

Aus dem ECRC und der Klinik für Nephrologie und Intensivmedizin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Charakterisierung des myeloiden Compartments in  
Patienten\*innen mit ANCA-assoziierten Erkrankungen mittels  
CyTOF

Characterization of the myeloid compartment in patients with  
ANCA-associated diseases using CyTOF

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Eugenia Frank

aus Sokuluk

Datum der Promotion: 25.11.2022

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>5</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>7</b>
<b>Abkürzungen</b> .....	<b>8</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>10</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>11</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>13</b>
1.1 Immunologische Autoaggression: ANCA assoziierte Vaskulitis .....	13
1.1.1 Das Immunsystem und das Dilemma von Selbst und Fremd .....	13
1.1.2 ANCA und ANCA-assoziierte Vaskulitiden .....	16
1.2 Myeloides Compartment .....	18
1.2.1 Die Rolle der Neutrophilen und Monozyten .....	18
1.2.2 Aktivierung der Neutrophilen durch ANCA in vitro .....	20
1.3 Die Bedeutung des humoralen Bestandteils der Immunantwort und der Fc-Rezeptoren in der AAV ...	21
1.3.1 Die Rolle der Komplement-Faktoren .....	21
1.3.2 Die Rolle der Fc-Rezeptoren .....	24
1.4 Die Bedeutung von CD177 und der Integrine in der AAV .....	25
1.4.1 Expression von PR3 durch CD177 .....	25
1.4.2 Die Rolle der Integrine .....	26
1.5 Der Weg nach innen: intrazelluläre Marker .....	26
1.5.1 Die Rolle von TNF $\alpha$ , p38-MAPK und Akt .....	26
1.5.2 Die Rolle von IL-1 $\beta$ .....	28
1.5.3 Die Rolle von TH17-Zellen und IL-17 .....	29
1.6 Resümee und Fragestellung .....	30
1.6.1 Resümee .....	30
1.6.2 Fragestellung .....	30
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>32</b>
2.1 Material .....	32
2.1.1 Patientenkollektiv .....	32

2.1.2 Blutentnahme.....	33
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien.....	33
2.1.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	33
2.1.5 Puffer.....	34
2.1.6 Antikörper.....	35
2.2 Methoden.....	36
2.2.1 Präparation der Zellen und Live-Dead-Färbung.....	36
2.2.2 Erster Fc-Block.....	37
2.2.3 Oberflächenfärbung und Fixierung.....	37
2.2.4 Zweiter Fc-Block und Etablierung der intrazellulären Färbung.....	37
2.2.5 DNA-Färbung und Vorbereitung zur Messung.....	38
2.2.6 CyTOF-Messung und Normierung der Daten.....	39
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>40</b>
3.1. Etablierung der Methode.....	40
3.1.1 Basic Troubleshoot: Kontrolle der Fixierung und Permeabilisierung.....	40
3.1.2 Troubleshoot 1: Vergleich unterschiedlicher Fixierungs- und Permeabilisierungsmethoden.....	48
3.1.3 Troubleshoot 2: Kontrolle des Einflusses der Fixierungsdauer.....	55
3.1.4 Troubleshoot 3: Kontrolle des Original-DVS-Protokolls inklusive FixandPerm®.....	61
3.1.5 Troubleshoot 4: Vergleich DVS-Protokoll und Saponin-Methode.....	65
3.1.6 Troubleshoot 5: Kontrolle der Spezifität der intrazellulären Bindung.....	68
3.1.7 Troubleshoot 6: Der zweite Fc-Block und Vergleich der Methoden.....	73
3.1.8 Zusammenfassung der Ergebnisse des Etablierungsprozesses.....	76
3.2. Analyse der Oberflächen- und intrazellulären Marker in Patient*innen mit AAV.....	78
3.2.1 Analyse der Integrine und CD177.....	78
3.2.2 Analyse der Komplement-Rezeptoren.....	84
3.2.3 Analyse der Fc-Rezeptoren.....	88
3.2.4 Analyse der Marker MHCII und HLA-DR.....	93
3.2.5 Analyse der intrazellulären Marker.....	96
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>102</b>
4.1 Methodendiskussion.....	102
4.2 Ergebnisdiskussion.....	104

4.2.1 Integrine und CD177 .....	104
4.2.2. Komplement-Rezeptoren.....	106
4.2.3 Fc-Rezeptoren .....	108
4.2.4 MHCII und HLA-DR .....	110
4.2.5 Intrazelluläre Marker .....	111
4.2.6 Fazit und Ausblick.....	113
<b>5. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>116</b>
<b>6. Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>128</b>
<b>7. Lebenslauf.....</b>	<b>130</b>
<b>8. Danksagung.....</b>	<b>132</b>
<b>9. Bescheinigung des Statistikers .....</b>	<b>133</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 <i>Das angeborene und adaptive Immunsystem</i> .....	14
Abb. 2 <i>Schema eines IgG-Moleküls</i> .....	15
Abb. 3 <i>Aktivierung des Komplementsystems</i> .....	22
Abb. 4 <i>Analyse mittels Durchflusszytometrie (FACS) am MACSQUANT</i> .....	40
Abb. 5 <i>Analyse mittels CyTOF</i> .....	41
Abb. 6 <i>Analyse mittels CyTOF der Marker CD88, C5L2, CD11a, MHCII, CD177, CD35, CD18 und CD32 auf CD45+-Zellen</i> .....	42
Abb. 7 <i>Granulozyten-Differenzierung</i> .....	44
Abb. 8 <i>Monozyten-Differenzierung</i> .....	45
Abb. 9 <i>Marker CD88, C5L2, CD11a, MHCII, CD177, CD35, CD18 und CD32 auf CD45+-Zellen</i> .....	46
Abb. 10 <i>Darstellung von TNF<math>\alpha</math> in CD45+-Zellen</i> .....	47
Abb. 11 <i>Vergleich zwischen PFA 4% und Fix1<sup>®</sup> anhand der Kontroll-Oberflächenfärbungen</i> .....	49
Abb. 12 <i>Vergleich der Permeabilisierung mit Saponin 0,3% (S1) und Saponin 0,1% (S2)</i> .....	51
Abb. 13 <i>Vergleich der Permeabilisierung mit PermS<sup>®</sup> (S3) und PermS<sup>®</sup> 1:3 verdünnt (S4)</i> .....	53
Abb. 14 <i>Kontrolle des Einflusses der Fixierung über Nacht auf die Permeabilisierung mit Saponin 0,3% und PermS<sup>®</sup></i> .....	56
Abb. 15 <i>Zusätzliche Darstellung der Kontrolle der Fixierung über Nacht</i> .....	58
Abb. 16 <i>Analyse der intrazellulären Marker auf CD 45+-Zellen bei unterschiedlicher Fixierungsdauer</i> .....	60
Abb. 17 <i>Vergleiche des Original-DVS-Protokolls mit den alterierten Protokollen</i> .....	63
Abb. 18 <i>Vergleich DVS-Protokoll und Saponin-Methode</i> .....	65
Abb. 19 <i>Zusätzliche Darstellung der Oberflächenmarker auf den CD66b+ Zellen im Vergleich DVS-Protokoll und Saponin-Methode</i> .....	66
Abb. 20 <i>Intrazelluläre Marker auf CD45+ Zellen im Vergleich DVS-Protokoll und Saponin-Methode</i> .....	67
Abb. 21 <i>Kontrolle der Spezifität der intrazellulären Marker</i> .....	70
Abb. 22 <i>Vergleich verschiedener Antikörper-Metall-Konjugate</i> .....	72
Abb. 23 <i>Kontrolle des Original-DVS-Protokolls und der modifizierten Saponin-Methode</i> .....	74
Abb. 24 <i>Spezifitätskontrolle der intrazellulären Marker nach dem zweiten Fc-Block</i> .....	75
Abb. 25 <i>Gatingstrategie</i> .....	77
Abb. 26 <i>Boxplot CD11a auf der Oberfläche von PMN</i> .....	79
Abb. 27 <i>Boxplot CD11b auf der Oberfläche von PMN</i> .....	79
Abb. 28 <i>Boxplot CD11c auf der Oberfläche von PMN</i> .....	80

Abb. 29	Boxplot CD18 auf der Oberfläche von PMN .....	80
Abb. 30	Boxplot CD11a auf der Oberfläche von PBMC .....	81
Abb. 31	Boxplot CD11b auf der Oberfläche von PBMC .....	82
Abb. 32	Boxplot CD11c auf der Oberfläche von PBMC .....	82
Abb. 33	Boxplot CD18 auf der Oberfläche von PBMC .....	83
Abb. 34	Boxplot CD177 auf der Oberfläche von PMN .....	83
Abb. 35	Boxplot CD88 auf der Oberfläche von PMN .....	84
Abb. 36	Boxplot C5L2 auf der Oberfläche von PMN .....	85
Abb. 37	Boxplot CD35 auf der Oberfläche von PMN .....	86
Abb. 38	Boxplot CD88 auf der Oberfläche von PBMC .....	87
Abb. 39	Boxplot C5L2 auf der Oberfläche von PBMC .....	87
Abb. 40	Boxplot CD35 auf der Oberfläche von PBMC .....	88
Abb. 41	Boxplot CD64 auf der Oberfläche von PMN .....	89
Abb. 42	Boxplot CD32 auf der Oberfläche von PMN .....	90
Abb. 43	Boxplot CD16 auf der Oberfläche von PMN .....	90
Abb. 44	Boxplot CD16 auf der Oberfläche von PBMC .....	91
Abb. 45	Boxplot CD32 auf der Oberfläche von PBMC .....	92
Abb. 46	Boxplot CD64 auf der Oberfläche von PBMC .....	92
Abb. 47	Boxplot MHCII auf der Oberfläche von PMN .....	93
Abb. 48	Boxplot HLA-DR auf der Oberfläche von PMN .....	94
Abb. 49	Boxplot MHCII auf der Oberfläche von PBMC .....	95
Abb. 50	Boxplot HLA-DR auf der Oberfläche von PBMC .....	95
Abb. 51	Boxplot TNF $\alpha$ auf der Oberfläche von PMN .....	96
Abb. 52	Boxplot IL1 $\beta$ auf der Oberfläche von PMN .....	96
Abb. 53	Boxplot p38P auf der Oberfläche von PMN .....	97
Abb. 54	Boxplot AktP auf der Oberfläche von PMN .....	97
Abb. 55	Boxplot IL17A auf der Oberfläche von PMN .....	98
Abb. 56	Boxplot IL17F auf der Oberfläche von PMN .....	98
Abb. 57	Boxplot TNF $\alpha$ auf der Oberfläche von PBMC .....	99
Abb. 58	Boxplot IL1 $\beta$ auf der Oberfläche von PBMC .....	100
Abb. 59	Boxplot p38P auf der Oberfläche von PBMC .....	100
Abb. 60	Boxplot AktP auf der Oberfläche von PBMC .....	101
Abb. 61	Boxplot IL17A auf der Oberfläche von PBMC .....	101
Abb. 62	Boxplot IL17F auf der Oberfläche von PBMC .....	102

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: <i>Verwendete Chemikalien und Reagenzien</i> .....	33
Tab. 2: <i>Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien</i> .....	33
Tab. 3: <i>Verwendete Puffer</i> .....	34
Tab. 4: <i>Verwendete Antikörper-Metall-Konjugate</i> .....	35
Tab. 5: <i>Versuchsaufbau zur Prüfung der Spezifität der intrazellulären Marker</i> .....	68

## Abkürzungen

AAV	ANCA-assoziierte Vaskulitis
Abb	Abbildung
ANCA	Antineutrophile cytoplasmatische Antikörper
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Cluster of differentiation
CyTOF	Cytometry by time of flight
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPPI	Dipeptidyl-Peptidase
DRFZ	Deutsches Rheumaforschungszentrum
EGPA	Eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis
GPA	Granulomatose mit Polyangiitis
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GWAS	genome-wide-association study
HD	healthy donor
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MPA	Mikroskopische Polyangiitis
MPO	Myeloperoxidase
NCGN	necrotizing and crescentic glomerulonephritis
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen



NSP	neutrophile Serinproteasen
P38-MAPK	p38 mitogen-activated proteinkinase
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate-buffered saline
PDK	phosphoinositide dependent proteinkinase
PFA	Paraformaldehyd
PI3-Kinase	phosphoinositide-3-kinase
PIP2/ PIP3	Phosphatidylinositol-3,4-Diphosphat/ Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat
PMN	polymorphnuclear cells
PR3	Proteinase 3
SPADE	Spanning-tree Progression Analysis of Density-normalized Events
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
WT	Wildtyp

## Zusammenfassung

Mikroskopische Polyangiitis (MPA), Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) und Eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis (EGPA) sowie die renal limitierte NCGN gehören zu den Multisystem-Vaskulitiden mit Hauptlokalisierung in den kleinen Gefäßen. Antineutrophile cytoplasmatische Autoantikörper (ANCA) sind gerichtet gegen MPO oder PR3 der polymorphkerniger neutrophilen Granulozyten (PMN) und spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese. Die Interaktion zwischen ANCA und Neutrophilen resultiert in einer endothelialen Schädigung und Zerstörung der Gefäßwände. Obwohl ANCA als pathogenetisch angenommen werden, fließen in den Prozess bis zur Destruktion der Gefäßwände viele unterschiedliche Faktoren mit ein, welche die Aktivierung der Effektorzellen initiieren, amplifizieren, aufrechterhalten und letztendlich in die Endphase und das Vollbild einer Entzündungsreaktion münden. Solche Faktoren finden sich im Bereich des Komplementsystems, der Integrine, der Fc-Rezeptoren, der MHCII-Moleküle und diverser intrazellulärer Proteine. In dieser Arbeit wurde ein Protokoll konzipiert zur Prüfung der Existenz einer AAV prädisponierenden Subpopulation der neutrophilen Granulozyten und Monozyten.

In einer CyTOF-basierten Multiparameteranalyse wurden 20 Oberflächen- und 6 intrazelluläre Marker aufgenommen. Ausgewählt wurden Antikörper gegen Oberflächenmoleküle aus der Klasse der Integrine, der Komplement-Rezeptoren, der Fc-Rezeptoren sowie Antikörper gegen MHCII, HLA-DR und intrazelluläre Proteine als Repräsentanten der inneren Signalkaskaden. Betrachtet wurden Zellen aus dem Vollblut von aktiven AAV-Patienten\*innen (n=8) und Patienten\*innen in Remission (n=12) im Vergleich mit gesunden Probanden\*innen (n=8).

Ein stabiles Muster der einzelnen Marker im Kollektiv der Erkrankten ließ sich nicht erkennen und somit die Hypothese einer prädisponierenden Subpopulation nicht bestätigen. Im Vergleich der drei Gruppen traten einige Marker durch signifikante Unterschiede der MFI besonders hervor. CD88 auf der Oberfläche der PMN und Monozyten war im Vergleich zwischen aktiven Patienten\*innen und solchen in Remission signifikant höher im akuten Krankheitsstadium. Ähnliche Resultate fanden sich auch für C5L2 und IL-17A allerdings nur für Monozyten. Bei der Betrachtung der PMN zeigte CD64 im akuten Stadium der AAV höhere MFI-Werte als in Remission und in gesunden Kontrollen. Auf

Seiten der Monozyten fielen eine Abnahme von MHCII und HLA-DR und eine Hochregulation von CD16 in der akuten Krankheitsphase verglichen sowohl mit den sich in Remission befindlichen Patient\*innen als auch den gesunden Kontrollen auf.

Die Ergebnisse lassen zwar nicht auf die Existenz einer AAV prädisponierenden Subpopulation schließen, jedoch geben sie Hinweise auf eine Gewichtung einiger Marker und eine Phänotypänderung der Effektorzellen während des akuten Krankheitsstadiums.

Weitere Studien mit größeren Fallzahlen und zudem einer detaillierteren SPADE-Analyse (Algorithmus zur Clusterbildung, Darstellung der Beziehung der Cluster über ein Dendrogramm) sind für die Zukunft zu empfehlen.

## **Abstract**

Microscopic polyangiitis (MPA), granulomatosis with polyangiitis (GPA) and eosinophilic granulomatosis with Polyangiitis as well as renal limited NCGN are multisystem vasculitides with their main localization in smaller vessels. Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) are directed against MPO or PR3 of polymorphonuclear granulocytes (PMN) and play a critical role in the pathogenesis of vasculitis. The interaction of ANCA with neutrophils leads to endothelial damage and the destruction of the vessels. Even though ANCA are assumed to be pathogenetic, many aspects factor into the process leading to vascular destruction. They initiate, amplify and maintain the activation of effector cells and eventually lead to the final phase of the inflammatory reaction. Such factors are found in the complement system, the integrins, fc receptors, MHCII molecules and various intracellular proteins. In this thesis, a protocol was developed to test for an AAV predisposed subpopulation in neutrophilic granulocytes and monocytes.

20 surface and 6 intracellular markers were included in a CyTOF-based multiparameter analysis. Antibodies against surface molecules from the class of integrins (CD11a, CD11b, CD11c, CD18), complement receptors (CD35, CD88, C5L2), Fc receptors (CD16, CD32, CD64) as well as antibodies against MHCII, HLA-DR and intracellular proteins as representatives of the internal signal cascades

(TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , AktP, p38-MAPK, IL-17A and IL-17F) were chosen. Cells from the blood of active AAV patients (n=8) and patients in remission (n=12) were compared to healthy donors (n=8).

No stable pattern of the individual markers could be identified in the group of patients and the hypothesis of a predisposing subpopulation could therefore not be confirmed. In the comparison of the three groups, some markers stood out due to significant differences in MFI. CD88 on the surface of PMN and monocytes was significantly higher in the acute stage of the disease in comparison between active patients and those in remission. Similar results were also found for C5L2 and IL-17A, but only for monocytes. When looking at PMN, CD64 showed higher MFI values in the acute stage of AAV than in remission and in healthy controls. On the monocyte side, there was a decrease in MHCII and HLA-DR and an up-regulation of CD16 in the acute phase compared to both convalescent patients and healthy controls.

While the results do not suggest the existence of an AAV predisposing subpopulation, they do provide evidence for weighting of some markers and phenotype change of effector cells during the acute stage of the disease.

Further studies with the investigation of larger numbers of cases and a more detailed SPADE analysis (clustering algorithm, displays the relatedness of clusters via a dendrogram) are recommended for the future.

# 1. Einleitung

## 1.1 Immunologische Autoaggression: ANCA assoziierte Vaskulitis

### 1.1.1 Das Immunsystem und das Dilemma von Selbst und Fremd






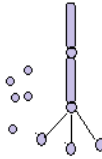


Den Kampf gegen Krankheitserreger als Bedrohung von außen obliegt bei Wirbeltieren dem Immunsystem. Aufgebaut aus einem angeborenen und erworbenen/ adaptiven Teil ist es mit dem Schutz unseres Körpers betraut. Die vorderste Front der angeborenen Abwehr bilden u.a. die Haut mit ihrem Säureschutzmantel und die Schleimhäute des Respirations- und Verdauungstraktes. Aber auch das Komplementsystem als humoraler und die Monozyten/ Makrophagen, NK-Zellen sowie Granulozyten als zellulärer Part verteidigen den Organismus als Einheiten der angeborenen Abwehr (1).

Die Komponenten des angeborenen Systems sind genetisch determiniert, von Geburt an wirkend und permanent präsent. Es agiert über die Erkennung der für mikrobielle Organismen typischen Oberflächenmoleküle. Hat es diese erkannt, leitet es eine Reaktionskaskade ein, die mit der Zerstörung bzw. Phagozytose des Erregers endet (1, 2). Dieses System kommt ohne „spezifische“ Komponenten aus, bedarf keiner Lernphase und wirkt daher unmittelbar.

Das adaptive Immunsystem umfasst bestimmte T- und B-Lymphozyten und sich davon entwickelnde Zellen. Zytotoxische  $CD8^+$  T-Zellen erkennen virus-infizierte oder entartete körpereigene Zellen und töten diese ab, während  $CD4^+$  T-Helferzellen B-Zellen oder Monozyten/ Makrophagen aktivieren. B-Zellen und die sich daraus entwickelnden Plasmazellen produzieren Antikörper. Dieses spezifische System benötigt mehr Zeit, ist dafür aber in der Lage, ein sogenanntes „Immungedächtnis“ zu generieren. Nach einer abgelaufenen spezifischen Immunantwort bleibt eine längerfristige Immunität in Form von antigenspezifischen langlebigen B- und T-Zellen (sog. Gedächtniszellen) erhalten (1, 2).

