; PMID 12454214.
- Stegeman, C. A., J. W. Tervaert et al. (1996). „Trimethoprim-sulfamethoxazole (co-trimoxazole) for the prevention of relapses of Wegener's granulomatosis. Dutch Co-Trimoxazole Wegener Study Group“ N Engl J Med **335**(1): 16-20; PMID 8637536.
- Stegeman, C. A., J. W. Tervaert et al. (1994). „Association of chronic nasal carriage of Staphylococcus aureus and higher relapse rates in Wegener granulomatosis“ Ann Intern Med **120**(1): 12-7; PMID 8250451.
- Stone, J. H. (2003). „Limited versus severe Wegener's granulomatosis: baseline data on patients in the Wegener's granulomatosis etanercept trial“ Arthritis Rheum **48**(8): 2299-309; PMID 12905485.
- Stone, J. H., G. S. Hoffman et al. (2001). „A disease-specific activity index for Wegener's granulomatosis: modification of the Birmingham Vasculitis Activity Score. International Network for the Study of the Systemic Vasculitides (INSSYS)“ Arthritis Rheum **44**(4): 912-20; PMID 11318006.
- Strivens, R. L., A. Bateman et al. (2005). „Intestinal perforation and jejunal haemorrhage due to Wegener's granulomatosis“ Clin Exp Rheumatol **23**(1): 124; PMID 15789904.
- Stuckey, S. L. and P. J. Smart (1992). „Wegener's granulomatosis: parotid involvement and associated pancreatitis with C.T. findings“ Australas Radiol **36**(4): 343-6; PMID 1299199.

- Taekema-Roelvink, M. E., C. Van Kooten et al. (2000). „Proteinase 3 interacts with a 111-kD membrane molecule of human umbilical vein endothelial cells“ J Am Soc Nephrol **11**(4): 640-8; PMID 10752523.
- Taekema-Roelvink, M. E., C. van Kooten et al. (1998). „Effect of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies on proteinase 3-induced apoptosis of human endothelial cells“ Scand J Immunol **48**(1): 37-43; PMID 9714408.
- Tervaert, J. W., M. G. Huitema et al. (1990). „Prevention of relapses in Wegener's granulomatosis by treatment based on antineutrophil cytoplasmic antibody titre“ Lancet **336**(8717): 709-11; PMID 1975893.
- Tervaert, J. W., F. J. van der Woude et al. (1989). „Association between active Wegener's granulomatosis and anticytoplasmic antibodies“ Arch Intern Med **149**(11): 2461-5; PMID 2684074.
- Tidman, M., R. Olander et al. (1998). „Patients hospitalized because of small vessel vasculitides with renal involvement in the period 1975-95: organ involvement, anti-neutrophil cytoplasmic antibodies patterns, seasonal attack rates and fluctuation of annual frequencies“ J Intern Med **244**(2): 133-41; PMID 10095799.
- Trueb, R. M., M. Pericin et al. (1997). „Necrotizing granulomatosis of the breast“ Br J Dermatol **137**(5): 799-803; PMID 9415245.
- Tse, W. Y., G. B. Nash et al. (2005). „ANCA-induced neutrophil F-actin polymerization: implications for microvascular inflammation“ Kidney Int **67**(1): 130-9; PMID 15610236.
- Vallejo, A. N., M. Schirmer et al. (2000). „Clonality and longevity of CD4+CD28null T cells are associated with defects in apoptotic pathways“ J Immunol **165**(11): 6301-7; PMID 11086066.
- van der Geld, Y. M., M. G. Huitema 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; PMID 11122262.
- van der Woude, F. J. (1985). „Anticytoplasmic antibodies in Wegener's granulomatosis“ Lancet **2**(8445): 48; PMID 2861500.
- van der Woude, F. J., N. Rasmussen et al. (1985). „Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis“ Lancet **1**(8426): 425-9; PMID 2857806.
- van Rossum, A. P., M. G. Huitema et al. (2007). „Standardised assessment of membrane proteinase 3 expression. Analysis in ANCA-associated vasculitis and controls“ Ann Rheum Dis **66**(10): 1350-5; PMID 17446240.
- van Rossum, A. P., P. C. Limburg et al. (2003). „Membrane proteinase 3 expression on resting neutrophils as a pathogenic factor in PR3-ANCA-associated vasculitis“ Clin Exp Rheumatol **21**(6 Suppl 32): S64-8; PMID 14740429.
- von Vietinghoff, S., A. Busjahn et al. (2006). „Major histocompatibility complex HLA region largely explains the genetic variance exercised on neutrophil membrane proteinase 3 expression“ J Am Soc Nephrol **17**(11): 3185-91; PMID 17005932.

- von Vietinghoff, S., G. Tunnemann et al. (2007). „NB1 mediates surface expression of the ANCA antigen proteinase 3 on human neutrophils“ Blood **109**(10): 4487-93; PMID 17244676.
- Voswinkel, J., J. Kraemer, A. Mueller, et al. (2004). „B lymphocytes infiltrating Wegener's granuloma: the immunoglobulin VH gene repertoire from granulomatous tissues displays an antigen-driven maturation and suggests a microbial trigger.“ Arthritis Res. **6**: 24; PMID
- Walton, E. W. (1958). „Giant-cell granuloma of the respiratory tract (Wegener's granulomatosis)“ Br Med J **2**(5091): 265-70; PMID 13560836.
- Wegener (1936). „Ueber generalisierte septische Gefäßerkrankungen [About generalised septic vascular diseases]“ Verh Deut Pathol Ges **29**: 202-210; PMID
- Wegener (1939). „Über eine eigenartige rhinogene Granulomatose mit besonderer Beteiligung des Arteriensystems und der Nieren“ Beitr Pathol Anat Allg Pathol **102**: 36; PMID
- Weidner, S., S. Geuss et al. (2004). „ANCA-associated vasculitis with renal involvement: an outcome analysis“ Nephrol Dial Transplant **19**(6): 1403-11; PMID 15069175.
- Weidner, S., S. Hafezi-Rachti et al. (2006). „Thromboembolic events as a complication of antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis“ Arthritis Rheum **55**(1): 146-9; PMID 16463427.
- WGET (2005). „Etanercept plus standard therapy for Wegener's granulomatosis“ N Engl J Med **352**(4): 351-61; PMID 15673801.
- Wiesner, O., K. A. Russell et al. (2004). „Antineutrophil cytoplasmic antibodies reacting with human neutrophil elastase as a diagnostic marker for cocaine-induced midline destructive lesions but not autoimmune vasculitis“ Arthritis Rheum **50**(9): 2954-65; PMID 15457464.
- Wilde, C. G., J. L. Snable et al. (1990). „Characterization of two azurophilic granule proteases with active-site homology to neutrophil elastase“ J Biol Chem **265**(4): 2038-41; PMID 2404977.
- Winek, J., A. Mueller et al. (2004). „Frequency of proteinase 3 (PR3)-specific autoreactive T cells determined by cytokine flow cytometry in Wegener's granulomatosis“ J Autoimmun **22**(1): 79-85; PMID 14709416.
- Witko-Sarsat, V., P. Lesavre et al. (1999). „A large subset of neutrophils expressing membrane proteinase 3 is a risk factor for vasculitis and rheumatoid arthritis“ J Am Soc Nephrol **10**(6): 1224-33; PMID 10361860.
- Woywodt, A. and E. L. Matteson (2006). „Wegener's granulomatosis--probing the untold past of the man behind the eponym“ Rheumatology (Oxford) **45**(10): 1303-6; PMID 16887845.
- Woywodt, A., F. Streiber et al. (2003). „Circulating endothelial cells as markers for ANCA-associated small-vessel vasculitis“ Lancet **361**(9353): 206-10; PMID 12547543.
- Xiao, H., P. Heeringa et al. (2005). „The role of neutrophils in the induction of glomerulonephritis by anti-myeloperoxidase antibodies“ Am J Pathol **167**(1): 39-45; PMID 15972950.