Den Grundstein der adaptiven Immunantwort bildet ein System aus vielen Gensegmenten, die in jedem einzelnen Lymphozyten unterschiedlich zusammengesetzt werden können. Der Vorgang heißt alternatives Spleißen und ermöglicht das Kodieren eines vielfältigen Repertoires verschiedener Proteine. Das Immunsystem des Menschen ist in der Lage, ca.  $10^{11}$  unterschiedliche Antikörper zu bilden, in entscheidenden Situationen den einen unter Milliarden zu finden und in großen Mengen zu

produzieren. Somit wird es in seiner Komplexität nur vom Gehirn übertroffen (1). Abb. 1 zeigt eine Übersicht des angeborenen und adaptiven Teils des Immunsystems.

	Zelluläre Komponente	Humorale Komponente
<b>Angeborenes Immunsystem (unspezifisch)</b>	Granulozyten Monozyten  Makrophagen NK-Zellen Mastzellen Dendritische Zellen    	Komplementsystem 
<b>Adaptives Immunsystem (spezifisch)</b>	T-Lymphozyten 	Antikörper (produziert durch Plasmazellen) 

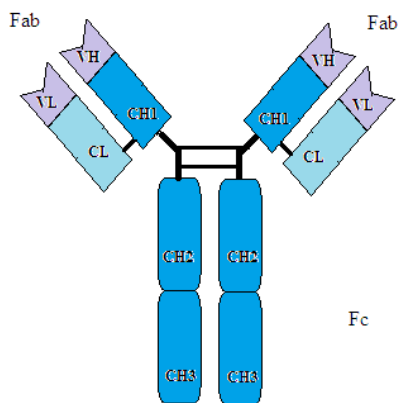
**Abb. 1** Das angeborene und adaptive Immunsystem

Antikörper bilden somit eine wichtige Säule des adaptiven Immunsystems. Sie sind von Plasmazellen sezernierte globuläre Proteine, die sich aus langen H-Ketten (heavy chains) und kurzen L-Ketten (light chains) zusammensetzen. Dabei verbinden Disulfidbrücken mindestens zwei identische H- und zwei

identische L-Ketten in einem Antikörpermolekül. Die H-Ketten entscheiden über die Zugehörigkeit zu einer der 5 Antikörperklassen/ Isotypen: IgA, IgM, IgG, IgD, IgE (1).

IgG, IgD und IgE liegen als Monomere vor, IgA als Dimere und IgM als Pentamere (1).

Mit 75% stellen IgG den Hauptanteil dar. Strukturanalytisch ähneln sie in ihrer räumlichen Struktur dem Buchstaben Y. Abb. 2 zeigt die schematische Darstellung eines IgG-Moleküls. Der obere Fab-Teil (N-terminales Ende der Polypeptidketten) entspricht dem variablen Teil und birgt die Antigenbindestelle. Der Fc-Teil ist vergleichsweise konstant und kann über Fc-Rezeptoren z.B. auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten gebunden werden (1).



**Abb. 2** Schema eines IgG-Moleküls. Fab: variable Domäne mit der Antigenbindestelle. Fc: konstante Domäne. VL: variabler Teil der leichten Kette. VH: variabler Teil der schweren Kette. CL: konstanter Teil der leichten Kette. CH: konstanter Teil der schweren Kette.

Antigene sind Substanzen, die in der Lage sind, im Organismus eine Abwehrreaktion auszulösen, wenn sie nicht Teil des „immunologischen Selbst“ sind, das heißt, wenn sie dem Immunsystem unbekannt sind (2). Der menschliche Körper ist aus ca.  $10^{13}$  Zellen aufgebaut und beherbergt ca.  $10^{14}$  Mikroorganismen. Betrachtet man diese Tatsache, wird die Bedeutung einer präzisen Unterscheidung von „Selbst“ und „Fremd“ deutlich (1).

Im Knochenmark werden im Zuge der B-Zell-Reifung Klone, die auf körpereigene Strukturen ausgerichtet sind, identifiziert und noch vor Ort eliminiert. Ausschließlich die B-Zellen, deren Antikörper körpereigene Strukturen nicht binden, werden in die Blutbahn freigesetzt und besiedeln die Lymphfollikel der sekundären lymphatischen Organe. Es entwickelt sich eine Selbsttoleranz (1).

Was geschieht, wenn dieser Zustand gestört und das auf Zerstörung des erkannten Antigens programmierte Immunsystem körpereigene Gewebe attackiert, hatte bereits Paul Ehrlich erkannt und als „horror autotoxicus“ beschrieben (3). Ob die autoreaktiven Lymphozyten, die nach Burnets klonaler Selektionstheorie nicht existieren dürften, das Produkt somatischer Mutationen (forbidden clones) sind oder -nach dem Stand der jüngeren Forschung- Ausdruck gestörter Kontrollmechanismen der durchaus im reifen Organismus vorkommenden selbstreaktiven Lymphozyten ist heute nach wie vor Gegenstand der Forschung (3).

Während nicht alle autoimmunen Antikörper eine pathogenetische Bedeutung aufweisen, finden zweifellos bei einer Reihe von Autoimmunerkrankungen die Interaktionen zwischen Immunsystem und körpereigenem Gewebe zum großen Teil basierend auf humoralen Autoantikörpern oder Immunkomplexen statt (3). Zu solchen Autoantikörpern gehören die ANCA (antineutrophile cytoplasmatische Antikörper) mit Zielantigenen in den neutrophilen Granulozyten.

### 1.1.2 ANCA und ANCA-assoziierte Vaskulitiden

Zum ersten Mal wurden ANCA durch Davies et al. 1982 beschrieben. Van der Woude et al. konnten 1985 als erste ein Auftreten von ANCA bei der Wegenerschen Granulomatose (heute Granulomatose mit Polyangiitis, GPA) aufzeigen (4, 5).

ANCA sind assoziiert mit und möglicherweise ein wichtiger pathogenetischer Faktor einer seltenen Gruppe von Vaskulitiden, die theoretisch jedes Organ betreffen können. So gehören neben der Niere als hochvaskularisiertes Organ auch der Respirationstrakt, die Haut und periphere Nerven zu den häufig befallenen Geweben. Die ANCA-assoziierten Vaskulitiden (AAV) sind charakterisiert durch eine nekrotisierende Entzündung der kleinen Gefäße, jedoch können auch andere Gefäßtypen wie Arterien, Arteriolen, Kapillaren, Venen und Venolen betroffen sein (6). Ein weiteres Merkmal ist das



Fehlen bzw. der Mangel an Immunkomplexablagerungen in den betroffenen Gefäßen (pauci-immune Vaskulitiden) (6).

Unter dem Dach der AAV können gemäß der International Chapel Hill Conference (CHCC) von 2012 vier große Erkrankungsgruppen zusammengefasst werden:

1. Mikroskopische Polyangiitis (MPA)
2. Granulomatose mit Polyangiitis (GPA, früher bekannt als Wegner`sche Granulomatose)
3. Renal limitierte NCGN (necrotising crescentic glomerulonephritis)
4. Eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis (EGPA, früher bekannt als Churg-Strauss-Syndrom)

(6).

Die klinische Manifestation der AAV gestaltet sich sehr unterschiedlich und vielgestaltig je nach betroffenem Gewebe und Organsystem. Anzeichen und Symptome können sein:

- Dermale Vaskulitis mit Purpura und Ulzera
- Glomerulonephritis
- Pulmonale Haemorrhagien
- Periphere Neuropathie
- Befall des HNO Traktes
- Entzündung der kleinen okulären und orbitalen Gefäße etc. (7)

Zudem treten im akuten Stadium der Erkrankung in Korrelation zu dem hohen Maß an zirkulierenden inflammatorischen Zytokinen häufig unspezifische Entzündungssymptome wie Fieber, Arthralgien und Myalgien auf (7).

Charakteristisch für alle vier Erkrankungsentitäten ist das Vorhandensein von ANCA. Untersuchungen an ethanolfixierten und permeabilisierten neutrophilen Granulozyten zeigten anhand von zwei unterschiedlichen Fluoreszenz-Mustern die Existenz zwei verschiedener Gruppen von ANCA: die cANCA (zytoplasmatische Fluoreszenz) mit dem Hauptantigen Proteinase 3 (PR3) und pANCA (perinukleäres Muster) gerichtet gegen die Myeloperoxidase (MPO) (8).

An der Entstehung und Manifestation der AAV sind neben den autoimmunen Antikörpern auch andere Faktoren beteiligt. Im Folgenden wird die Rolle und Bedeutung dieser Faktoren für die komplexe Pathogenese aufgezeigt. Hierbei wird auf das CD-Klassifikationssystem (Cluster of differentiation) zurückgegriffen, welches erlaubt, Oberflächenmerkmale von Zellen nach ihren biochemischen und funktionellen Kriterien in immunphänotypische Gruppen zu ordnen. CD-Moleküle sind membrangebundene Glykoproteine, die z.T. zellspezifisch exprimiert werden. Ihre Funktionen sind vielgestaltig. Einige zeigen eine Rezeptor-/ Signalfunktion, während andere eine enzymatische Aktivität aufweisen oder an der Signaltransduktion beteiligt sind (9). Durch den Nachweis bestimmter CD-Moleküle auf der Oberfläche von Zellen können diese bestimmten Populationen und Subpopulationen zugeordnet werden.

## 1.2 Myeloides Compartment

### 1.2.1 Die Rolle der Neutrophilen und Monozyten

Viele der wichtigsten Erkenntnisse über die pathogenetischen Mechanismen in der Entstehung der AAV stammen neben den umfangreichen in vitro Versuchen aus tierexperimentellen Studien (10-15).

Xiao et al. postulierten in ihren Tiermodellen die essentielle Rolle der neutrophilen Granulozyten als Haupteffektorzellen in der AAV. Anhand eines durch anti-MPO-IgG induzierten NCGN-Modells in Mäusen zeigten sie, dass die Depletion von Neutrophilen vor einer Induktion der Erkrankung schützte (10). Es existieren verschiedene Tiermodelle für die MPO-AAV, nach denen die Erkrankung induziert werden kann durch:

- Injektion von murinem anti-MPO IgG in immunkompetente oder immundefiziente Mäuse (11)
- Transfer von anti-MPO B-Zellen beinhaltenden Splenozyten in immundefiziente Mäuse (11)
- Transplantation eines MPO-positiven Knochenmarks in immunisierte MPO-knock-out Mäuse (14)
- Transfer einer subnephritogenen Dosis an anti-GBM Serum (nephrotoxisches Serum) in MPO-immunisierte Mäuse (15).

Das Resultat ist die Entwicklung einer NCGN und in einigen Fällen einer systemischen Vaskulitis, wobei die entzündlichen Läsionen dieser Tiermodelle stark denen der humanen AAV ähnelten.

Basierend auf diesen Ergebnissen lassen sich u.a. folgende Schlussfolgerungen ziehen:

- Vom Knochenmark stammende Zellen sind Hauptziel der anti-MPO-ANCA und notwendig für die Erkrankungsinduktion (10)
- Neutrophile Granulozyten und Monozyten sind als durch ANCA-aktivierte Zellen erforderlich (10)
- Zirkulierende proinflammatorische Faktoren führen zu einer Exazerbation der Erkrankung (14)

Die ANCA-Antigene MPO und PR3 werden sowohl von Neutrophilen als auch von Monozyten exprimiert. Allerdings ist die Bedeutung der Monozyten in der Pathogenese der AAV weniger gut charakterisiert, wobei zunehmende Daten auch aus unserer Arbeitsgruppe beweisen, dass Monozyten eine zentrale Bedeutung in der Pathogenese des Endorganschadens haben (16). Die Beteiligung beider an der Entstehung der entzündlichen Herde in und außerhalb der Gefäßwände demonstriert sich in dem durch Granulombildung, Leukozytenakkumulation und Nekrosen dominierten histologischen Bild. Die akuten vaskulären Läsionen zeigen eine Margination und Diapedese von hauptsächlich Neutrophilen versetzt mit Monozyten. Und auch die initialen perivaskulären Infiltrate weisen einen Neutrophilenreichtum auf (11, 17-19). Innerhalb von Tagen wird die Prädominanz der Neutrophilen ersetzt durch Monozyten und Makrophagen. Zum Zeitpunkt der Biopsie sind in den glomerulären Läsionen Monozyten und Makrophagen gemischt mit T-Zellen vorherrschend (19, 20). Es schließt sich die Phase der Narbenbildung an, die mit interstitieller Kollagenablagerung einhergeht. Die Schwere und Dauer der Inflammation bestimmt das Ausmaß der Narbenbildung und die Möglichkeit zur Regeneration der Gewebsarchitektur und Funktion.

Und obwohl die vaskulären Läsionen nicht komplett frei sind von Immunglobulinablagerungen, ist das Ausmaß der Immunkomplexbildung kein pathogener Treiber der vaskulären Entzündungen (6).

## 1.2.2 Aktivierung der Neutrophilen durch ANCA in vitro

Wie zahlreiche in vitro Studien belegen, sind ANCA verantwortlich für die Induktion der nekrotisierenden Vaskulitis und den konsekutiven Organschaden. Die Interaktion zwischen ANCA und deren jeweiligen Ziel-Antigenen auf der Oberfläche von Neutrophilen und Monozyten führt zur Aktivierung der Zellen. Voraussetzung für die vollständige Aktivierung ist ein vorgeschalteter Priming-Prozess (21, 22). Das Priming wird durch proinflammatorische Zytokine, wie TNF $\alpha$  (23), bakterielles LPS (24) oder C5a (25) vermittelt und bewirkt eine Hochregulation der ANCA-Antigene auf der Zelloberfläche. Priming selbst resultiert nicht in einer ausgewachsenen Neutrophilenaktivierung, sondern ermöglicht viel mehr die Interaktion mit den ANCA-IgG.

Die vollständige Neutrophilenaktivierung erfolgt zum Einen durch Bindung des konstitutiv auf der Membran exprimierten Fc $\gamma$ -Rezeptors durch den Fc-Teil der ANCA-IgG sowie zum Anderen durch die Bindung des F(ab)<sub>2</sub>-Fragments der ANCA an die Antigene auf der Oberfläche der Neutrophilen (26-28). Im Zuge dieser Prozesse werden verschiedene Signalkaskaden in Gang gesetzt und aktiviert, u.a. der p38 mitogen-activated proteinkinase (p38-MAPK) –Pathway (22, 29).

Zusätzlich zu der direkten Aktivierung der Neutrophilen und Monozyten ist die Interaktion zwischen Endothelzellen und ANCA-aktivierten Leukozyten ein wichtiger Baustein in der Pathogenese. Die aktivierten Neutrophilen setzen proinflammatorische Zytokine frei und bewirken eine Hochregulation von Adhäsionsmolekülen der Endothelzellen und somit eine verstärkte Leukozytenadhäsion (30-33).

Kuligowski et al. demonstrierten mittels der Intravitalmikroskopie in Mäusen, dass anti-MPO-IgG eine Adhäsion glomerulärer Leukozyten über  $\alpha$ 4- und  $\beta$ 2-Integrine induzieren (34).

Letztendlich resultiert die Aktivierung der Neutrophilen und Monozyten in einem „respiratory burst“ mit Produktion von intra- und extravasalen toxischen O<sub>2</sub>-Radikalen (ROS) und der Degranulation von lytischen Proteinen sowie der Generierung von proinflammatorischen NET's (23, 28, 35-37).

Der Begriff „NET's“ umfasst extrazelluläres Material bestehend aus Chromatin und granulären Proteinen, freigesetzt durch aktivierte Neutrophile. Die Netze enthalten auch PR3 und MPO (38). Es wurde auch eine mögliche Induktion der ANCA-Autoantikörper durch NET's diskutiert (39). Unsere

Arbeitsgruppe konnte kürzlich darstellen, dass NETs ein zentraler Bestandteil der Pathogenese der AAV sind, indem diese einerseits einen Endothelzellschaden durch ANCA-aktivierte Neutrophile vermitteln und andererseits eine Aktivierung des Komplementsystems induzieren (40).

Die meisten Studien stellen die Neutrophilen in den Fokus. Monozyten exprimieren jedoch ebenso beide ANCA-Antigene und interagieren mit ANCA-IgG (41, 42). In vitro bewirken ANCA-IgG zudem eine Hochregulation von CD14 und CD18 auf Monozyten und triggern die Bildung von reaktiven O<sub>2</sub>-Radikalen (ROS) (42). In tierexperimentellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Monozyten eine essenzielle Bedeutung in der Ausbildung des Endorganschadens haben (16).

## 1.3 Die Bedeutung des humoralen Bestandteils der Immunantwort und der Fc-Rezeptoren in der AAV

### 1.3.1 Die Rolle der Komplement-Faktoren

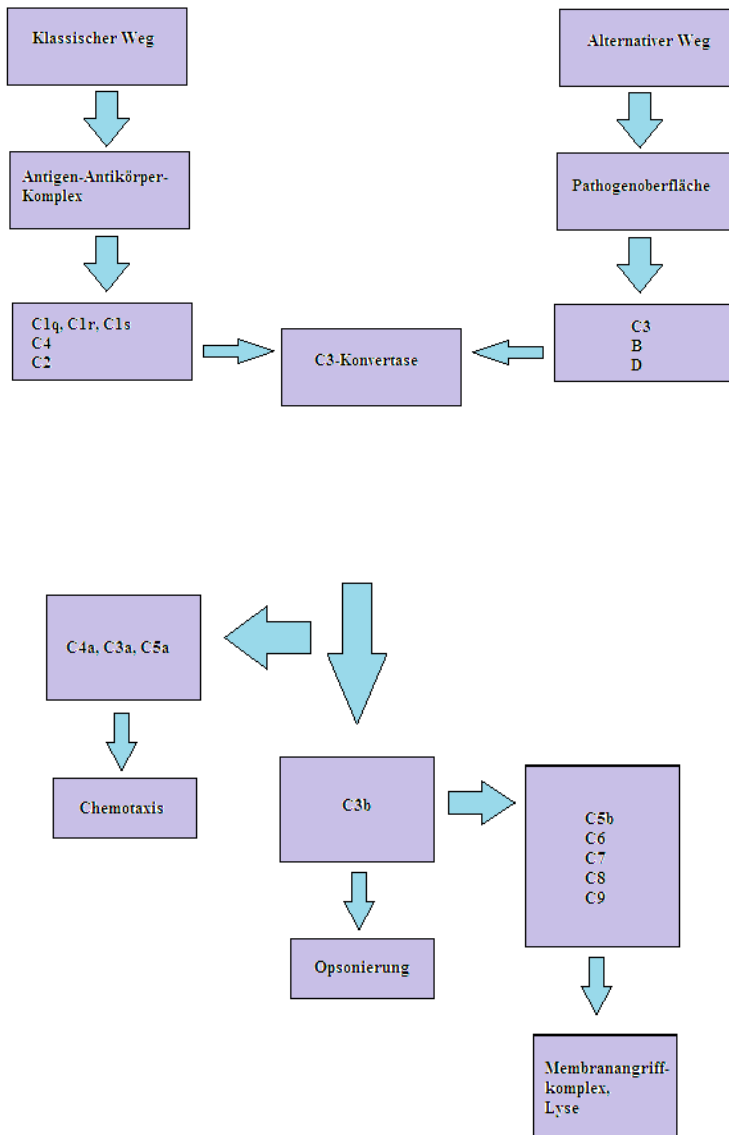
Das Komplementsystem setzt sich aus mehreren Proteinen zusammen, die als Komplementfaktoren (C1-C9) bezeichnet werden. Es unterstützt bzw. komplementiert die Antikörper bei der Abwehr von Erregern. Zu seinen Funktionen zählen:

- Anlocken und Aktivierung von Leukozyten (Chemotaxis/Leukotaxis)
- Erhöhung der Gefäßpermeabilität
- Lyse von Erregern und
- Opsonierung über den Faktor C3b (43).

Die Aktivierung des Komplementsystems kann über mehrere Wege erfolgen, wobei sich die einzelnen Komplementfaktoren kaskadenartig gegenseitig aktivieren. Zwei der drei bekannten Mechanismen sind in Abb. 3 schematisch dargestellt.