- Xiao, H., A. Schreiber et al. (2007). „Alternative complement pathway in the pathogenesis of disease mediated by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies“ Am J Pathol **170**(1): 52-64; PMID 17200182.
- Yamaguchi, T., K. Yoshioka et al. (2007). „A case of Wegener's granulomatosis associated with progressive dysphagia owing to esophageal involvement“ Mod Rheumatol **17**(6): 521-5; PMID 18084709.
- Yamamoto, M., H. Takahashi et al. (2008). „Facial cutaneous and parotid gland involvement in Wegener's granulomatosis“ J Rheumatol **35**(2): 365-7; PMID 18260171.
- Yang, J. J., R. Kettritz et al. (1996). „Apoptosis of endothelial cells induced by the neutrophil serine proteases proteinase 3 and elastase“ Am J Pathol **149**(5): 1617-26; PMID 8909251.
- Yurasov, S., H. Wardemann et al. (2005). „Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus“ J Exp Med **201**(5): 703-11; PMID 15738055.
- Zhang, L., D. R. Jayne et al. (1995). „Distribution of MHC class II alleles in primary systemic vasculitis“ Kidney Int **47**(1): 294-8; PMID 7731160.

8 Abkürzungsverzeichnis

AKI	<i>acute kidney injury</i> , akutes Nierenversagen
ANCA	Anti-Neutrophile-Cytoplasmatische-Antikörper
c-ANCA	cytoplasmatische ANCA
p-ANCA	perinucleäre ANCA
BVAS	<i>Birmingham Vasculitis Activity Score</i>
CrP	C-reaktives Protein: Akute-Phase-Protein, welches von der Leber aufgrund starker Stimuli, wie z. B. bakterielle Infektionen mittels IL-6, gebildet wird
CSS	Churg-Strauss-Syndrom
cCyc	continuous Cyclophosphamid
pCyc	pulse Cyclophosphamid
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbant Assay</i> : semiquantitative Bestimmung von c-ANCA; hochgereinigtes PR3 wird auf Oberflächen gecoatet, Patientenserum mit c-ANCA verabreicht, c-ANCA binden an PR3, der Rest der Probe wird ausgewaschen, enzymmarkierter anti-human-PR3-Antikörper appliziert, Waschen; Chromogen-Substrat: Intensität der Farbreaktion mittels Photometer
ESRD	<i>endstage renal disease</i> , terminale Niereninsuffizienz
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
Fcy-Rezeptor	Rezeptor der Immunglobulinfamilie; Gamma steht für die Immunglobulinklasse, die gebunden wird, in diesem Falle IgG. FcγIIa = CD32, FcγRIIIb = CD16b,
HBSS ^{+/+}	Hanks Balanced Salt Solution mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺
IL-8	Interleukin-8
iIF	indirekte Immunfluoreszenz
MDRD	<i>Modification of Diet in Renal Disease</i>
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i>
mPA	Mikroskopische Polyangiitis
MPO	Myeloperoxidase
mPR3	membrangebundene Proteinase 3
NaCl	Natriumchlorid
nCGN	<i>pauci-immune necrotising and crescentic glomerulonephritis</i> , nekrotisierende extrakapillär-proliferative Glomerulonephritis
PR3	Proteinase 3
cPR3	<i>complementary PR3</i>
RIFLE	Einteilung des AKI: Risk, Injury, Failure, Loss, ESRD (Ricci / Cruz et al. 2008)
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> = Standardfehler ist definiert als die Wurzel aus der Varianz der Verteilung der Stichproben-Mittelwerte
TNFα	Tumornekrosefaktor-α
VDI	<i>Vasculitis Damage Index</i>
WG	Wegener'sche Granulomatose