Sowohl beim klassischen als auch beim alternativen Weg der Aktivierung laufen proteolytische Spaltungen der einzelnen Faktoren ab. Der Beginn der Kaskaden und die folgenden einzelnen Abläufe bis zur Generierung des Faktors C5b unterscheiden sich im klassischen und alternativen Weg. Ab der Entstehung von C5b sind die letzten Schritte identisch und resultieren in der Bildung des sog. Membranangriffskomplexes (43).

Die durch die Proteolyse entstehenden Spaltprodukte erhalten in der Nomenklatur den Buchstaben „a“. Hierzu zählen C2a, C3a, C4a und C5a. Sie verlassen die Kaskade, steigern u.a. die Gefäßpermeabilität oder induzieren als Entzündungsmediatoren die Freisetzung von Histamin sowie Serotonin und aktivieren Granulozyten und Makrophagen (43).



**Abb. 3** Aktivierung des Komplementsystems. Beim klassischen Weg wird durch Bindung der C1q-Einheit an den Antigen-Antikörper-Komplex der Faktor C1 aktiviert, resultierend in einer

*Konformationsänderung. C1s spaltet daraufhin C2 und C4 proteolytisch. Die Spaltprodukte C2b und C4b bilden einen Komplex, der C3 spaltet und zur Bildung von C3b führt. Es folgen mehrere Zwischenschritte, die schließlich in die Spaltung von C5 und die Entstehung von C5b münden. C5b initiiert die Bildung des sogenannten Membranangriffskomplexes, der durch Bildung einer Pore in der Erregermembran die Lyse und den Erregertod induziert. Der alternative Weg beginnt mit dem Faktor C3, der z.B. durch bakterielle Oberflächenpolysaccharide aktiviert werden kann. In Zusammenarbeit mit den Kofaktoren B und D erfolgt die Proteolyse von C5 durch C3b.*

Als pauci-immune Inflammation ist die AAV charakterisiert durch eine vernachlässigbare lokale Ablagerung von IgG und auch Komplement-Produkten. Zudem zeigt sich kein systemischer Komplement-Verbrauch in aktiven AAV-Patienten. Xiao et al. gelang es in tierexperimentellen Untersuchungen die Rolle des alternativen Komplement-Pathways in der Modulation der AAV zu belegen (44). Die Experimente demonstrierten, dass C5- und Faktor B-defiziente Mäuse im Unterschied zu C4-defizienten und WT-Mäusen vor der Entstehung einer anti-MPO-NCGN geschützt waren (44). Darüber hinaus wirkten C5 inhibierende Antikörper ebenso protektiv (45). Letztlich konnte unsere Arbeitsgruppe nachweisen, dass das durch die Aktivierung des Komplementssystems generierte C5a an den neutrophil-exprimierten C5aR bindet, die Neutrophilen dadurch voraktiviert und somit eine weitere ANCA-Aktivierung unterhält. Eine C5a-Rezeptor-Defizienz auf myeloiden Zellen schützte vor der Entstehung einer anti-MPO-NCGN (25).

Anhand der Beobachtungen in den experimentellen Tiermodellen und auf Basis der unterstützenden Befunde im Menschen wird die pathogenetische Rolle der Komplement-Faktoren wie folgt diskutiert:

Die zirkulierenden Neutrophilen werden beispielsweise durch C5a, stammend aus der Komplementaktivierung, geprimt. Hiernach setzen sie kleine Mengen von ANCA-Antigenen auf ihrer Oberfläche und in die Umgebung frei. Es folgt die Interaktion zwischen ANCA und ANCA-Antigenen auf der Oberfläche der Neutrophilen, resultierend in einer Neutrophilenaktivierung. Die so aktivierten neutrophilen Granulozyten setzen wiederum Faktoren frei, die die Aktivierung des alternativen Komplement-Pathways fördern mit der Generierung von C5a (25).

Somit generieren Neutrophile, ANCA und C5a eine inflammatorische Amplifikationsschleife: C5a lockt und primt noch mehr Neutrophile für die Aktivierung durch ANCA. Dies verursacht eine

stärkere Aktivierung des alternativen Komplement-Pathways und folglich eine gesteigerte Produktion von C5a (46).

Des Weiteren konnten erhöhte Plasmaspiegel u.a. an C5a in aktiven AAV-Patienten detektiert werden (47). Zudem zeigt eine Phase II als auch jüngst publizierte Phase III Studie, dass eine Komplement C5aR-Blockade durch Avacopan Steroide in der Induktionsphase der AAV ersetzen könnte (48, 49).

Daraus lässt sich schlussendlich ableiten, dass die Aktivierung des alternativen Komplement-Pathways für die Induktion der vaskulären Entzündung essenziell notwendig ist.

### 1.3.2 Die Rolle der Fc-Rezeptoren

Wie in vitro Daten belegen, findet die Aktivierung der geprimten Neutrophilen durch die Bindung von ANCA an die exprimierten Antigene sowohl über ihre F(ab)<sub>2</sub>-Fragmente als auch durch eine Fc-Fragment vermittelte Bindung an die Fc-Rezeptoren statt (26, 50).

Humane Neutrophile tragen auf ihrer Oberfläche strukturell und funktional unterschiedliche Fc $\gamma$ -Rezeptoren. Hierzu gehören der transmembrane Fc $\gamma$ RIIA (CD32a) und der GPI (Glycosylphosphatidylinositol) gebundenen Fc $\gamma$ RIIIB-Rezeptor (CD16b), wobei die Dichte des Fc $\gamma$ RIIIB-Rezeptors ca. 10-fach so groß ist verglichen mit der des Fc $\gamma$ RIIA-Rezeptors und ANCA bevorzugt auch an diesen binden (50,51). Während beide Rezeptortypen unabhängig voneinander eine Zellaktivierung induzieren können, präsentiert sich der Fc $\gamma$ RIIIB-Rezeptor als der dominante Fc $\gamma$ -Rezeptor bezüglich der Produktion von ROS in Neutrophilen (52).

Wichtige Voraussetzung für eine effiziente Interaktion zwischen dem Fc-Teil der ANCA-IgG und den Fc $\gamma$ -Rezeptoren scheint die Glykosylierung der CH<sub>2</sub>-Domäne zu sein. Van Timmeren et al demonstrierten, dass eine Deglykosylierung der ANCA-IgG durch Hydrolyse in vitro die Neutrophilenaktivierung inhibiert und das Ausmaß der anti-MPO-IgG-induzierten Glomerulonephritis in Mäusen senkt (53).

Obwohl die meisten Fc $\gamma$ -Rezeptoren aktivierende Eigenschaften aufweisen, zeigt der Fc $\gamma$ RIIB-Rezeptor (CD32b) ein inhibitorisches Signal-Muster und operiert somit als ein negativer Regulator in immunologischen Prozessen. Eine Abwesenheit des Fc $\gamma$ RIIB-Rezeptors bedingt eine Aggravation der



Entzündung durch Zunahme der autoreaktiven T- und B-Zellen, Aktivierung der Neutrophilen durch ANCA und Rekrutierung von Makrophagen und Neutrophilen durch Effektor-T-Zellen (54).

Ein weiterer Fc $\gamma$ -Rezeptor ist Fc $\gamma$ RI (CD64), der in gesunden Individuen kaum bis gar nicht auf der Oberfläche der Neutrophilen exprimiert wird. Allerdings bewirken Inflammationen eine Hochregulation von Fc $\gamma$ RI (55, 56).

## 1.4 Die Bedeutung von CD177 und der Integrine in der AAV

### 1.4.1 Expression von PR3 durch CD177

PR3 befindet sich hauptsächlich in den azurophilen Granula von neutrophilen Granulozyten. Neben diesem intrazellulären Pool exprimieren die Neutrophilen eine variable Menge auf ihrer Oberfläche, dieses jedoch nur auf einer Teilmenge der Population. Die Expression reicht von 0-100% der Neutrophilen eines Individuums und ist genetisch determiniert (57, 58). Ein signifikant höherer Prozentsatz an Oberflächen-PR3 exprimierenden Zellen findet sich bei den AAV-Patienten und scheint somit einen Risikofaktor für die Erkrankung darzustellen. Eine höhere PR3-Membran-Expression ist zudem mit einer erhöhten Rezidivrate assoziiert (59, 60).

Bei CD177 (NB1) handelt es sich um ein GPI-Anker-Protein. Neuere Studien identifizierten es als einen PR3 präsentierenden Membran-Rezeptor (61-63). Als GPI-Anker-Protein besitzt es keine intrazelluläre Domäne sondern ist mit dem  $\beta$ 2-Integrin CD11b (Mac-1) kolokalisiert. Die Interaktion und Kooperation von CD177 und CD11b erfolgt über die extrazellulären Domänen und ist bedeutend für die PR3-ANCA vermittelte Neutrophilendegranulation und ROS-Bildung (61). Außerdem scheint PR3 auf apoptotischen Neutrophilen die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen durch Makrophagen zu stimulieren (64).

## 1.4.2 Die Rolle der Integrine

4 Klassen von Adhäsionsproteinen sind verantwortlich für die Leukozytenadhäsion: Selektine, Selektin-Liganden, Integrine und Immunglobulin ähnliche Moleküle (Ig-like molecules) (65, 66).

Die über Selektine vermittelte Adhäsion resultiert in einem „Rollen“ der Leukozyten auf der Endothelwand. Eine Immobilisierung wird hierdurch nicht erreicht. Vielmehr erleichtert es die Aktivierung der Phagozyten-Integrine sowie die Interaktion zwischen diesen Integrinen auf der Oberfläche der Effektorzellen und den Ig-like Moleküle des Endothels und schließlich die Migration der Phagozyten durch das Endothel in die Gefäßwand (66, 67)

Integrine umfassen eine Gruppe heterodimerer Glykoproteine, bestehend aus nicht-kovalent gebundenen  $\alpha$ -und  $\beta$ -Untereinheiten. Für die Endotheladhäsion scheinen 4 Integrine eine besondere Bedeutung zu spielen: 3  $\beta$ 2-Integrine und 1  $\beta$ 1-Integrin.

Die 3  $\beta$ 2-Integrine haben die  $\beta$ 2-Kette (CD18) gemeinsam und tragen folgende Nomenklatur:

- lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) oder CD11a/CD18
- macrophage-1 antigen (Mac-1) oder CD11b/CD18
- glycoprotein p150,95 oder CD11c/CD18.

Erst die Interaktion zwischen den Integrinen mit den Ig-like Molekülen ermöglicht die Immobilisierung der Leukozyten und die Leukozytenmigration (68).

## 1.5 Der Weg nach innen: intrazelluläre Marker

### 1.5.1 Die Rolle von $\text{TNF}\alpha$ , p38-MAPK und Akt

Wie bereits aufgeführt ist das Neutrophilen-Priming eine wichtige Voraussetzung für die ANCA-Stimulierung und folglich Aktivierung der Neutrophilen.

Heeringa et. al. zeigten im Tiermodell die Aggravation des MPO-IgG induzierten Nierenschadens durch Priming mit LPS und umgekehrt die Abmilderung durch eine TNF $\alpha$ -Blockade (24). Diese Untersuchungen unterstrichen auch die Annahme, dass p38-MAPK an diesem Prozess beteiligt sind.

MAPK werden durch Phosphorylierung aktiviert und sind ihrerseits an einigen proinflammatorischen Signalwegen beteiligt. Experimentell wurde belegt, dass TNF $\alpha$ -Priming zu einer Translokation der ANCA-Antigene aus der zytoplasmatischen Granula auf die Zelloberfläche führt, resultierend in einer verstärkten ANCA-Bindung an das Antigen. Hierbei zeigten sich auch Hinweise auf eine Abhängigkeit dieser Translokation von der Aktivität der p38-MAPK (22).

Zudem scheinen MAPK ebenso an der Akt-Aktivierung beteiligt zu sein, da eine Blockade der p38-MAPK-Aktivität die Akt-Phosphorylierung inhibiert (69).

Akt ist eine Serin/Threonin-Kinase, die in den PI3-Kinase (phosphoinositide 3-kinase) Signalweg eingebettet ist und über diesen agiert. Die PI3-Kinase kontrolliert mehrere zelluläre Funktionen. Sie generiert u.a. PIP2 (Phosphatidylinositol-3,4-Diphosphat) und PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat), die für die Rekrutierung von Akt an die Zellplasmamembran verantwortlich sind. An der Oberfläche kann Akt z.B. durch PDK2 phosphoryliert werden. AktP wird mit der Kontrolle des „respiratory burst“ der aktivierten Neutrophilen in Verbindung gebracht (69).

In vitro Studien demonstrierten, dass p38-MAPK abhängige Proteinkinasen (MK-2) als PDK2 fungieren und Akt in stimulierten Neutrophilen aktivieren können (70). Akt kann folglich durch beides aktiviert werden, durch die Produkte der PI3-Kinase oder durch das p38-MAPK-Substrat. ANCA scheinen im Kontext der Neutrophilenaktivierung beide Wege zu nutzen. Eine Blockade der PI3-Aktivierung resultiert in einer Blockade der ANCA induzierten Akt-Phosphorylierung und somit der Superoxid-Bildung, die durch AktP getriggert wird (69).

Während des TNF $\alpha$ -Primings und der ANCA-Antigen Translokation läuft die Akt-Aktivierung scheinbar über den p38-MAPK Signalweg. Priming beinhaltet folglich nicht nur die Hochregulation der ANCA-Antigene sondern auch eine Induktion der Signaltransduktionswege (22).

In vitro blockieren spezifische Inhibitoren der p38-MAPK die Bildung von O<sub>2</sub>-Radikalen und die Degranulation der durch ANCA aktivierten Neutrophilen (29).

## 1.5.2 Die Rolle von IL-1 $\beta$

In einem Knochenmark-Transplantationsmodell mit Dipeptidyl-Peptidase-I-defizienten Mäusen konnte der Effekt der neutrophilen Serin-Proteasen (NSPs) auf die Produktion und Freisetzung von IL-1 $\beta$  veranschaulicht werden.

Geprierte Neutrophile und Monozyten reagieren auf die Stimulation mit ANCA-IgG mit der Freisetzung von proteolytisch aktiven Proteinen. Hierzu zählen die NSPs, die in neutrophilen Granula und monozytischen Lysosomen lokalisiert sind und PR3, neutrophile Elastase, Cathepsin G und NSP4 umfassen (71). Die NSPs werden als inaktive Vorstufen gebildet und erst mit der Spaltung durch die lysosomale Cystein-Protease DPPI (Dipeptidyl-Peptidase, Cathepsin C) aktiviert (72). Aktive Serinproteasen modulieren die Entzündungsreaktion durch verschiedene Prozesse, so durch die proteolytische Degradation von extrazellulärer Matrix oder der Prozessierung von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Oberflächenrezeptoren oder Signalmolekülen. Zytokine sind ihrerseits wichtige Entzündungsmediatoren. Im Serum aktiver AAV-Patienten wurden beispielsweise erhöhte Konzentrationen an TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  detektiert (73). IL-1 $\beta$  –hauptsächlich aus Monozyten stammend– ist als Schlüsselmediator maßgeblich in Immunantworten und Entzündungsreaktionen involviert. Seine Signifikanz in der AAV-Pathogenese ist noch nicht gänzlich entschlüsselt. Im Knochenmark-Transplantationsmodell konnte demonstriert werden, dass verglichen mit dem WT-Knochenmark das DPPI-defiziente Knochenmark vor der Entstehung einer MPO-IgG induzierten NCGN schützte. Die Mäuse mit dem Mangel an funktional aktiven Serin-Proteasen zeigten deutlich reduzierte Spiegel an IL-1 $\beta$  (74). Die Bildung und Freisetzung von IL-1 $\beta$  kann bei humanen Monozyten und Neutrophilen durch humanes ANCA-IgG stimuliert werden. Durch eine Vorbehandlung mit Serin-Protease-Inhibitoren wird dieser Mechanismus reduziert, was in Synopsis die Abhängigkeit der ANCA induzierten IL-1 $\beta$ -Generierung von den Serin-Proteasen demonstriert. Dieser Effekt ist in Monozyten als Hauptquelle des IL-1 $\beta$  stärker vertreten als in Neutrophilen (74).

Zusammenfassend scheint die NSPs vermittelte IL-1 $\beta$ -Prozessierung wichtig für die Induktion der ANCA-NCGN zu sein. Die spezifische IL-1 $\beta$ -Blockade durch Anakinra reduziert die ANCA induzierte NCGN (74).

Die Bildung von IL-1 $\beta$  präsentiert sich in der Regel als ein eng überwachter Prozess, der hauptsächlich durch einen Multienzym-Komplex (Inflammasom) reguliert wird: die Inflammasom-Stimulierung führt zur Prozessierung der inaktiven Procaspase-1 zur aktiven Caspase-1. Dieses Enzym spaltet pro-IL-1 $\beta$  zu funktional aktivem IL-1 $\beta$  (75).

Da in Experimenten eine Inhibierung der Caspase-1 keinen Einfluss auf die IL-1 $\beta$ -Bildung in ANCA-aktivierten Monozyten zeigte, scheint der klassische Weg in diesen inaktiviert zu sein (Caspase-1-unabhängige IL-1 $\beta$ -Bildung).

### 1.5.3 Die Rolle von TH17-Zellen und IL-17

Bislang standen in der Betrachtung der Pathogenese der AAV Neutrophile und Monozyten als Haupteffektorzellen im Vordergrund, nichtsdestotrotz scheinen T-Lymphozyten ebenfalls involviert zu sein. Im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen rückt v.a. eine Subpopulation in den Fokus: TH17-Zellen. Ihre pathogene Rolle in der Entstehung der AAV ist allerdings noch nicht ausreichend erforscht. Die Annahme, sie könnten eine pathogenetische Rolle spielen, stützt sich auf folgende Beobachtungen:

- Im Serum von AAV-Patienten\*innen können sowohl PR3- als auch MPO reaktive T-Zellen nachgewiesen werden und Subpopulationen von T-Zellen zeigen sich sogar während der Erkrankungsremission persistierend aktiv (76-78).
- T-Zellen und Makrophagen finden sich auch in den renalen Läsionen und eine T-Zell-gerichtete Therapie kann bei refraktärer AAV eine Remission induzieren (20, 79).

TH17-Zellen stammen aus der Linie der CD4<sup>+</sup> T-Zellen (80). Das IL-17, das sie produzieren, ist ein Zytokin mit vielfältigen inflammatorischen und hämatopoetischen Eigenschaften (81). Hierzu gehören die Freisetzung von anderen proinflammatorischen Zytokinen wie TNF $\alpha$ , Hochregulation von Adhäsions- und MHC-Molekülen sowie die Rekrutierung von Monozyten und Neutrophilen (82). All dies zeichnet auch die akute Phase der AAV aus. Verschiedene tierexperimentelle Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen konnten überzeugend demonstrieren, dass TH17-Zellen eine essenzielle Rolle in der Induktion einer ANCA-Glomerulonephritis spielen (83, 84).

## 1.6 Resümee und Fragestellung

### 1.6.1 Resümee

ANCA finden sich in Patienten\*innen mit einer systemischen Vaskulitis der kleinen Gefäße und in Patienten\*innen mit NCGN. Ihre Hauptantigene sind MPO und PR3, die sich in den intrazellulären Granula von Neutrophilen und Lysosomen der Monozyten befinden. In vitro Studien demonstrierten, dass eine Behandlung der Neutrophilen mit z.B.  $\text{TNF}\alpha$  zu einer Translokation von MPO und PR3 auf die Zelloberfläche führt (Priming), wo sie für die zirkulierenden Antikörper zugänglich werden. Entsprechend dem pathogenetischen Modell binden ANCA sowohl über den Fc-Rezeptor der Zellen als auch über ihr  $\text{F(ab)}_2$ -Fragment an die exprimierten Antigene und setzen, wie bereits das vorgeschaltete Priming, intrazelluläre Signalkaskaden in Gang, die in die Aktivierung der Neutrophilen münden. Das resultiert in einer Freisetzung von ROS, zytotoxischen Granula und proinflammatorischen Zytokinen. ANCA-aktivierte Neutrophile adhäreren an Endothelzellen und bedingen letztendlich den Gefäßschaden.