9 Abbildungsverzeichnis

1.	Aktuelles Konsensus Prednisolonschema der EUVAS - (1995)	10
2.	Ein exogener Trigger (z. B. Staphylokokkus aureus) führt zur Schrankendysfunktion, PR3 wird von aktivierten Neutrophilen freigesetzt. Antigen-präsentierende Zellen wie dendritische Zellen werden aktiviert und induzieren eine T-Helferzellantwort. T-Zellen reagieren mit klonaler CD28 Vermehrung. T-Gedächtniszellen unterhalten die chronisch granulomatöse Entzündung und begünstigen eine ektope Formation von <i>lymphoid-like tissue</i> mit granulomatösen Läsionen. Es kommt zur PR3-ANCA Bildung durch autoreaktive Plasmazellen. Die Vaskulitis ist geboren. B: B-Zelle, Plasmazelle; DC: dendritische Zelle; PMN: Neutrophile, TEM: T-Gedächtniszelle (Lamprecht / Csernok et al. 2006) – reprinted by permission	16
3.	Komplementsystemaktivierung im Rahmen der Vaskulitis (Xiao / Schreiber et al. 2007) – reprinted by permission	17
4.	Links sieht man den Pathomechanismus der ANCA vermittelten Vaskulitis. Im Gefäßlumen sind geprierte neutrophile Granulozyten und deren Interaktion mit ANCA dargestellt. Rechts ist das resultierende Granulom mit zahlreichen unterschiedlichen Zellen gezeigt (Bacon 2005) – reprinted by permission	20
5.	Die Abbildung zeigt ein Bildschirmfoto des <i>BVAS-Scores</i> unserer Vaskulitisdatenbank. Die Auswahl wird per Mausklick getroffen. Der endgültige Punktestand wird nach dem Anklicken von <i>Data complete</i> errechnet und erst dann in der Datenbank erfasst.	26
6.	Die Abbildung zeigt ein Bildschirmfoto des <i>VDI-Scores</i> unserer Vaskulitisdatenbank. Die Auswahl wird mittels eines Mausklicks getroffen. Der endgültige Punktestand wird nach dem Anklicken von <i>Data complete</i> errechnet und erst dann in der Datenbank erfasst.	27
7.	Bildschirmfoto des <i>Body Mass Index (BMI)</i> und Körperoberfläche (KO) als Beispiel der automatisch berechneten Werte	28
8.	Schematische Darstellung der RIFLE-Kriterien, separat für Serumkreatinin und / oder Urinmenge (Ricci / Cruz et al. 2008) – reprinted by permission	29
9.	Anteil der WG-Patienten an der Gesamtkohorte	35
10.	Das FACS-Bild zeigt ein bimodales mPR3-Expressionsmuster von einem repräsentativen Patienten mit einer mPR3-Expression von 56 %. Auf der Ordinate (y-Achse) wird linear die Zellzahl dargestellt und auf der Abszisse (x-Achse) logarhythmisch die Fluoreszenzintensität. Die gestrichelte, graue Linie stellt eine Negativ-Kontrolle dar. Die schwarze Linie repräsentiert die Patientendaten. Man sieht zwei Peaks, wobei der linke bei 10^1 die mPR3 ^{low} und der rechte bei 10^2 die mPR3 ^{high} exprimierende Neutrophilen Subpopulation widerspiegelt.	37
11.	Darstellung der mPR3 Expression aller Doppelbestimmungen (n = 31, 16 WG-Patienten und 15 Kontrollen; R ² 0,82)	38