### 1.6.2 Fragestellung

In Zusammenschau der aktuellen Erkenntnisse wird deutlich, dass eine Vielzahl von Faktoren an der Entstehung einer AAV beteiligt ist. Hierzu zählen intrazelluläre Kinasen, Komplement- und Fc-Rezeptoren sowie Integrine. Ihre Bedeutung wurde in zahlreichen in vitro und tierexperimentellen Studien demonstriert. Als Haupteffektorzellen in der Zerstörung der Gefäße und somit des Endorganschadens beziehen die neutrophilen Granulozyten allerdings nach wie vor eine Schlüsselposition. Sie sind die Protagonisten im Prozess der Inflammation. Ihre Aktivierung, die Migration in die Gefäßwand und die Bildung von ROS sowie Degranulation lytischer Enzyme sind wichtige Kernpunkte in der Entstehung der AAV. Eingebettet in ein komplexes Netzwerk aus Aktivatoren, Zytokinen, Komplementfaktoren und Integrinen sind sie auch der Schauplatz für einen Großteil der stattfindenden Prozesse. Die verschiedenen Proteine bzw. Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche bilden die Voraussetzung für die Interaktionen mit den anderen Faktoren wie ANCA oder dem Komplementsystem. Das Priming, die Aktivierung, die Bindung der Komplementfaktoren

oder das Einwandern in die Gefäßwand könnten ohne die entsprechenden Oberflächenmoleküle sowie auch intrazellulären Proteine nicht erfolgen. Die Bedeutung der neutrophilen Granulozyten für die Pathogenese wirft die Frage auf, ob das Vorhandensein von ANCA der tragende Risikofaktor für die Entwicklung einer AAV ist. Aus Untersuchungen weiß man, dass auch bei einigen gesunden Individuen ANCA nachgewiesen werden konnten (85). Hieraus ließe sich ableiten, dass ANCA alleine nicht zwangsläufig zum Krankheitsausbruch führen. Angesichts der tragenden Rolle der neutrophilen Granulozyten wäre eine Subpopulation denkbar, die im Zusammenspiel mit den anderen Faktoren zur Entwicklung der AAV führt. Diese AAV prädisponierende Subpopulation wäre gemäß der Hypothese im Kollektiv der Erkrankten häufiger anzutreffen als in gesunden Individuen und könnte anhand des Musters ihrer Oberflächenmoleküle und intrazellulären Proteine identifiziert werden. Eine umfassende Analyse der Zelloberfläche von neutrophilen Granulozyten gestaltete sich bislang methodenbedingt schwierig. Die Immunphänotypisierung kann durch eine Fluoreszenzmarkierung von Antikörpern erfolgen. In der Durchflusszytometrie werden Antikörper, die gegen unterschiedliche Proteine der Zelloberfläche gerichtet sind, an Farbstoffe konjugiert, die in unterschiedlichen Farben fluoreszieren. So können parallel mehrere Antikörper in einer Probe angewandt werden. Die Überlappung der Emissionsspektren der fluoreszenzmarkierten Antikörper (Spillover) stellt bei der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie jedoch ein entscheidend limitierendes Problem dar. Dadurch wird die Analyse auf zellulärer Ebene auf eine geringe Anzahl von Markern begrenzt. Mit jedem zusätzlichen Fluoreszenz-Antikörper steigen das Risiko der Überlagerung der Emissionsspektren und die Schwierigkeit, die in den falschen Kanälen detektierten Fluoreszenzsignale mittels entsprechender Softwareprogramme auszugleichen. Beim Einsatz eines größeren Panels wäre durch das Spillover eine saubere Trennung nicht mehr gewährleistet. Da für die Analyse der Zelloberfläche und auch der intrazellulären Proteine ein breites Spektrum an Markern notwendig ist, musste ein Verfahren gewählt werden, das sowohl eine parallele extra- und intrazelluläre Färbung als auch den breiten Einsatz von Markern ermöglicht. Die CyTOF- Methode (cytometry by time of flight) fußt auf dem Prinzip der Massenspektrometrie und trägt auch Eigenschaften der Durchflusszytometrie. Zum Einsatz kommen Antikörper, die nicht an Fluorochrome sondern seltene Schwermetall-Isotope gekoppelt sind, was den Einsatz einer größeren Anzahl an Markern erlaubt. Die Idee dieser Arbeit war es, basierend auf den aktuellen Daten und unter Anwendung des CyTOF-Verfahrens einen Pool an intrazellulären und Oberflächenmarkern zusammenzustellen und eine Methode zu etablieren, die diesen Pool benutzt, um signifikante

Unterschieden im Vorkommen einzelner Marker zwischen Gesunden und AAV-Patienten\*innen zu untersuchen. Aufbauend auf diesen Unterschieden kann die Hypothese überprüft werden, ob AAV-Patienten\*innen im Vergleich mit Gesunden eine spezielle Subpopulation an Neutrophilen beherbergen im Sinne eines AAV prädespositionierenden „Neutrophilen-Zweiges“.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Patientenkollektiv**

Diese Studie erhielt eine Genehmigung von der Ethikkommission (Nr. EA3/011/06, AA3/00/44).

Die Patienten\*innen wurden aus der nephrologischen Abteilung der Charité Campus Virchow Klinikum sowohl aus der ambulanten Sprechstunde als auch aus dem stationären Bereich und aus dem Klinikum Helios Buch rekrutiert. Alle Patienten\*innen erfüllten die Klassifikationskriterien für eine AAV. Sie wurden im Vorfeld über die Ziele der Studie informiert und gaben eine schriftliche Einverständniserklärung zur Verwendung der Proben.

8 Patienten\*innen hatten eine aktive Form der AAV (de novo und Rückfall), definiert als neues Auftreten bzw. Wiederauftreten oder Exazerbieren klinischer Symptome einer akuten Vaskulitis, die ein Strategiewechsel in der Therapie erforderten. Wenn möglich erfolgte die Blutentnahme vor Beginn der immunsuppressiven Therapie, jedoch waren 4 der 8 Patienten\*innen bereits unter einer Therapie mit Glukokortikoiden zum Zeitpunkt der Datenerhebung.

12 der AAV-Patienten\*innen befanden sich in Remission. Kategorisiert wurde nach dem Vorhandensein von MPO- oder PR3-ANCA. 8 gesunde Kontrollen wurden aus dem Pool der Mitarbeiter\*innen und Studenten\*innen der Charité Campus Virchow Klinikum und des DRFZ rekrutiert.



## 2.1.2 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion einer peripheren Vene bzw. am liegenden zentralvenösen Zugang, wobei 10 ml Blut in ein Heparinröhrchen abgenommen wurden. Das Blut wurde bis zur folgenden Weiterverarbeitung am selben Tag gekühlt gelagert und transportiert.

## 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

**Tab. 1:** *Verwendete Chemikalien und Reagenzien*

<b>Chemikalien/ Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Beriglobin Human TruStain FcX</b>	Biologend (San Diego, USA)
<b>Bovines Serum Albumin (BSA)</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>Cisplatin in DMSO</b>	Enzo Life Science, Inc (New York, USA)
<b>Destilliertes H<sub>2</sub>O</b>	DRFZ, Millipore
<b>EQ Four Element Calibration Beads MaxPar®</b>	Fluidigm (California, USA)
<b>Iridium-Intercalator MaxPar®</b>	Fluidigm (California, USA)
<b>Natrium-Acid</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>Paraformaldehyd (PFA)</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biomol (Hamburg, Deutschland)
Saponin	ECRC (Berlin, Deutschland)
TNF $\alpha$	HumanZyme (Chicago, USA)

## 2.1.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien

**Tab. 2:** *Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien*

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Cell Strainer Cap 70 $\mu$ m	STEMCELL Technologies Inc (Vancouver, Kanada)
CyTOF Massenzytometer	Fluidigm (California, USA)

<b>Eppendorf Tube</b>	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
<b>FACS tube</b>	STEMCELL Technologies Inc (Vancouver, Kanada)
<b>Falcon tube 50 ml</b>	Ratiolab (München, Deutschland)
<b>Falcon tube 15 ml</b>	Ratiolab (München, Deutschland)
<b>Heparinröhrchen 10 ml</b>	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
<b>MACSQuant Durchflusszytometer</b>	MACS Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Polypropylen tube	STEMCELL Technologies Inc (Vancouver, Kanada)
Zentrifuge	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

## 2.1.5 Puffer

**Tab. 3:** *Verwendete Puffer. Aufgeführt sind die Zusammensetzung der selbst hergestellten Puffer und die Hersteller der erworbenen Puffer.*

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung/ Hersteller</b>
CSM	500 ml PBS 2,5 g BSA 100 mg Natrium-Acid
Erylyse Buffer	QIAGEN (Hilden, Deutschland)
Phosphate Buffered Saline (PBS)	PBS Biomol 1:10 verdünnt in dest. H <sub>2</sub> O
Fix I Buffer MaxPar®	Fluidigm (California, USA)
Fix and Perm Buffer MaxPar®	Fluidigm (California, USA)
Perm-S Buffer MaxPar®	Fluidigm (California, USA)

## 2.1.6 Antikörper

Alle verwendeten Antikörper sowie deren Klone und Metallkonjugate sind in Tab. 4 aufgelistet. Ein Teil der Antikörper konnte als bereits einsatzfertiges Antikörper-Metall-Konjugat von der Firma Fluidigm erworben werden, die anderen wurden im DRFZ mit den entsprechenden Metallen konjugiert. Vor dem Einsatz wurden die Antikörper austitriert und so die optimalen Konzentrationen bestimmt.

**Tab. 4:** *Verwendete Antikörper-Metall-Konjugate*

<b>Antigen</b>	<b>Isotop</b>	<b>Klon</b>	<b>Hersteller</b>
CD45	Pr 141	5B1	Fluidigm
CD177	Yb 173	MEM-166	BioLegend
CD66b	Sm 149	CEACAM 8	Novus Biologicals
CD3	Er 170	Ucht 1	BioLegend
CD20	Yb 171	2H7	Fluidigm
CD18	Dy 163	TS1/18	BioLegend
CD14	Lu 175	M5E2	Fluidigm
CD15	Dy 164	W6D3	Fluidigm
CD16	Ho 165	3G8	Fluidigm
CD35	Er 167	E11	Miltenyi Biotec
CD11a	Nd 142	HI 111	Fluidigm
CD11b	Nd 144	ICRF 44	Fluidigm
CD11c	Tb 159	Bu 15	Fluidigm
CD32	Dy 162	FUN-2	BioLegend
CD33	Tm 169	WM 53	Fluidigm
HLA-DR	Nd 143	L2 43	Fluidigm
MHC II	Dy 161	CYR-h Class 2	BioScience
CD88	Sm 147	S5/1	Miltenyi Biotec
CD64	Nd 146	10.1	Fluidigm
C5L2	Nd 145	1D9-M12	BioLegend

p38P	GD 156	D3F9	Fluidigm
AktP	Sm 152	D9E	Fluidigm
TNF $\alpha$	Eu 151	Mab1	Arigo
IL-17A	Nd 148	Bc168	Fluidigm
IL-17F	Er 166	SHLR 17	Fluidigm
IL-1 $\beta$	Gd 158	H1b 27	Novus Biologicals

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Präparation der Zellen und Live-Dead-Färbung

Der erste Part der Zellenzubereitung bis zur Fixierung wurde orientierend am DVS-Protokoll durchgeführt.

Das Selektionieren der humanen Leukozyten erfolgte aus heparinisiertem Vollblut. Zur Aufreinigung wurden zunächst 10 ml Vollblut mit 40 ml Erylysepuffer (QIAGEN) versetzt, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 4°C und 300g zentrifugiert. Die Erythrozyten wurden lysiert und folgend mit dem Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde ein zweites Mal in 50 ml Erylysepuffer aufgenommen und für weitere 7 min auf Eis gestellt. Nach erneutem Abzentrifugieren wurde das Pellet in CSM resuspendiert und die Probe schließlich auf ein Volumen von 5 ml mit CSM aufgefüllt. Zur späteren Abgrenzung der vitalen von den avitalen Zellen erfolgte eine Färbung mit Cisplatin. Hierzu wurde der Probe 1 ml Cisplatin in DMSO (5 $\mu$ M) hinzugefügt und die Reaktion nach 1 Minute mit 5 ml CSM gestoppt. Bei diesem einminütigen Inkubationsschritt bindet das Cisplatin bevorzugt nicht-vitale Zellen und generiert so ein Signal, das mittels Massenzytometrie quantifiziert werden kann. Dabei diffundiert das Cisplatin schnell in Zellen mit einer kompromittierten Plasmamembran und zeigt eine erhöhte Reaktivität gegenüber nukleophilen Proteinen, resultierend in kovalenten Bindungen. Mittels eines MACSQuant Durchflusszytometers wurden die erneut zentrifugierten und in CSM aufgenommenen Zellen gezählt, auf 3x10<sup>6</sup> Zellen pro 1 ml eingestellt und auf die entsprechenden FACS-tubes verteilt.

## 2.2.2 Erster Fc-Block

Fc-Rezeptoren werden auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert, u.a. auf Monozyten, Granulozyten, B-Lymphozyten und dendritischen Zellen. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper über die Fc-Rezeptoren der Zellen zu vermeiden, wurde vor der Applikation der Oberflächen-Marker ein Fc-Block zwischen gestellt. Bei diesem Schritt wurden die Proben nach der Zentrifugation für 10 min bei Raumtemperatur in Beriglobin inkubiert. Dabei verhindert der Fc-Inhibitor durch eine Blockade der zelleigenen Fc-Rezeptoren die unspezifische Bindung der metallkonjugierten Antikörper über deren Fc-Fragmente. Hierdurch soll der Einfluss unspezifischer Bindungen auf die Ergebnisse reduziert werden. Der Fc-Inhibitor interagiert nicht mit dem nachfolgenden Einsatz der Antikörper gegen CD16, CD32 und CD64. Die Zellen wurden anschließend in CSM resuspendiert und erneut zentrifugiert.

## 2.2.3 Oberflächenfärbung und Fixierung

Die Oberflächenfärbung erfolgte mittels eines Antikörpermixes, bestehend aus den in Tab. 4 aufgeführten Oberflächenantikörpern in CSM. Die optimale Konzentration für jeden Antikörper wurde im Zuge des Etablierungsprozesses der Methode mit Hilfe von Titrationsreihen im Vorfeld bestimmt. Jede Probe wurde in 100 µl Antikörpermix aufgenommen, für 25 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in CSM gewaschen. Nach einem zweiten Waschschrift in PBS folgte die Fixierung der Zellen. In einer Gegenüberstellung mehrerer Fixierungsoptionen erbrachte die Verwendung von 4%-igem PFA und die Fixierung der Zellen über Nacht gekühlt bei 4°C die besten Resultate. Bei der Verwendung des im Originalprotokoll vom Hersteller (DVS) ursprünglich empfohlenem Fix I-Puffers kam es, sowie bei 1,6%-igem PFA und einer kürzeren Inkubationszeit, zu mehr oder minder schweren Verlusten der Oberflächensignale.

## 2.2.4 Zweiter Fc-Block und Etablierung der intrazellulären Färbung

Die intrazelluläre Färbung konnte nicht gemäß dem vorliegenden DVS-Protokoll durchgeführt werden. In mehreren Versuchen kam es wiederholt zu moderaten bis schweren Verlusten des

Oberflächensignals, sodass eine Optimierung und Neuetablierung der Methode notwendig wurde. In mehreren aufeinander aufgebauten Troubleshoots erfolgte zunächst die Auswahl der passenden Fixierungsmethode und der Permeabilisierungspuffer. Auswahlkriterium stellte der Erhalt der Oberfläche bei bestmöglichem intrazellulären Signal dar.

Aufbauend auf den Ergebnissen aus diesen Experimenten mussten auch die folgenden Schritte des ursprünglichen Protokolls reevaluiert werden. Da hierbei auch der Verdacht einer erhöhten Unspezifität der intrazellulären Marker aufkam, wurde es notwendig, einen zweiten Fc-Block vor die intrazelluläre Färbung zu setzen. Basierend auf den Erkenntnissen dieser Experimente wurde folgende Methode der intrazellulären Färbung gewählt:

Die Fixierung erfolgte, wie oben bereits dargestellt, in 4% PFA über Nacht. Nach einem Zentrifugierschritt mit 800 g bei Raumtemperatur wurden die Zellen zweimalig in 1 ml 0,3% Saponin gewaschen und in 50 µl 0,3% Saponin resuspendiert. Nach dem zweiten Fc-Block mit 5 µl Beriglobin pro Probe für 10 min folgte die Inkubation mit dem Antikörpermix bestehend aus den in Tab. 4 aufgeführten intrazellulären Antikörpern in 0,3% Saponin für die Dauer von 30 min.

## 2.2.5 DNA-Färbung und Vorbereitung zur Messung

Für die DNA-Färbung kam eine Iridium-Intercalatorsolution (Ir-Intercalator) im Puffer FixandPerm® zum Einsatz. Diese beinhaltet die Iridium-Isotope <sup>191</sup>Ir und <sup>193</sup>Ir. Bei der Färbung der Zellen mit dem Ir-Intercalator bindet dieser zelluläre Nukleinsäuren und die Detektion beider stabiler Isotope ermöglicht die Identifizierung kernhaltiger Zellen. Da der Intercalator jedoch vitale Zellmembranen nicht passieren kann, ist eine vohergehende Fixierung und/oder Permeabilisierung notwendig. Vor der DNA-Färbung wurde das Pellet zweimal in CSM gewaschen und anschließend in 1 ml Ir-Intercalatorsolution (125 nM) resuspendiert und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgten mehrere Waschschrte zunächst einmal in CSM und nachfolgend zweimal in destilliertem H<sub>2</sub>O. Die Zellen wurden schließlich in destilliertem H<sub>2</sub>O resuspendiert und durch ein 70 µm Cell-Strainer-Cap in Polypropylen-Röhrchen überführt. Nach einer zweiten Zählung am MACSQuant Durchflusszytometer wurden die Proben auf je 5x10<sup>5</sup> Zellen/ml destilliertes H<sub>2</sub>O unter Hinzunahme von EQ Four Element Calibration Beads® eingestellt. Die Calibrations Beads®

beinhalten Cerium ( $^{140}/^{142}\text{Ce}$ ), Europium ( $^{151}/^{153}\text{Eu}$ ), Holmium ( $^{165}\text{Ho}$ ) und Lutetium in bekannter Konzentration ( $^{175}/^{176}\text{Lu}$ ) und dienen der Normierung der Daten.

## 2.2.6 CyTOF-Messung und Normierung der Daten

Die Methode der „Cytometrie by time of flight“ (CyTOF) ermöglicht die gleichzeitige Analyse einer Vielfalt von Parametern in einer Probe und überwindet damit die Limitationen der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie. Die Möglichkeit zur multiparametrischen Einzelzellanalyse basiert auf der Kopplung von Übergangsmetall-Isotopen an die Antikörper anstelle von Fluoreszenzfarbstoffen. Dabei wird ein spezifisches Schwermetall an einen Antikörper gebunden (Antikörper-Schwermetall-Konjugat). Aufgrund des fehlenden natürlichen Vorkommens dieser Isotope wird auch der Störhintergrund reduziert. Bis zu 50 verschiedene Konjugate können so in einer Probe die Zellen markieren. Diese werden anschließend in 7500 K heißes Argonplasma geleitet und ionisiert. Nach dem Time of flight Prinzip (TOF) können die spezifischen Massen der Antikörperkonjugate detektiert und mit entsprechenden Softwareprogrammen analysiert werden (86).

Die Analyse der am CyTOF generierten Daten erfolgte mit dem Softwareprogramm FlowJo (FlowJo LLC, Version 10, Ashland, Oregon) visuell.

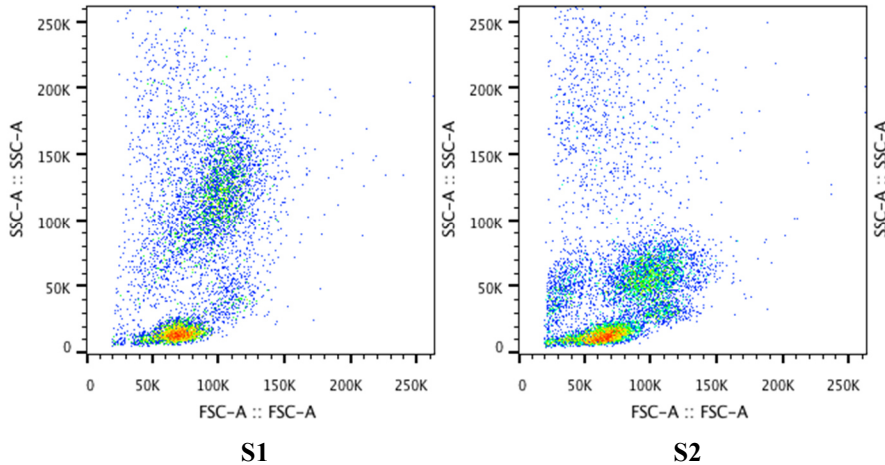
Im zweiten Teil wurden zum statistischen Vergleich der Probenkollektive der Mann-Whitney-U-Test (Excel, Microsoft Office 2010, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) sowie ein Programm zur Analyse von CyTOF-Daten (SPADE) angewandt. SPADE ist ein Algorithmus zur Bildung von Clustern aus multiparametrischen Datensätzen. Die geclusterten Daten werden in Form eines Baumdiagramms entsprechend ihrer Verwandtschaft dargestellt (87).