-
- | | | |
|-----|---|----|
| 12. | FACS-Bild: Auf der Ordinate (y-Achse) wird linear die Zellzahl (counts) dargestellt und auf der Abszisse (x-Achse) logarithmisch die Fluoreszenzintensität der gezählten Zellen. Die gestrichelte graue Linie stellt die Negativ-Kontrolle dar. Die schwarze und die blaue Linie zeigen eine bimodale mPR3-Expression. Das Augenmerk liegt auf der blauen Linie, die den gleichen Patienten (dicke schwarze Linie: inaktiv) nach TNF α -Priming (blaue Linie) darstellt. Man sieht deutlich, wie nur die Fluoreszenzintensität der rechten Population (mPR3 ^{high}) zunimmt. | 39 |
| 13. | mPR3-Expression der WG- und der Kontrollkohorte angegeben in Prozent (Ordinate), Anzahl der Personen in Prozent der jeweiligen Gesamtkohorte (Abszisse) | 40 |
| 14. | Abszisse zeigt VDI nach einem Jahr. Die linke Ordinate steht für die weißen Säulen und gibt die Anzahl der Patienten an. Die rechte Ordinate steht für die schwarzen Säulen und gibt die mittlere mPR3-Expression in der jeweiligen Gruppe wieder. | 42 |
| 15. | Mittlere rezidivfreie Zeit (Punkt 1: Zeit in Monaten von der Erstdiagnose bis zum ersten Rezidiv, 2: vom ersten bis zum zweiten Rezidiv etc.) | 45 |
| 16. | Erreichen des ersten Rezidivs aller 53 Rezidivpatienten der Gesamtkohorte in zeitlicher Abfolge | 46 |
| 17. | Darstellung des rezidivfreien Überlebens der 53 Rezidivpatienten sowie der zensierten Fälle bis zum Erreichen des ersten Rezidivs unterteilt in die zwei Gruppen mPR3-Expression kleiner bzw. größer oder gleich 70 % | 48 |
| 18. | Organbeteiligung zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (n = 100) mit der jeweiligen mPR3-Expression | 49 |
| 19. | Anzahl der Organbeteiligungen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose; Die linke Ordinate steht für die weißen Säulen und gibt die Anzahl der Patienten an. Die rechte Ordinate steht für die schwarzen Säulen und gibt die mittlere mPR3-Expression in der jeweiligen Gruppe wieder. | 50 |
| 20. | Organbeteiligung zum Zeitpunkt des 1. Rezidivs (n = 53) mit der jeweiligen mPR3-Expression | 51 |
| 21. | Organbeteiligung zum Zeitpunkt des zweiten Rezidivs (n = 35) mit dem Durchschnitt der jeweiligen mPR3-Expression | 52 |
| 22. | Organbeteiligung zum Zeitpunkt des dritten Rezidivs (n = 19) mit dem Durchschnitt der jeweiligen mPR3-Expression | 53 |
| 23. | Organbeteiligung zum Zeitpunkt des vierten Rezidivs (n = 14) mit dem Durchschnitt der jeweiligen mPR3-Expression | 54 |
| 24. | Die Nierenfunktionsveränderungen wurden gemäß der RIFLE-Kriterien zum Zeitpunkt der Erstdiagnose gruppiert (nicht ausgefüllte Balken). Die ausgefüllten Balken stehen für die durchschnittliche mPR3-Expression der entsprechenden Gruppe. | 56 |

25.	Darstellung des Kreatininverlaufes über sechs Jahre gruppiert in unter 70 % und über 70 % mPR3-Expression (Mann-Whitney-U signifikant für Erstdiagnose [ED], zweites und sechstes Jahr mit $p < 0,05$)	58
26.	Darstellung aller extrakapillären Glomerulonephritiden (Erstdiagnose 50 plus vier im Verlauf)	60
27.	mPR3-Expression von gesunden Kontrollen und unserer WG-Kohorte unter Hinzunahme von 20 mPA Patienten	66

10 Anhang

Publikationsübersicht

1: Müller D, Mehling H, Otto B, Bergmann-Lips R, Luft F, Jordan J, Kettritz R.

Niacin lowers serum phosphate and increases HDL cholesterol in dialysis patients.