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Etablierung der Methode

#### 3.1.1 Basic Troubleshoot: Kontrolle der Fixierung und Permeabilisierung

Unter Anwendung des DVS-Protokolls zeigte sich gleich zu Beginn der Versuche wiederholt ein erheblicher Verlust der Oberflächensignale bei gleichzeitiger Färbung sowohl der Oberflächen- als auch der intrazellulären Marker der Zellpopulationen. Die erste Gegenüberstellung einer Probe nach Oberflächenfärbung (surface staining) und einer zweiten Probe nach Oberflächenfärbung mit folgender Permeabilisierung und Färbung der intrazellulären Marker (intracellular staining) ist in den Abb. 4-6 dargestellt. Beide Proben stammen von demselben gesunden Probanden (healthy donor, HD) und wurden vor der Inkubation mit den Antikörpern mittels TNF $\alpha$  stimuliert.



**Abb. 4** Analyse mittels Durchflusszytometrie (FACS) am MACSQUANT.

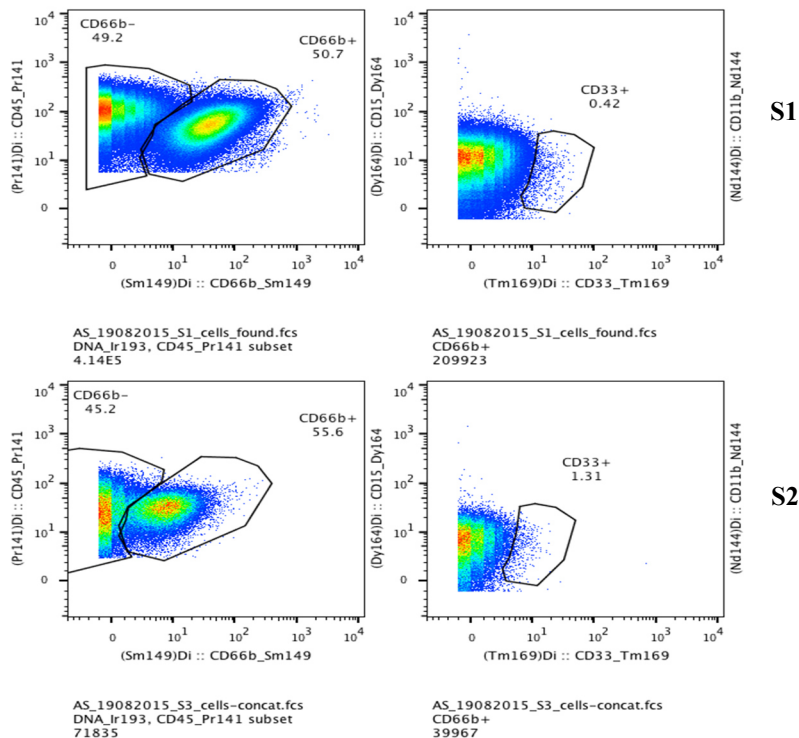
*S1: Probe nach Färbung mit den Oberflächenmarkern und Fixierung in PFA 4%.*

*S2: Probe nach Färbung mit den Oberflächenmarkern, Fixierung in Fix1® buffer, Permeabilisierung in PermS®, Färbung der intrazellulären Marker.*



Die im Voraus erfolgten Schritte der Zellaufbereitung, Stimulierung mit TNF $\alpha$ , Behandlung mit Cisplatin sowie die sich anschließenden Schritte der DNA-Färbung mit Iridium und Vorbereitung für die CyTOF-Messung waren bei beiden Proben identisch.

Bereits während der FACS-Analyse zeigte sich eine Verschiebung der einzelnen Zellpopulation resultierend in einer erschwerten Diskrimination zwischen Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten.

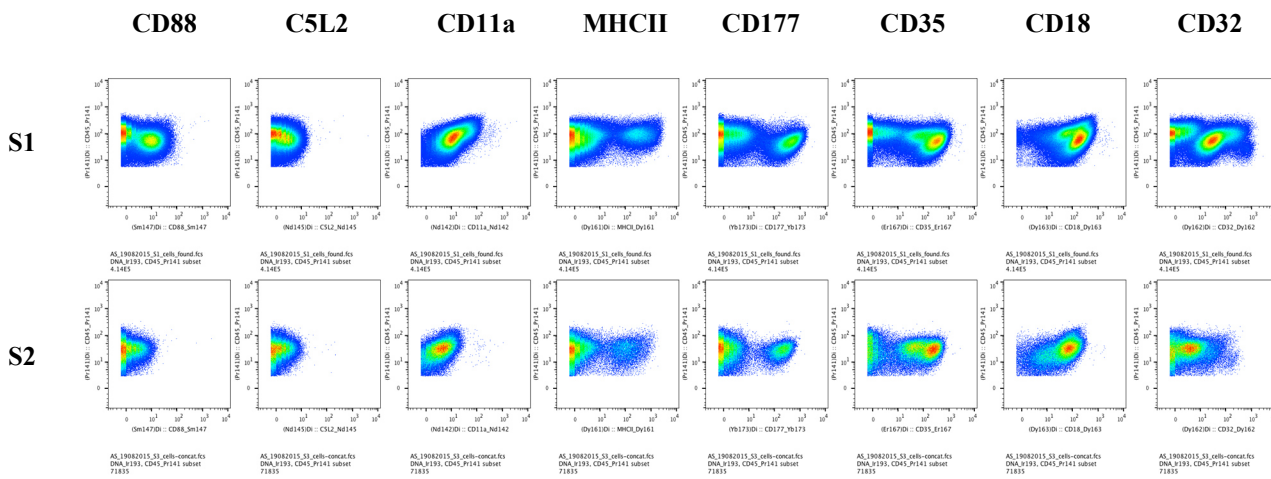


**Abb. 5** Analyse mittels CyTOF. Nach der Selektionierung der DNA-haltigen Zellen anhand der Iridium Färbung und Bestimmung der CD45+ Zellen (Leukozyten) wurde zunächst CD45+ gegen CD66b untersucht (links). Die CD45+CD66b+-Zellen wurden dann probatorisch weiter differenziert durch die Darstellung CD15 gegen CD33 (rechts).

S1: Probe mit Oberflächenfärbung und Fixierung in PFA 4%.

S2: Oberflächenfärbung mit folgender Fixierung in Fix1® Puffer, Permeabilisierung in PermS® und intrazellulärer Färbung.

In der sich anschließenden Analyse beider Proben mittels CyTOF konnte ein deutlicher Verlust der Oberflächensignale unter anderen für die Marker CD45 und CD66b detektiert werden. Auch ein großer Teil der restlichen Oberflächenmarker inklusive CD88, CD11a, CD32 zeigte einen Signalverlust nach der Behandlung der Zellen mit Fix1® Puffer und PermS® sowie der folgenden intrazellulären Färbung (Abb. 6).



**Abb. 6** Analyse mittels CyTOF der Marker CD88, C5L2, CD11a, MHCII, CD177, CD35, CD18 und CD32 auf CD45<sup>+</sup>-Zellen.

*S1: Probe mit Oberflächenfärbung und Fixierung in PFA 4%.*

*S2: Oberflächenfärbung mit folgender Fixierung in Fix1® Puffer, Permeabilisierung in PermS® und intrazellulärer Färbung.*

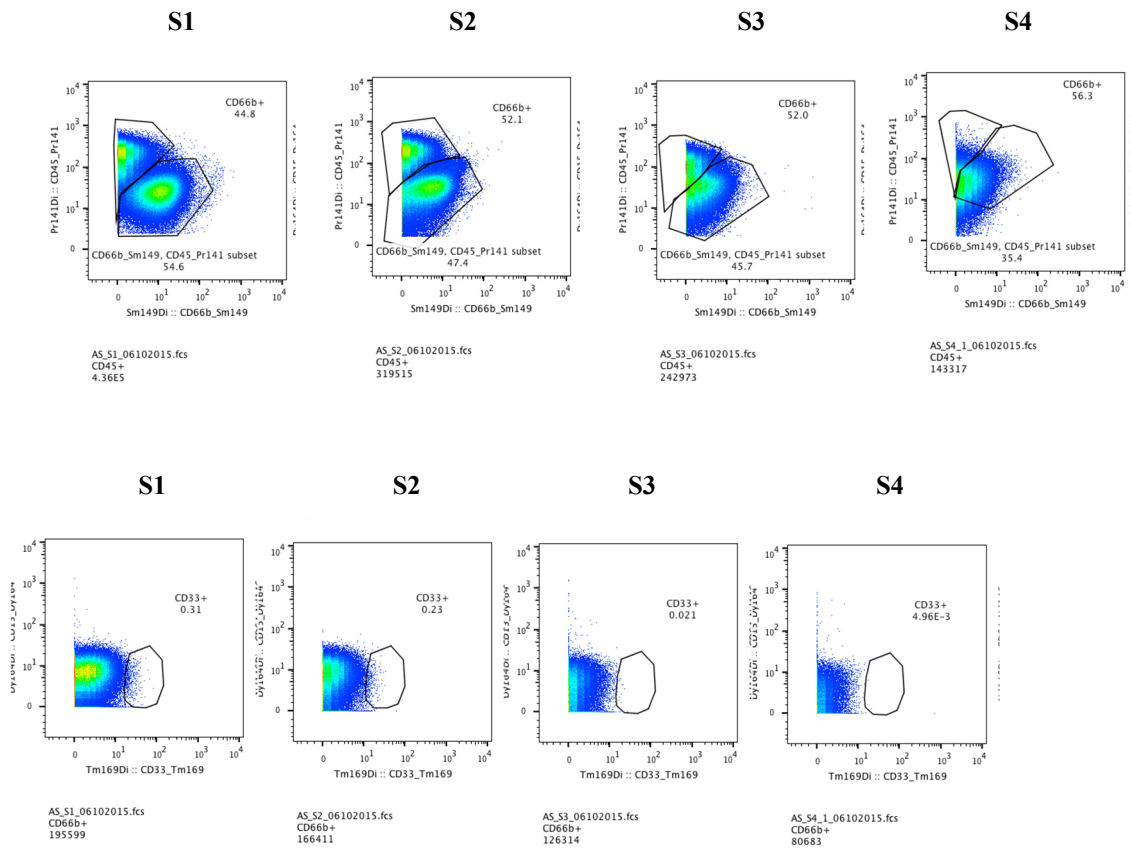
Unter der Annahme eines Verlustes der Oberflächensignale entweder durch den Schritt der Fixierung oder durch die Permeabilisierung wurde eine Neukonzeption des vorliegenden DVS-Protokolls notwendig, um den methodenbedingten Einfluss auf die Ergebnisse zu minimieren.

In einem ersten Schritt (Basic Troubleshoot) wurden 4 verschiedene Ansätze einander gegenübergestellt:

1. Oberflächenfärbung mit folgender Fixierung in PFA 4% (S1)
2. Oberflächenfärbung mit folgender Fixierung in Fix1® (S2)
3. Oberflächenfärbung mit folgender Fixierung in Fix1® und Permeabilisierung in PermS® (S3)
4. Oberflächenfärbung mit folgender Fixierung in 1% PFA und Permeabilisierung in Saponin 0,3% sowie intrazelluläre Färbung mit TNF $\alpha$  (S4)

Die Proben stammten von einem HD und wurden im Vorfeld nicht stimuliert. Die übrigen Schritte des DVS-Protokolls inklusive der Aufbereitung der Zellen, Live-Dead-Färbung, Iridium-DNA-Färbung und die wiederholten Waschschrirte wurden unverändert belassen. Allerdings erfolgte die Iridium-Intercalator Färbung in Saponin 0,3% und nicht in dem Puffer FixandPerm®.

Die Abb. 7-10 zeigen den Einfluss der verschiedenen Fixierungsmethoden und der Permeabilisierung auf die Oberflächensignale. Verwendet wurde das gesamte Panel der Oberflächenmarker. Ziel war es zu differenzieren, welcher Schritt explizit zu dem Verlust der Oberflächensignale führt und wie groß der Einfluss unterschiedlicher Substanzen zur Fixierung und Permeabilisierung auf das Ergebnis ist.



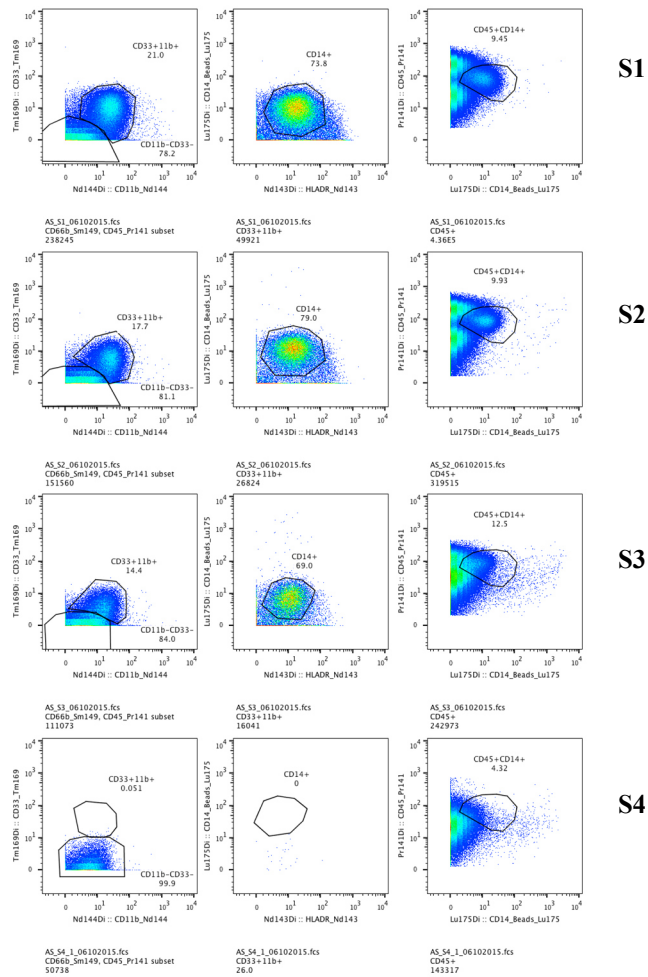
**Abb. 7** Granulozyten-Differenzierung. Gegenüberstellung CD45+ und CD66b (oben) und weitere Differenzierung der CD66b+-Zellen durch Gegenüberstellung CD15 und CD33 (unten).

S1: Oberflächenfärbung und Fixierung in 4% PFA.

S2: Oberflächenfärbung und Fixierung in Fix1.

S3: Oberflächenfärbung, Fixierung in Fix1® und Permeabilisierung mit PermS®.

S4: Oberflächenfärbung, Fixierung in 1% PFA, Permeabilisierung mit Saponin 0,3% und intrazelluläre Färbung mit TNFα.



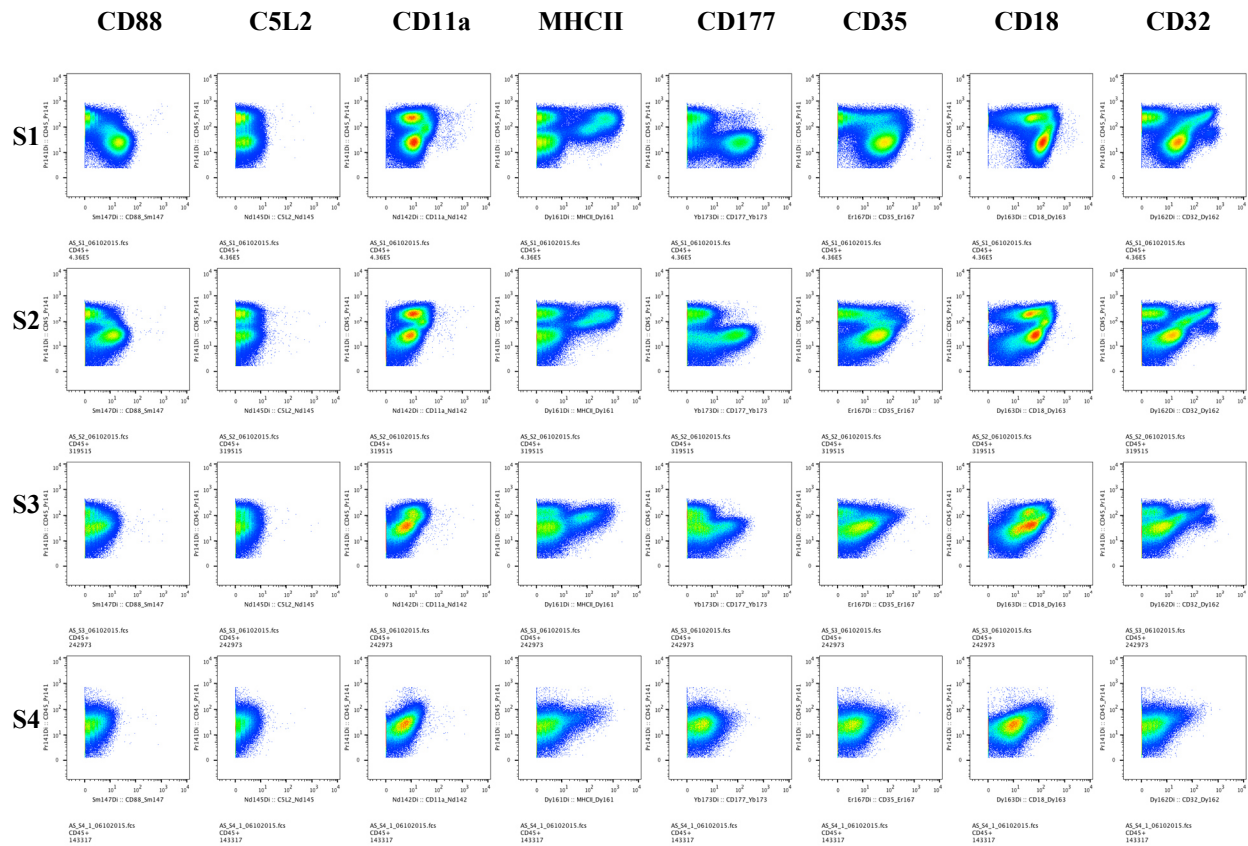
**Abb. 8** Monozyten-Differenzierung. Darstellung CD33 gegen CD11b (links), folgend CD14 gegen HLADR der CD33+CD11b+-Population (Mitte), CD45 gegen CD15 der CD45+-Zellen (rechts).

S1: Oberflächenfärbung und Fixierung in 4% PFA.

S2: Oberflächenfärbung und Fixierung in Fix1®.

S3: Oberflächenfärbung, Fixierung in Fix1® und Permeabilisierung mit PermS®.

S4: Oberflächenfärbung, Fixierung in 1% PFA, Permeabilisierung mit Saponin 0,3% und intrazelluläre Färbung mit TNFα.



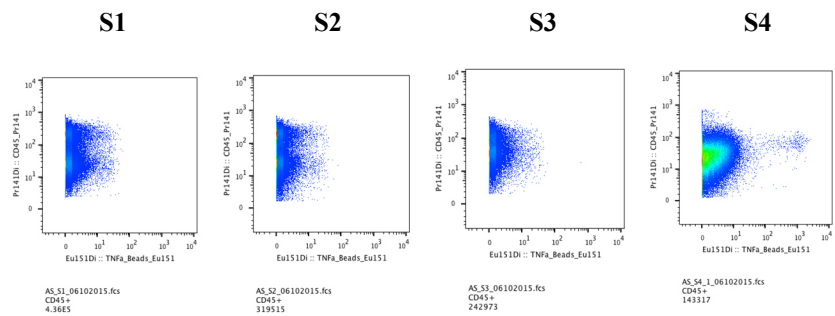
**Abb. 9** Marker CD88, C5L2, CD11a, MHCII, CD177, CD35, CD18 und CD32 auf CD45<sup>+</sup>-Zellen.

S1: Oberflächenfärbung, Fixierung in 4% PFA.

S2: Oberflächenfärbung und Fixierung in Fix1®.

S3: Oberflächenfärbung, Fixierung in Fix1® und Permeabilisierung mit PermsS®.

S4: Oberflächenfärbung, Fixierung in 1% PFA, Permeabilisierung mit Saponin 0,3% und intrazelluläre Färbung mit TNFα.



**Abb. 10** Darstellung von TNF $\alpha$  in CD45 $^{+}$ -Zellen.

*S1: Oberflächenfärbung und Fixierung in 4% PFA.*

*S2: Oberflächenfärbung und Fixierung in Fix1®.*

*S3: Oberflächenfärbung, Fixierung in Fix1® und Permeabilisierung mit PermS®.*

*S4: Oberflächenfärbung, Fixierung in 1% PFA, Permeabilisierung mit Saponin 0,3% und intrazelluläre Färbung mit TNF $\alpha$ .*

Zusammenfassend ließ sich darstellen, dass der Verlust der Oberflächensignale durch den Schritt der Permeabilisierung -sowohl mit PermS® als auch 0,3% Saponin -generiert wird. Bei rein visueller Auswertung zeigten sich die Ergebnisse nach der Fixierung mit 4% PFA und der mit Fix1® vergleichbar, wobei die wenigsten Verluste und die bessere Differenzierung zwischen den Populationen am ehesten durch den Einsatz von 4% PFA zur Fixierung zu erzielen waren.

Zudem wurde am Beispiel des TNF $\alpha$  demonstriert, dass die Permeabilisierung -zumindest mit Saponin 0,3%- suffizient genug erscheint für eine intrazelluläre Färbung. Allerdings muss hierbei auch die Möglichkeit einer unspezifischen Bindung diskutiert werden.

### 3.1.2 Troubleshoot 1: Vergleich unterschiedlicher Fixierungs- und Permeabilisierungsmethoden

Auf die Ergebnisse des Basic Troubleshoot stützend mussten folgend die Fragen geklärt werden, ob eine Optimierung des Fixierungsschrittes und eine damit einhergehende bessere Stabilisierung der Zelloberfläche einen günstigen Effekt auf den durch die Permeabilisierung hervorgerufenen Verlust der Oberflächensignale erzielt und ob eine Verdünnung der permeabilisierenden Substanzen PermS® und Saponin diesen Verlust minimiert. Des Weiteren wurde erneut die Fixierung mittels 4% PFA und Fix1® verglichen.

Zur Optimierung des Fixierungsschrittes wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein längerer Verbleib der Zellen im entsprechenden Fixiermedium z.B. über die Nacht (overnight Fixierung) eine bessere Stabilität der Oberfläche bewirken könnte. Eine stabilere Zelloberfläche ihrerseits könnte mutmaßlich den Prozess der Porenbildung im Zuge der Permeabilisierung dahingehend begünstigen, dass weniger Oberflächenmarker verloren gehen.

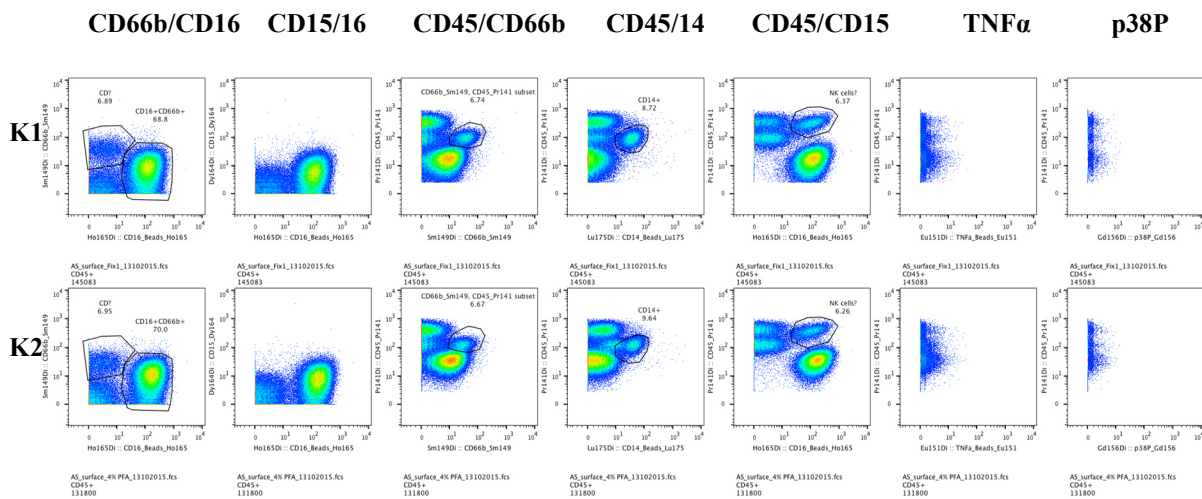
Das Experiment inkludierte insgesamt 10 Proben unterteilt in zwei Gruppen. In der ersten Gruppe erfolgte die Fixierung mit 4% PFA und in der zweiten mit Fix1®. Der restliche Aufbau der 5 Proben blieb zwischen den Gruppen identisch:

1. Kontrolle: Oberflächenfärbung mit folgender Fixierung mit PFA 4% bzw. Fix1® über Nacht
2. S1: Oberflächenfärbung mit folgender Fixierung mit PFA 4% bzw. Fix1® über Nacht, am Folgetag intrazelluläre Färbung und Iridium-Intercalator Färbung in Saponin 0,3%
3. S2: Oberflächenfärbung mit folgender Fixierung mit PFA 4% bzw. Fix1® über Nacht, am Folgetag intrazelluläre Färbung und Iridium-Intercalator Färbung in Saponin 0,1%
4. S3: Oberflächenfärbung mit folgender Fixierung mit PFA 4% bzw. Fix1®, am selben Tag intrazelluläre Färbung in PermS® und über Nacht Lagerung im Nährmedium CSM, am Folgetag Iridium-Intercalator Färbung in Saponin 0,3%
5. S4: Oberflächenfärbung mit folgender Fixierung mit PFA 4% bzw. Fix1®, am selben Tag intrazelluläre Färbung in 1:3 verdünntem PermS® und über Nacht Lagerung im Nährmedium CSM, am Folgetag Iridium-Intercalator Färbung in Saponin 0,3%



Das Blut stammte von einem HD und die Zellen wurden im Verlauf nicht stimuliert. Um den Verbrauch der metallkonjugierten Antikörper gering zu halten, kam nicht das gesamte Panel zum Einsatz. Auf Seiten der Oberflächenmarker gingen CD45, CD66b, CD14, CD15 und CD16 in das Experiment mit ein. Zur intrazellulären Färbung wurden TNF $\alpha$  und p38P verwendet. Die Iridium-Intercalator-Färbung erfolgte bei allen Proben am Folgetag (Kontrollen 0,3% Saponin, die übrigen Proben entsprechend ihrer Gruppierung).

Abb. 11-13 zeigen die Ergebnisse der anschließenden Auswertung mittels CyTOF.



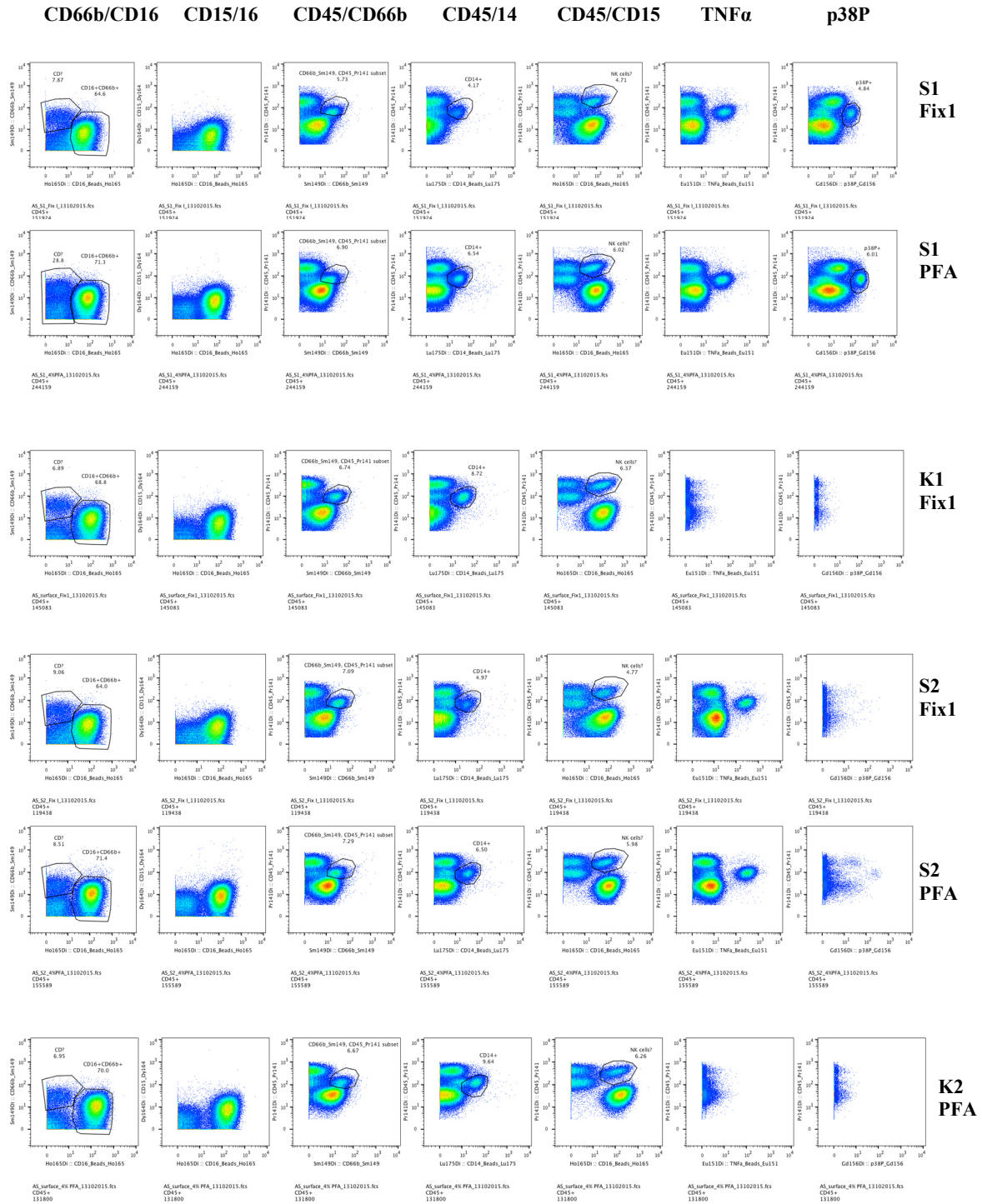
**Abb. 11** Vergleich zwischen PFA 4% und Fix1 $\text{\textcircled{R}}$  anhand der Kontroll-Oberflächenfärbungen. Darstellung erfolgte auf CD45 $^{+}$ -Zellen. Von links nach rechts: CD66b gegen CD15, CD15 gegen CD16, CD45 gegen CD14, CD45 gegen TNF $\alpha$  und CD45 gegen p38P.

K1: Oberflächenfärbung und Fix1 $\text{\textcircled{R}}$  über Nacht.

K2: Oberflächenfärbung und PFA 4% über Nacht.

Da die Kontrollproben weder permeabilisiert noch intrazellulär gefärbt wurden, war das fehlende Signal für die intrazellulären Marker TNF $\alpha$  und p38P zu erwarten und dient als Kontrolle für die übrigen Proben.

Anhand der Analyse zeigte sich kein gravierender Unterschied der Oberflächensignale nach der Fixierung mit PFA 4% über Nacht und der mit Fix1®. Bei der Anwendung von PFA 4% ließ sich eine visuell diskret bessere Differenzierung einzelner Populationen mutmaßen, wie das Gating CD66b/CD16 oder CD15/CD16 demonstriert. Ein signifikanter Verlust an Oberflächensignalen konnte bei beiden Methoden nicht beobachtet werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus dem Basic Troubleshoot.



**Abb. 12** Vergleich der Permeabilisierung mit Saponin 0,3% (S1) und Saponin 0,1% (S2). In Gegenüberstellung mit der jeweiligen Kontroll-Oberflächenfärbung und der vorhergehenden Fixierung entweder Fix1® (S1/S2 Fix1) oder PFA 4% (S1/S2 PFA).

*S1 Fix1: Oberflächenfärbung, Fix1® über Nacht, intrazelluläre Färbung in Saponin 0,3%.*

*S1 PFA: Oberflächenfärbung, PFA 4% über Nacht, intrazelluläre Färbung in Saponin 0,3%.*

*K1 Fix1: Oberflächenfärbung und Fixierung in Fix1® über Nacht.*

*S2 Fix1: Oberflächenfärbung, Fix1® über Nacht, intrazelluläre Färbung in Saponin 0,1%.*

*S2 PFA: Oberflächenfärbung, PFA 4% über Nacht, intrazelluläre Färbung in Saponin 0,1%.*

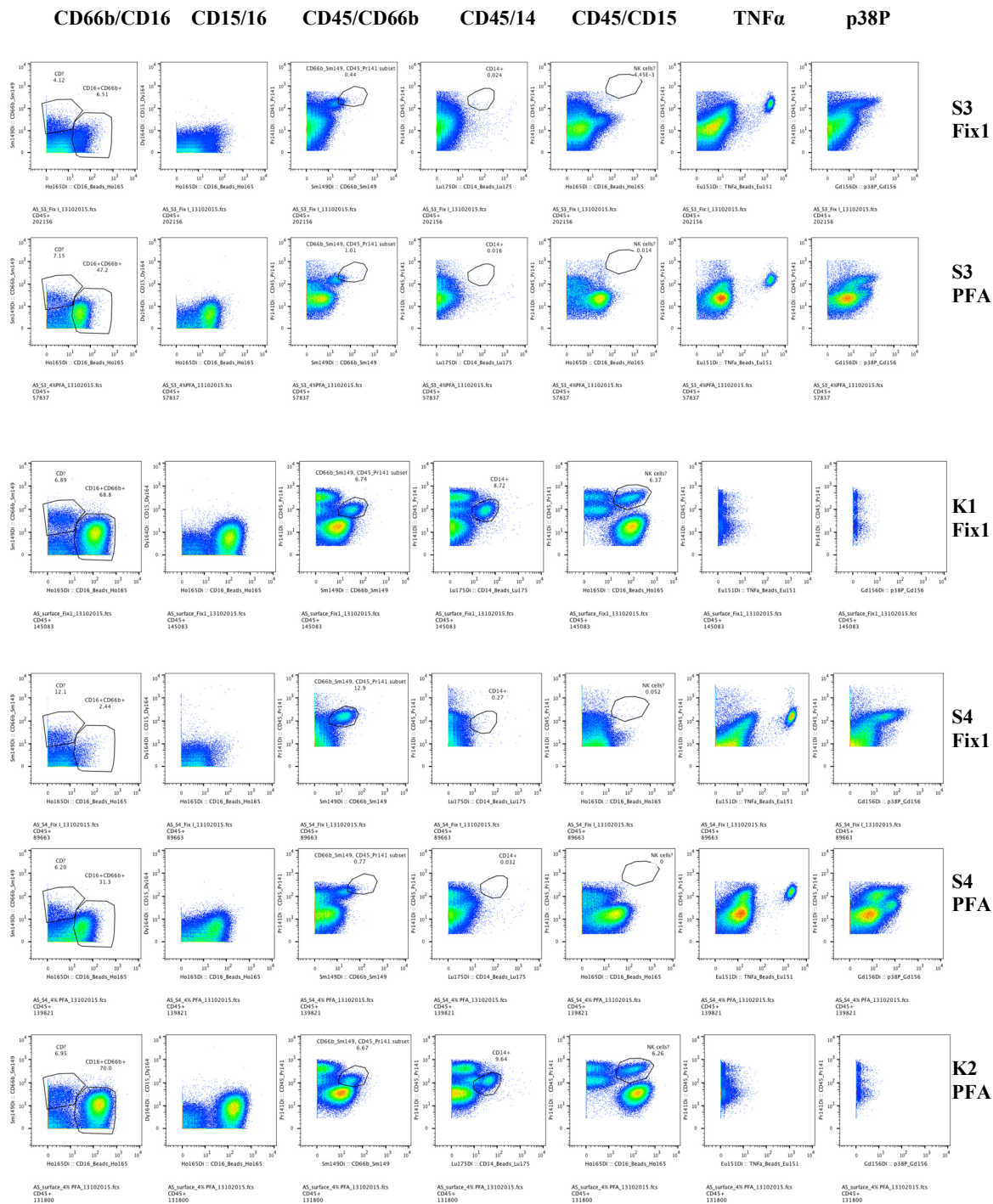
*K2 PFA: Oberflächenfärbung und Fixierung in PFA 4% über Nacht.*

Ähnliche Resultate ergaben sich auch aus der Analyse des Vergleiches der Permeabilisierung mit Saponin 0,3% und Saponin 0,1%. Die vorhergehende Fixierung mit PFA 4% schien um Nuancen der Fixierung mit Fix1® überlegen. Ein deutlicher, relevanter Unterschied konnte jedoch nicht detektiert werden.

Bezogen auf die Oberflächensignale und die Wahl des permeabilisierenden Mediums zeigten sich Hinweise auf eine leichte Überlegenheit der Permeabilisierung mit Saponin 0,1% im Sinne einer „reineren“ Diskrimination zwischen den Zellpopulationen. Auffällig war jedoch das fehlende Signal für den intrazellulären Marker p38P in den mit Saponin 0,1% permeabilisierten Proben. Hierbei könnte eine insuffiziente Porenbildung durch Saponin 0,1% diskutiert werden.

Festzuhalten ist, dass bei beiden Methoden kein signifikanter Signalverlust der Oberflächenmarker zu verzeichnen war. Die Ergebnisse aus dem Basic Troubleshoot heranziehend könnte das im Kontext der längeren Fixierung gewertet werden, wobei das Fixiermedium (PFA 4% oder Fix1®) an sich keine große Relevanz hat.

Die folgenden Abb. demonstrieren zum Vergleich die Permeabilisierung mit PermS® und PermS® 1:3 verdünnt.



**Abb. 13** Vergleich der Permeabilisierung mit PermS® (S3) und PermS® 1:3 verdünnt (S4). In Gegenüberstellung mit der jeweiligen Kontroll-Oberflächenfärbung und der vorhergehenden Fixierung entweder Fix1® (S3/S4 Fix1) oder PFA 4% (S3/S4 PFA).

*S3 Fix1: Oberflächenfärbung, Fix1, intrazelluläre Färbung in PermS®, Zellen in CSM über Nacht.*

*S3 PFA: Oberflächenfärbung, PFA 4%, intrazelluläre Färbung in PermS®, Zellen in CSM über Nacht.*

*K1 Fix1: Oberflächenfärbung und Fix1® über Nacht.*

*S4 Fix1: Oberflächenfärbung, Fix1®, intrazelluläre Färbung in 1:3 PermS®, Zellen in CSM über Nacht.*

*S4 PFA: Oberflächenfärbung, PFA 4%, intrazelluläre Färbung in 1:3 PermS®, Zellen in CSM über Nacht.*

Bei diesen Proben zeigte sich ein visuell deutlicher Verlust der Oberflächensignale im Vergleich zu den Kontrollproben und der Permeabilisierung mit Saponin. Die Verdünnung von PermS® erbrachte keinen positiven Effekt auf den Erhalt der Oberfläche. Auch hier kann eine leichte Überlegenheit der vorhergehenden Fixierung in PFA 4% diskutiert werden, allerdings ohne einen für die Fragestellung relevanten Einfluss.

Bezüglich der intrazellulären Marker könnte eine bessere Signalauserschöpfung von TNF $\alpha$  durch die Anwendung von PermS® im Vergleich zu Saponin in Betracht gezogen werden. Allerdings ist die Möglichkeit einer unspezifischen Bindung nicht sicher auszuschließen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Fixierung über Nacht und die Permeabilisierung mit Saponin 0,3% im Vergleich zu den anderen Ansätzen sowohl einen Verlust der Oberflächenmarker minimiert als auch eine Darstellung der intrazellulären Marker zu ermöglichen scheint. Unklar blieb, ob der Oberflächensignalverlust in den Ansätzen mit PermS® tatsächlich dem permeabilisierenden Medium geschuldet ist oder der kürzeren Fixierungsdauer und dem Verbleib der Zellen in CSM über Nacht.