Clin J Am Soc Nephrol. 2007 Nov;2(6):1249-54. Epub 2007 Oct 3. PMID: 17913971

BACKGROUND AND OBJECTIVES: Adverse effects complicate the use of drugs that are prescribed for phosphate control in dialysis patients. Alternative treatment options are needed. DESIGN, SETTING, PARTICIPANTS, & MEASUREMENTS: Nicotinic acid inhibits intestinal phosphate reabsorption and increases HDL cholesterol. This study tested the phosphate-lowering and HDL-increasing effect of Niaspan (prolonged-release nicotinic acid) in patients who were undergoing dialysis. Efficacy, safety, and tolerability of Niaspan were prospectively studied. Twenty dialysis patients, who were receiving a stable dosage of a calcium salt-containing drug for phosphate control, received after a 2-wk washout period Niaspan for 12 wk. Patients were started on 375 mg/d, and the dosage was increased every 2 wk to achieve 500, 1000, 1500, and 2000 mg/d, respectively. Clinical and laboratory parameters were prospectively recorded in patients who tolerated a target dosage of $>$ or $=$ 1000 mg/d. RESULTS: Seventeen patients tolerated $>$ or $=$ 1000 mg/d Niaspan (mean dosage 1470 \pm 110 mg/d). Niaspan treatment for 12 wk decreased serum phosphate values from 7.2 \pm 0.5 to 5.9 \pm 0.6 mg/dl ($P < 0.015$). In contrast, Niaspan did not affect serum calcium levels. A significant increase in HDL cholesterol from 40 \pm 3.2 to 59 \pm 5.5 mg/dl (34%) was also observed with Niaspan ($P = 0.0005$). CONCLUSIONS: Niaspan effectively lowered serum phosphate levels and significantly increased HDL cholesterol. Niaspan may provide an alternative or adjunctive treatment option in dialysis patients.

2: Goebel U, Schneider W, Otto B, Natusch A, Luft F, Kettritz R

Uncommon Manifestations of a Peculiar Disease

Poster, 13th International Vasculitis & ANCA Workshop, Cancun, Mexico, April 26-29th, 2007

3: von Vietinghoff S, Busjahn A, Schönemann C, Massenkeil G, Otto B, Luft FC, Kettritz R.

Major histocompatibility complex HLA region largely explains the genetic variance exercised on neutrophil membrane proteinase 3 expression.

J Am Soc Nephrol. 2006 Nov;17(11):3185-91. Epub 2006 Sep 27. PMID: 17005932

ANCA-associated vasculitides, a common cause of rapidly progressive glomerulonephritis, are influenced by genetic variance. Neutrophil membrane expression of the ANCA antigen proteinase 3 (PR3) is pathogenically important. A subset of membrane PR3-positive neutrophils can be distinguished from a membrane-negative subset in any given subject. The percentage of membrane PR3-positive neutrophils is genetically determined. In this study, 17 pairs of HLA-matched siblings were typed for their percentage of membrane PR3-positive neutrophils. The HLA-matched siblings showed a high concordance ($r = 0.67$, $P < 0.05$), similar to that seen in monozygotic twins. For testing of whether the HLA system influences membrane PR3 percentage, membrane PR3 typing and HLA typing of 51 unrelated patients with Wegener's granulomatosis and 49 normal control subjects was performed. Using two independent statistical methods, a group of 34 HLA antigens was found to predict a large fraction of the membrane PR3 phenotype in patients and control subjects. Certain major histocompatibility HLA antigens have been implicated to conflicting degrees in ANCA-associated vasculitides. However, in earlier studies, the contribution of the HLA system to the genetic variance of the disease was unclear. In this cohort, found was an association of Wegener's

granulomatosis with the same group of HLA antigens that predicted for membrane PR3 percentage and a similar correlation with clinical parameters at initial presentation. The disease status in 80% of the patients and 82% of the control subjects could be predicted correctly on the basis of HLA typing by discriminate function analysis ($P < 0.001$). After removal of the predicted individual from the sample, this association remained significant (64 and 63% correct prediction; $P < 0.001$). The data suggest that a complex interaction of the entire HLA system is responsible for the genetic influence on membrane PR3 percentage and Wegener's granulomatosis.