### 3.1.3 Troubleshoot 2: Kontrolle des Einflusses der Fixierungsdauer

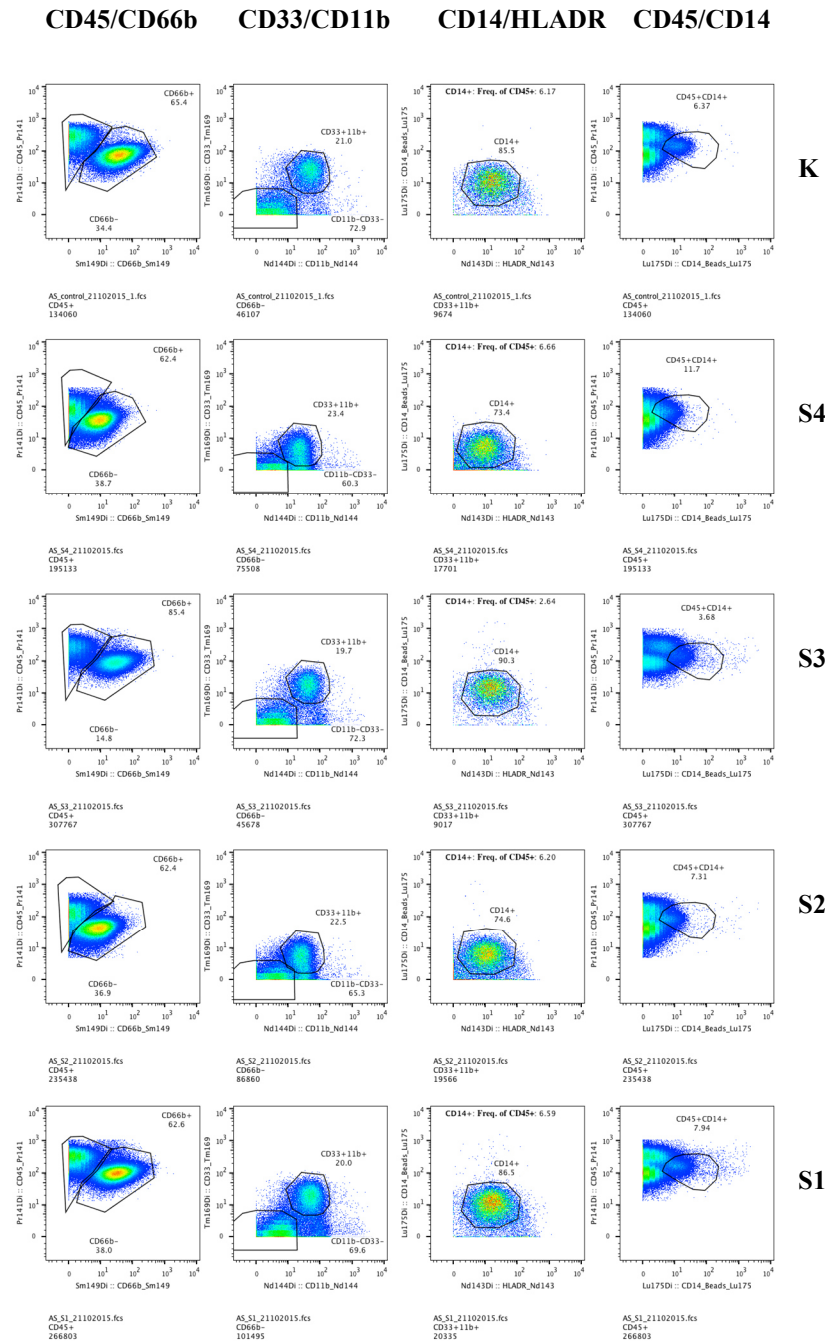
Der Versuch diente der Analyse des Einflusses der Fixierung über Nacht auf den Erhalt der Oberflächensignale. In diesem Zusammenhang sollte überprüft werden, ob eine Fixierung über Nacht und eine Permeabilisierung mit PermS® am Folgetag weiterhin zu einem Oberflächensignalverlust führt oder die bestmögliche Balance zwischen der Darstellung der Oberflächenmarker und der der intrazellulären Marker bietet.

Hierfür wurden die Zellen in 5 Proben aufgeteilt:

1. Oberflächenfärbung mit folgender Fixierung in PFA 4% über Nacht (Kontrolle)
2. Oberflächenfärbung mit folgender Fixierung in PFA 4% über Nacht, intrazelluläre Färbung in Saponin 0,3% am Folgetag (S1)
3. Oberflächenfärbung mit folgender Fixierung in PFA 4%, anschließend intrazelluläre Färbung in Saponin 0,3% und Lagerung der Zellen in CSM über Nacht(S2)
4. Oberflächenfärbung mit folgender Fixierung in PFA 4% über Nacht, intrazelluläre Färbung in PermS® am Folgetag (S3)
5. Oberflächenfärbung mit folgender Fixierung in PFA 4%, anschließend intrazelluläre Färbung in PermS® und Lagerung der Zellen in CSM über Nacht(S4)

Das Blut entstammte einem HD und sowohl die Kontrollen als auch die Ansätze S1 bis S4 wurden im Vorfeld mit TNF $\alpha$  stimuliert. Zum Einsatz kam das gesamte Panel der Oberflächen- und intrazellulären Antikörper, bis auf p38P. Die Markierung der DNA mittels des Iridium-Intercalators erfolgte bei allen 5 Proben in Saponin 0,3% am Folgetag.

Die Ergebnisse der CyTOF-Analyse sind in den Abb. 14 – 16 dargestellt.



**Abb. 14** Kontrolle des Einflusses der Fixierung über Nacht auf die Permeabilisierung mit Saponin 0,3% und PermS®. Darstellung von links nach rechts: CD45/CD66b der CD45+-Zellen, CD33/CD11b der CD45+CD66b--Zellen, CD14/HLADR der CD33+CD14+-Zellen, CD45/CD14 der CD45+-Zellen.

*K: Kontrolle.*



*S4: Oberflächenfärbung, PFA 4%, intrazelluläre Färbung in PermS® am selben Tag, Zellen in CSM über Nacht.*

*S3: Oberflächenfärbung und Fixierung in PFA 4% über Nacht, intrazelluläre Färbung am Folgetag in PermS®.*

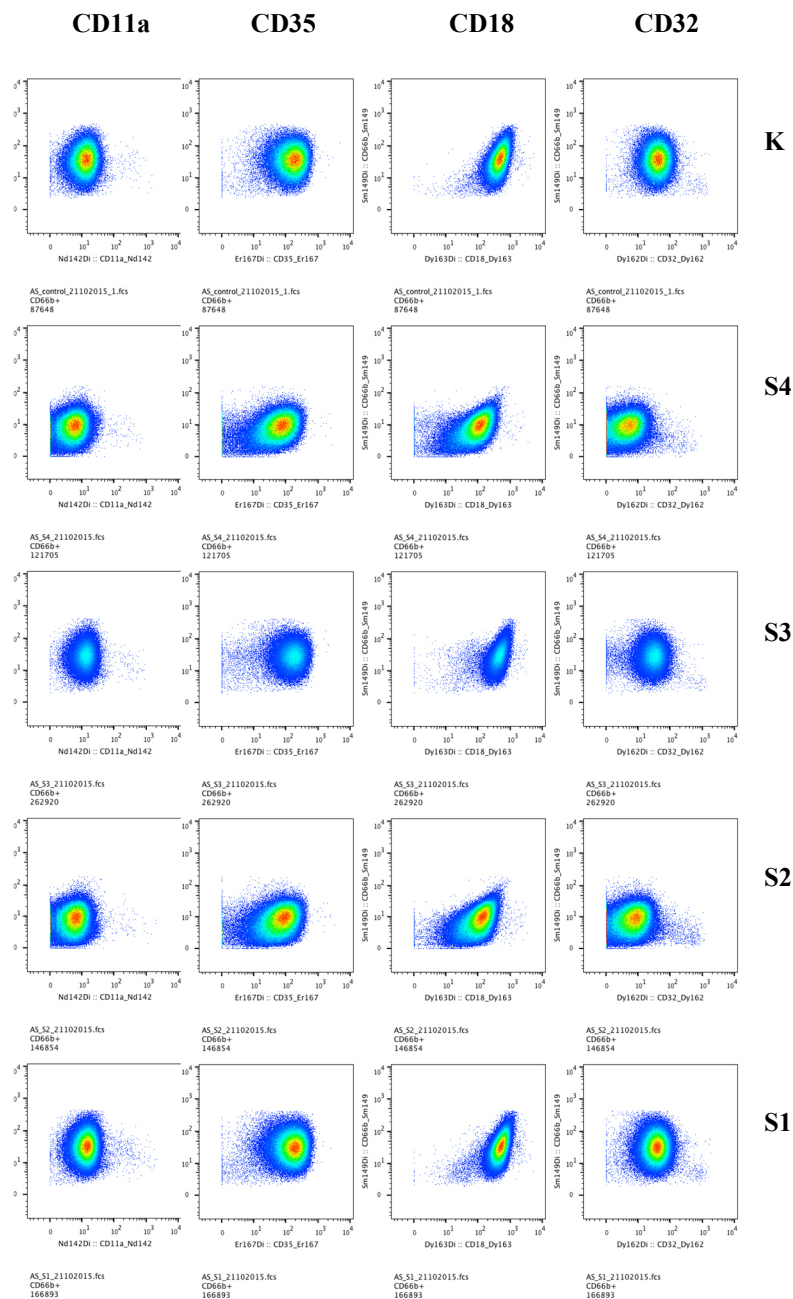
*S2: Oberflächenfärbung, PFA 4%, intrazelluläre Färbung in Saponin 0,3% am selben Tag, Zellen in CSM über Nacht.*

*S1: Oberflächenfärbung und Fixierung in PFA 4% über Nacht, intrazelluläre Färbung am Folgetag in Saponin 0,3%.*

Anhand des Experiments ließ sich ein günstiger Effekt der über Nacht Fixierung auf den Erhalt der Oberflächensignale der Zellen feststellen. Dies galt sowohl für die Proben der Permeabilisierung mit Saponin 0,3% als auch für die der Permeabilisierung mit PermS®. Der Einfluss zeigt sich in Abb. 15 u.a. an den Markern CD66b, CD33, CD11b und CD14. Aber auch weitere Oberflächenmarker wie CD11a, CD35, CD18 und CD32 verhielten sich in der Analyse ähnlich (Abb. 15).

Auf die Eingangsfrage bezugnehmend scheint somit nicht das permeabilisierende Medium, sondern die Dauer der Fixierung begünstigend zu wirken.

Die Analyse der intrazellulären Marker ergab zum einen, dass eine Darstellung sowohl nach der Permeabilisierung mit Saponin 0,3% als auch mit PermS® prinzipiell möglich ist. Allerdings wiesen die Marker IL17A und IL17F sowie AktP insgesamt erhebliche Limitationen auf (Abb. 16).



**Abb. 15** Zusätzliche Darstellung der Kontrolle der Fixierung über Nacht. Marker CD11a, CD35, CD18 und CD32 auf CD45+CD66b+-Zellen.

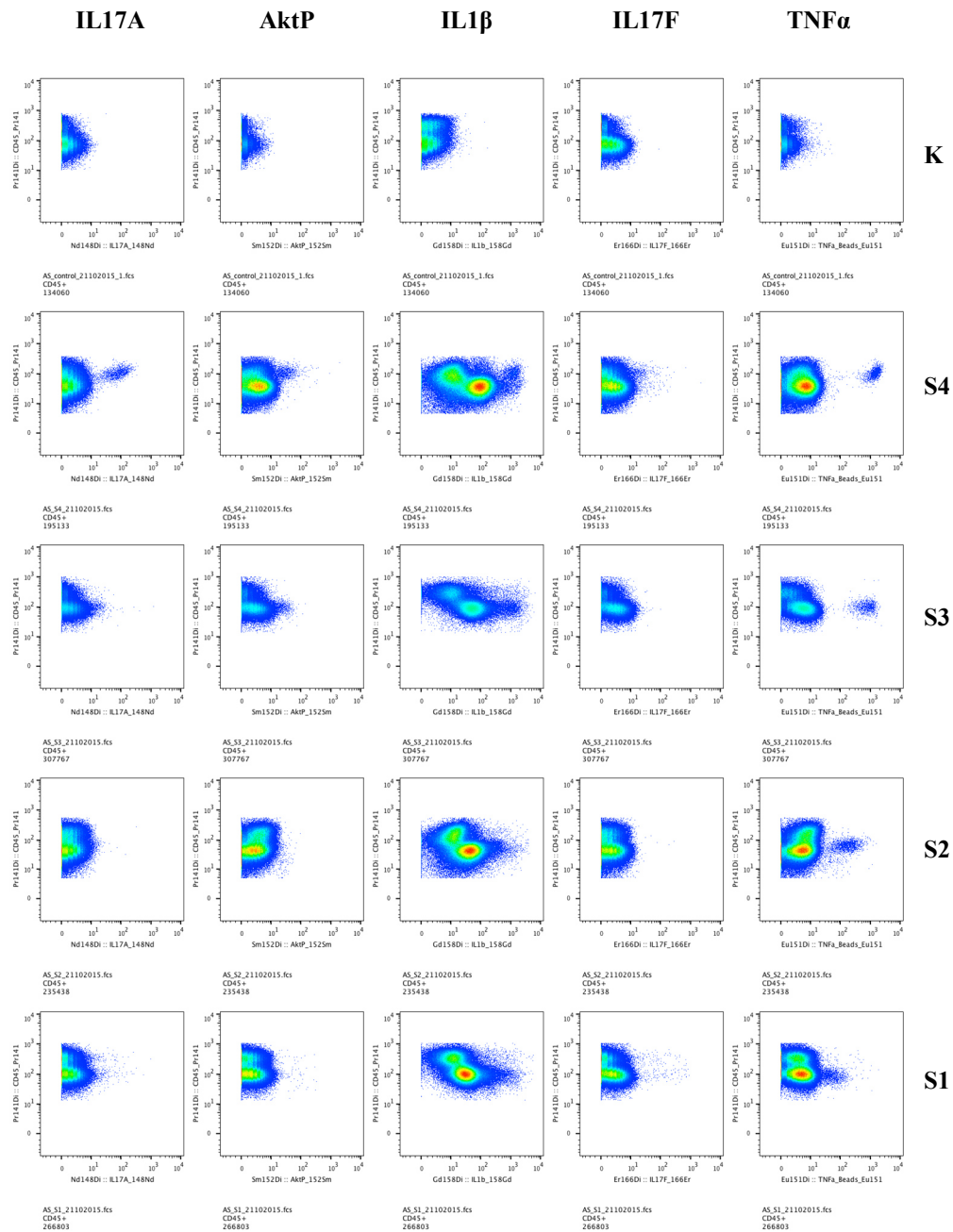
*K:* Kontrolle.

*S4:* Oberflächenfärbung, PFA 4%, intrazelluläre Färbung in PermS® am selben Tag, Zellen in CSM über Nacht.

*S3: Oberflächenfärbung und Fixierung in PFA 4% über Nacht, intrazelluläre Färbung am Folgetag in PermS®.*

*S2: Oberflächenfärbung, PFA 4%, intrazelluläre Färbung in Saponin 0,3% am selben Tag, Zellen in CSM über Nacht.*

*S1: Oberflächenfärbung und Fixierung in PFA 4% über Nacht, intrazelluläre Färbung am Folgetag in Saponin 0,3%.*



**Abb. 16** Analyse der intrazellulären Marker auf CD 45+-Zellen bei unterschiedlicher Fixierungsdauer.

*K:* Kontrolle.

*S4:* Oberflächenfärbung, PFA 4%, intrazelluläre Färbung in PermS® am selben Tag, Zellen in CSM über Nacht.

*S3: Oberflächenfärbung und Fixierung in PFA 4% über Nacht, intrazelluläre Färbung am Folgetag in PermS®.*

*S2: Oberflächenfärbung, PFA 4%, intrazelluläre Färbung in Saponin 0,3% am selben Tag, Zellen in CSM über Nacht.*

*S1: Oberflächenfärbung und Fixierung in PFA 4% über Nacht, intrazelluläre Färbung am Folgetag in Saponin 0,3%.*

### 3.1.4 Troubleshoot 3: Kontrolle des Original-DVS-Protokolls inklusive FixandPerm®

Zu Beginn der Versuche mit dem Original-DVS-Protokoll wurden bis auf die Iridium-Intercalator Färbung alle Schritte entsprechend den Instruktionen des Protokolls befolgt. Der letzte Schritt der DNA-Markierung erfolgte initial allerdings nicht in dem Medium FixandPerm® (DVS-Protokoll), sondern alternativ mit Saponin 0,3%. Im Zuge der Protokolloptimierung sollte nun das vollständige DVS-Protokoll den alternativen Ansätzen gegenübergestellt werden.

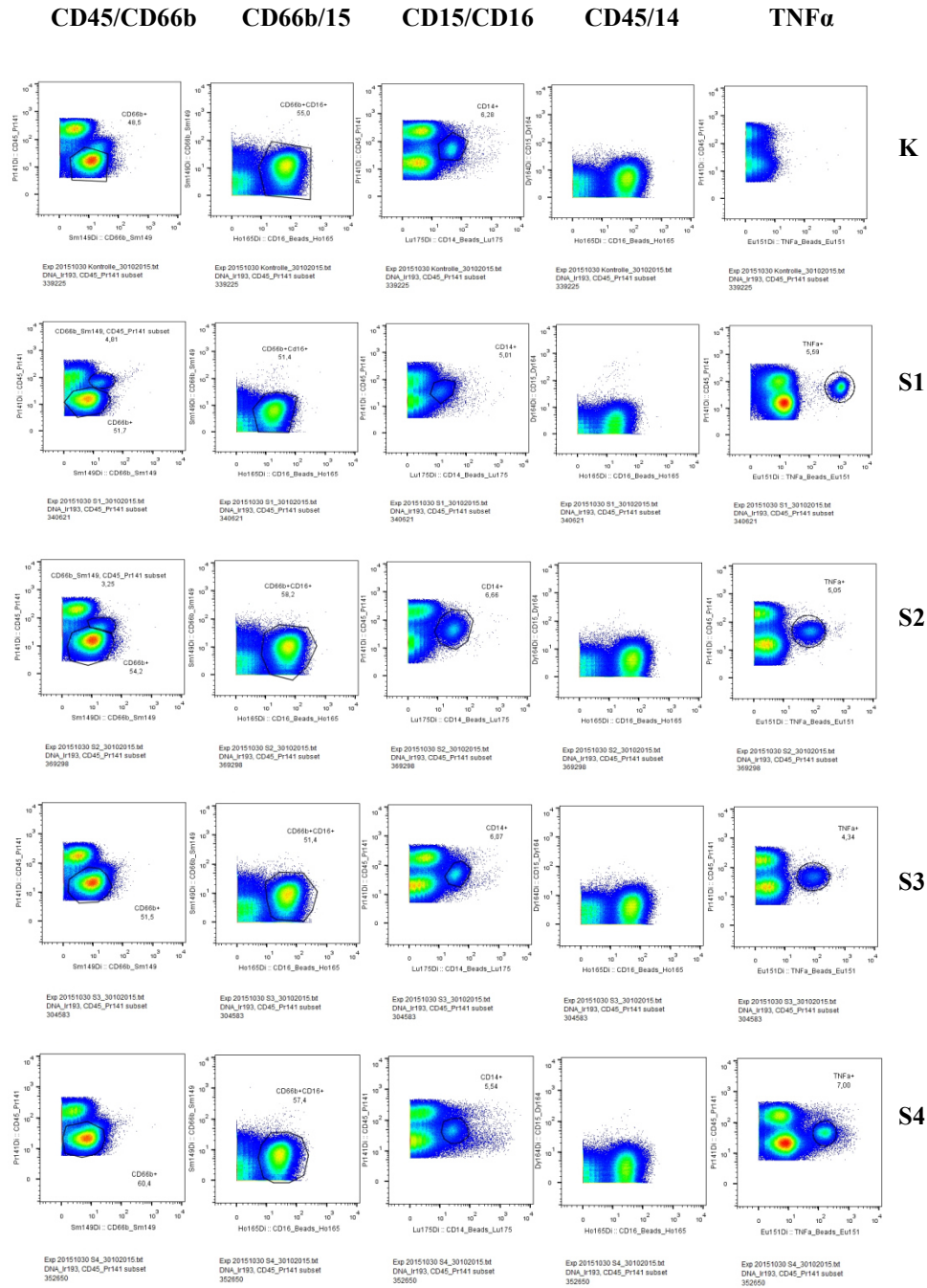
Des Weiteren wurde überprüft, ob eine parallele Applikation der intrazellulären Marker und des Iridium-Intercalators die Ergebnisse alteriert.