4: von Vietinghoff S, Schreiber A, Otto B, Choi M, Göbel U, Kettritz R.

Membrane proteinase 3 and Wegener's granulomatosis.

Clin Nephrol. 2005 Dec;64(6):453-9. Review. PMID: 16370159

Proteinase 3 (PR3) is found in neutrophil and monocyte lysosomal granules. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) with specificity for PR3 are characteristic for patients with Wegener's granulomatosis. The interaction of ANCA with neutrophilic ANCA antigens is necessary for the development of ANCA-associated diseases. ANCA bind to membrane-expressed PR3 and induce full-blown activation in primed neutrophils. We discuss two different aspects of membrane PR3 (mPR3). The first aspect is the amount of PR3 and mechanisms controlling this issue. The second aspect is the presence of two neutrophil subsets that differ in the mPR3 expression phenotype.

5: Schreiber A, Otto B, Ju X, Zenke M, Goebel U, Luft FC, Kettritz R.

Membrane proteinase 3 expression in patients with Wegener's granulomatosis and in human hematopoietic stem cell-derived neutrophils.

J Am Soc Nephrol. 2005 Jul;16(7):2216-24. Epub 2005 May 18. PMID: 15901769

A large membrane proteinase 3 (mPR3)-positive neutrophil subset (mPR3^{high}) is a risk for Wegener's granulomatosis (WG). The relationship between mPR3 expression and clinical manifestations was investigated in 81 WG patients and mPR3 expression was studied in CD34⁺ stem cell-derived human neutrophils. The mPR3^{high} neutrophil percentage correlated with renal function, anemia, and albumin at the time of presentation. The mPR3^{high} neutrophil percentage and renal failure severity correlated directly after 5 yr. For elucidating mechanisms that govern mPR3 expression, studies were conducted to determine whether the genetic information that governs mPR3 expression resides within the neutrophils, even without stimuli possibly related to disease. CD34⁺ hematopoietic stem cells were differentiated to neutrophils, and their mPR3 expression was determined. A two-step amplification/differentiation protocol was used to differentiate human CD34⁺ hematopoietic stem cells into neutrophils with G-CSF. The cells progressively expressed the neutrophil surface markers CD66b, CD35, and CD11b. The ferricytochrome C assay demonstrated a strong respiratory burst at day 14 in response to PMA but none at day 0. Intracellular PR3 was detectable from day 4 by Western blotting. An increasing percentage of a mPR3-positive neutrophil subset became detectable by flow cytometry, whereas a second subset remained negative, consistent with a bimodal expression. Finally, human PR3-anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induced a stronger respiratory burst, compared with human control IgG in stem cell-derived neutrophils. Taken together, these studies underscore the clinical importance of the WG mPR3 phenotype. The surface mPR3 on resting cells is probably genetically determined rather than being dictated by external factors.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken.

Ich bedanke mich sehr bei Prof. Dr. FC Luft, an dessen Klinik ich diese Doktorarbeit durchführen durfte.

In Bezug auf die Einführung in die wissenschaftliche Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. med. Ralph Kettritz für seine ausführlichen Darlegungen, Fehleranalysen und ganz besonders, seiner Geduld. In diesem Rahmen möchte ich mich ebenfalls bei meinem richtungweisenden Freund und Kollegen, Dr. med. Adrian Schreiber, herzlich bedanken.

Ein ganz besonders großer Dank geht an Susanne Rolle, die mir immer moralischen Beistand geleistet hat und mich in so manch schwerer Stunde vor dem Aufgeben bewahrt hat. Sie war es, die bis zuletzt meine Labortechniken geduldig zu verfeinern versuchte.

Ein Dank auch an alle freiwilligen Blutspender, ohne die diese Arbeit nie hätte zu Stande kommen können.

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich, Björn Otto, dass die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Thema: „**Klinische Relevanz der Membran-PR3 Expression von neutrophilen Granulozyten**“ von mir selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Björn Otto