Der Versuchsaufbau sah wie folgt aus:

1. Oberflächenfärbung mit folgender Fixierung in PFA 4% über Nacht (Kontrolle)
2. Oberflächenfärbung mit folgender Fixierung in Fix1®, anschließend intrazelluläre Färbung in PermS®, dann Iridium-Intercalator in FixandPerm® über Nacht (DVS-Protokoll, S1)
3. Oberflächenfärbung mit folgender Fixierung in PFA 4% über Nacht, intrazelluläre Färbung in 0,3% Saponin am Folgetag, dann Iridium-Intercalator in 0,3% Saponin (S2)
4. Oberflächenfärbung mit folgender Fixierung in PFA 4% über Nacht, intrazelluläre und Iridium-Intercalator Färbung in 0,3% Saponin am Folgetag (S3)
5. Oberflächenfärbung mit folgender Fixierung in Fix1®, anschließend intrazelluläre Färbung in Saponin 0,3%, dann Iridium-Intercalator in FixandPerm® über Nacht (S4)

Das Zellmaterial kam -wie in den Troubleshoots zuvor- von einem HD. Auf eine Stimulation wurde verzichtet. Als Oberflächenmarker gingen CD45, CD66b, CD14, CD15, CD16 und als intrazellulärer Marker TNF $\alpha$  in das Experiment mit ein.

Abb. 17 demonstriert die Resultate des Protokollvergleichs.



**Abb. 17** Vergleich des Original-DVS-Protokolls mit den alterierten Protokollen. Vergleich erfolgte auf den CD45<sup>+</sup>-Zellen, von links nach rechts: CD45/CD66b, CD66b/15, CD15/CD16, CD45/CD14, CD45/TNF $\alpha$ .

*K*: Oberflächenfärbung und Fixierung in PFA 4% über Nacht.

*S1*: DVS-Protokoll mit FixandPerm® über Nacht.

*S2: Oberflächenfärbung und Fixierung in PFA 4% über Nacht, intrazelluläre Färbung in Saponin 0,3% am Folgetag, Iridium-Intercalator in Saponin 0,3%.*

*S3: Oberflächenfärbung und PFA 4% über Nacht, intrazelluläre und Iridium-Färbung in Saponin 0,3% am Folgetag.*

*S4: Oberflächenfärbung und Fixierung in PFA 4%, intrazelluläre Färbung in Saponin 0,3%, Iridium-Intercalator in FixandPerm® über Nacht.*

Wie die Ergebnisse belegen, ist eine parallele Inkubation der Zellen in dem intrazellulären Antikörpermix und der Iridium-Intercalator-Lösung möglich. Allerdings zeigte sich im Basis-Gating eine Abnahme des Iridium-Signals, sodass in den folgenden Experimenten davon Abstand genommen wurde.

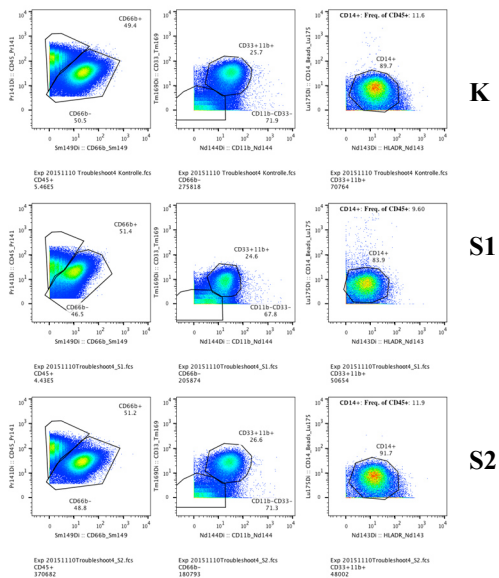
Die Hinzunahme von FixandPerm® und die Inkubation der Zellen darin (in einer FixandPerm®-Iridium-Intercalator solution, Original-DVS-Protokoll) über Nacht führten im Vergleich zu den ersten Versuchen zu einer Reduktion des Oberflächensignalverlustes. Allerdings implizieren die Ergebnisse doch eine leichte Überlegenheit der Permeabilisierung mit Saponin 0,3% und der zeitlichen Trennung der Oberflächen- und intrazellulären Färbung bezogen auf den Erhalt der Oberflächenmarker (Saponin-Methode, S2), zumindest für das Gating CD45/CD66b. Auch zeigte das Original-DVS-Protokoll in Hinblick auf die Oberflächensignale das schlechtere Ergebnis, allerdings mit nur geringem Abstand zu den alterierten Methoden.

Bemessen an dem intrazellulären Signal von TNF $\alpha$  ließen sich mit dem DVS-Protokoll und auch mit der Variante 4 (S4) gute Resultate erzielen. Im Vergleich zu den beiden anderen Methoden erreichten sie die stärkere intrazelluläre Färbung. Wobei sich die Frage stellt, ob das einen Effekt der kürzeren Fixierung in PFA 4% widerspiegelt.



### 3.1.5 Troubleshoot 4: Vergleich DVS-Protokoll und Saponin-Methode

Im folgenden Experiment wurden das Original-DVS-Protokoll und die Saponin-Methode in Bezug auf das gesamte Panel der Oberflächen- und intrazellulären Marker gegenübergestellt (Abb. 18-20). Zudem wurden die Zellen im Vorfeld mit TNF $\alpha$  stimuliert.

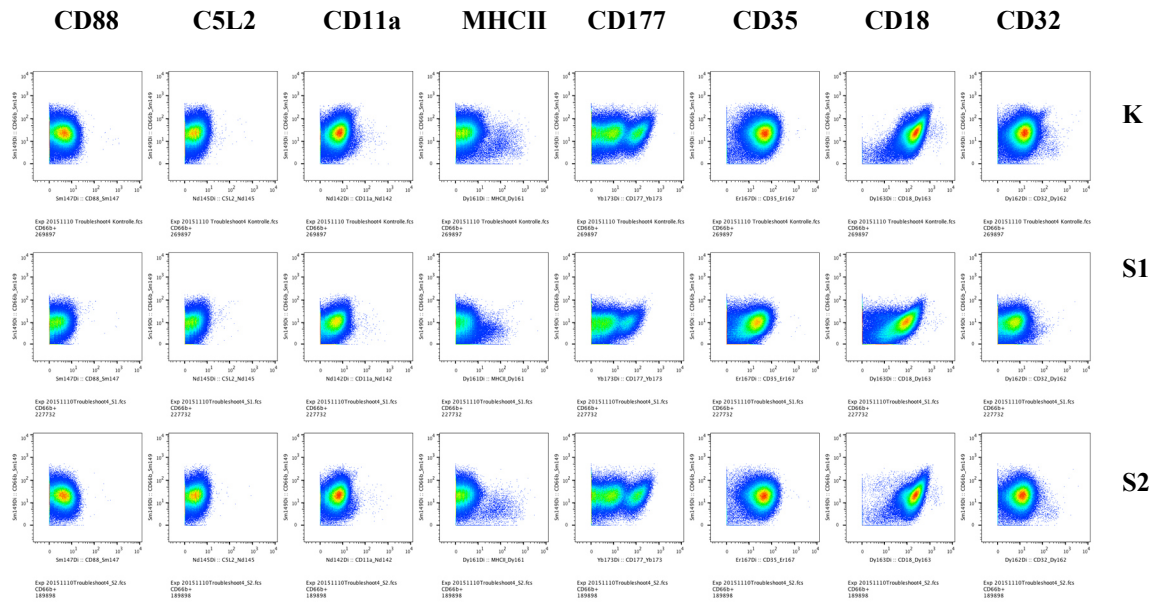


**Abb. 18** Vergleich DVS-Protokoll und Saponin-Methode. Darstellung von links nach rechts: CD45/CD66b auf CD45+ Zellen, CD33/ CD11b auf CD66b- Zellen, CD14/HLADR auf CD33+CD11b+ Zellen.

*K*: Kontrolloberflächenfärbung.

*S1*: DVS-Protokoll.

*S2*: Saponin-Methode.

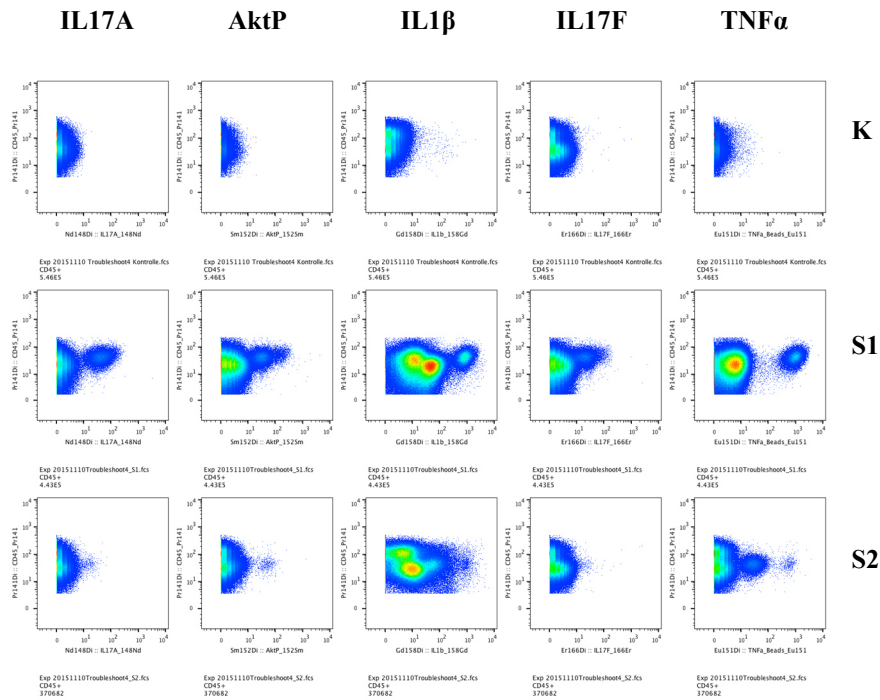


**Abb. 19** Zusätzliche Darstellung der Oberflächenmarker auf den CD66b+ Zellen im Vergleich DVS-Protokoll und Saponin-Methode.

*K: Kontrolloberflächenfärbung.*

*S1: DVS-Protokoll.*

*S2: Saponin-Methode.*



**Abb. 20** Intrazelluläre Marker auf CD45+ Zellen im Vergleich DVS-Protokoll und Saponin-Methode.  
*K: Kontrolloberflächenfärbung.*

*S1: DVS-Protokoll.*

*S2: Saponin-Methode.*

Bei Anwendung des Original-DVS-Protokolls auf das gesamte Panel der Oberflächen-Antikörper und intrazellulären Marker zeigten sich –in Korrelation mit den Versuchen zuvor– eine schlechtere Differenzierung des Gating CD45/CD66b und ein schwächeres Signal für die Oberflächenmarker CD33, HLADR, CD88, CD11a, CD35, CD18 und CD32. Allerdings fielen die Unterschiede im Vergleich zu den anfänglichen Versuchen geringer aus.

Im Kontrast hierzu bewies das Original-DVS-Protokoll jedoch weiterhin Vorteile bezüglich der intrazellulären Marker, visuell zu objektivieren an IL17A, AktP, IL1 $\beta$ , IL17F und TNF $\alpha$ . Der Antikörper gegen p38P ging als einziger nicht in das Experiment mit ein. Wie bereits an anderer Stelle betont, blieb hierfür noch die Frage der Spezifität der Antikörperbindung zu prüfen.

Auffällig war zudem ein im Verlauf der Troubleshoots progredienter Verlust des Signals für den Marker CD14 innerhalb aller Ansätze, sodass ein Tausch des Antikörper-Metallkonjugats unter der Fragestellung einer Verstärkung des Signals für einige Oberflächenmarker diskutiert wurde.

### 3.1.6 Troubleshoot 5: Kontrolle der Spezifität der intrazellulären Bindung

Die Tab. 5 zeigt den Aufbau des Versuches zur Prüfung der Spezifität der Bindung der intrazellulären Marker. Einander gegenübergestellt wurden eine Kontroll-Oberflächenfärbung, eine Probe mit Inkubation in dem Oberflächen-Antikörpermix und dem Mix der intrazellulären Antikörper ohne Permeabilisierung (Antikörper in CSM), eine dritte Probe mit erfolgter Permeabilisierung und schließlich eine weitere Probe mit Permeabilisierung und vorhergehender Stimulierung mit TNF $\alpha$ . Die Iridium-Intercalator Färbung erfolgte in FixandPerm®.

Des Weiteren wurden in Kooperation mit dem Deutschen Rheumaforschungszentrum Berlin (DRFZ) folgende neue Antikörper-Metall-Konjugate getestet:

1. Erstmaliger Einsatz von CD3-Er170 zur besseren Differenzierung der Lymphozyten
2. CD66b-Lu175 (DRFZ) im Vergleich mit CD66b-Sm149 (ECRC)
3. CD15-Lu175 (DRFZ) im Vergleich mit CD15-Dy164 (ECRC)
4. Einsatz von CD14-Yb171 (DRFZ), zuvor CD14-Lu175 (ECRC)

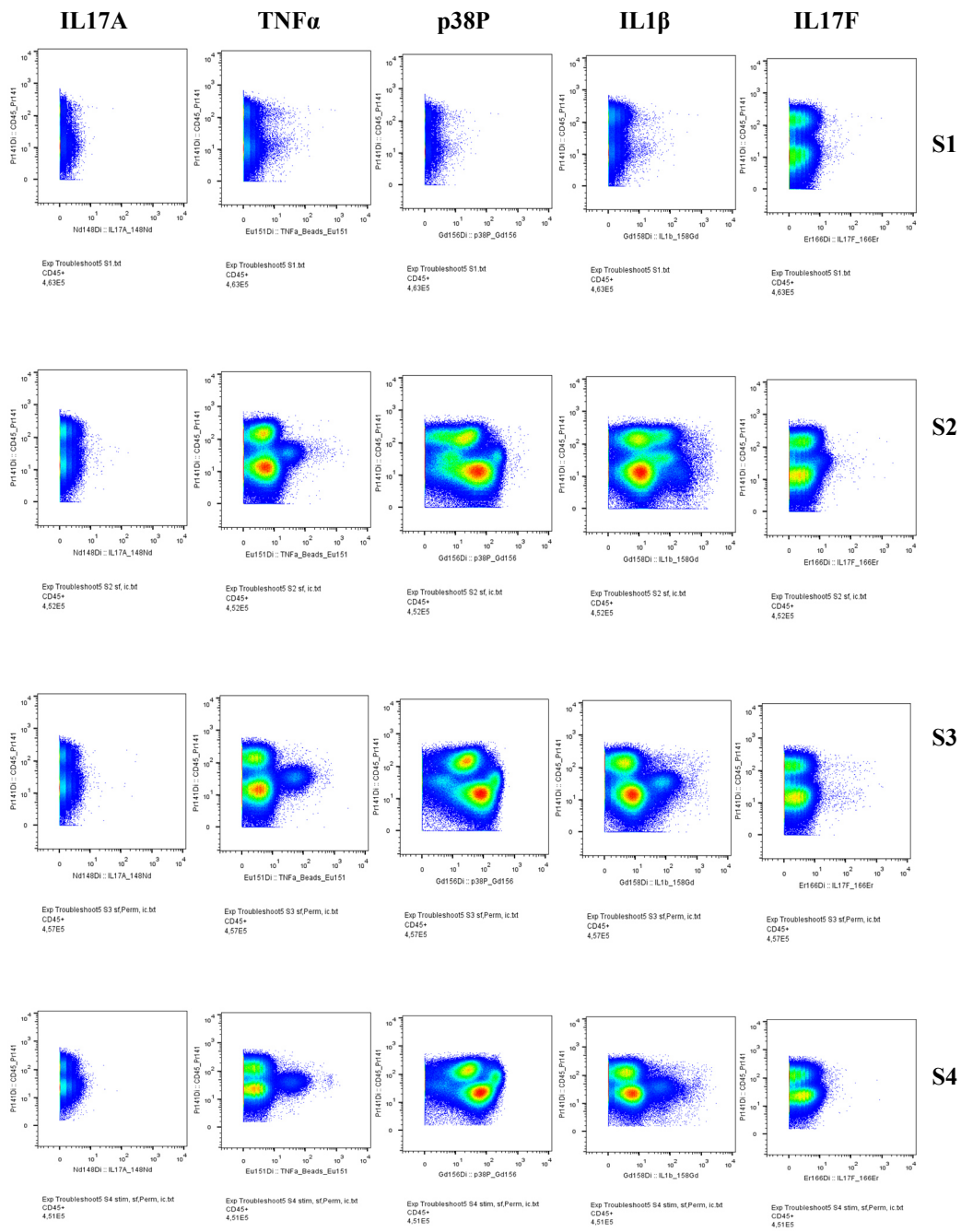
Zur Vermeidung einer Mehrbelegung der Schwermetall-Kanäle wurden die Antikörper-Metall-Konjugate wie in Tab. 5 dargestellt auf die einzelnen Proben verteilt. Als weiterer Oberflächen-Antikörper des Panels kamen CD45, CD16 und CD 33 zum Einsatz.

Die Ergebnisse der CyTOF-Analyse sind in den Abb. 21-22 dargestellt.

**Tab. 5:** Versuchsaufbau zur Prüfung der Spezifität der intrazellulären Marker. S1: Kontroll-Oberflächenfärbung (sf), nicht stimuliert (unstim.). S2: surface staining (sf) und intracellular staining (ic) in CSM ohne Permeabilisierung, nicht stimuliert (unstim.). S3: surface staining (sf) und intracellular staining (ic) in Saponin 0,3%, nicht stimuliert (unstim.). S4: surface staining (sf) und

*intracellular staining (ic) in Saponin 0,3%, stimuliert (stim.). S5: surface staining (sf) mit dem neuen Antikörper-Metall-Konjugat für den Marker CD66b-Lu175, nicht stimuliert (unstim.). o/n: overnight. S1-S4: Verwendung der Marker CD45, CD66b, CD33, CD16 aus dem ECRC (Experimental and Clinical Research Center, Charité Buch) und CD14, CD15, CD3 aus dem DRFZ (Deutsches Rheumaforschungszentrum). S5: Verwendung der Marker CD45, CD33, CD16, CD15 aus dem ECRC und CD14, CD3, CD66b aus dem DRFZ.*

Probe	1 Tag	2 Tag	Oberflächen-AK
S1	Keine Stimulation Oberflächenfärbung 4% PFA über Nacht	Ir-Intercalator-Färbung	ECRC: CD45-Pr141 CD66b-Sm149 CD33-Tm169
S2	Keine Stimulation Oberflächenfärbung 4% PFA über Nacht	Intrazelluläre Färbung in CSM Ir-Intercalator-Färbung	CD16-Ho165  DRFZ: CD14-Yb171
S3	Keine Stimulation Oberflächenfärbung 4% PFA über Nacht	Intrazelluläre Färbung in 0,3% Saponin Ir-Intercalator-Färbung	CD15-Lu175 CD3-Er170
S4	Stimulation mit TNF $\alpha$ Oberflächenfärbung 4% PFA über Nacht	Intrazelluläre Färbung in 0,3% Saponin Ir-Intercalator-Färbung	
S5	Keine Stimulation Oberflächenfärbung unter Austausch CD66b (REA306, DRFZ) 4% PFA über Nacht	Ir-Intercalator-Färbung	ECRC: CD45-Pr141 CD33-Tm169 CD16-Ho165 CD15-Dy164  DRFZ: CD14-Yb171 CD66b-Lu175 CD3-Er170



**Abb. 21** Kontrolle der Spezifität der intrazellulären Marker. Darstellung erfolgte auf CD45+ Zellen. S1: Kontroll-Oberflächenfärbung, nicht stimuliert.

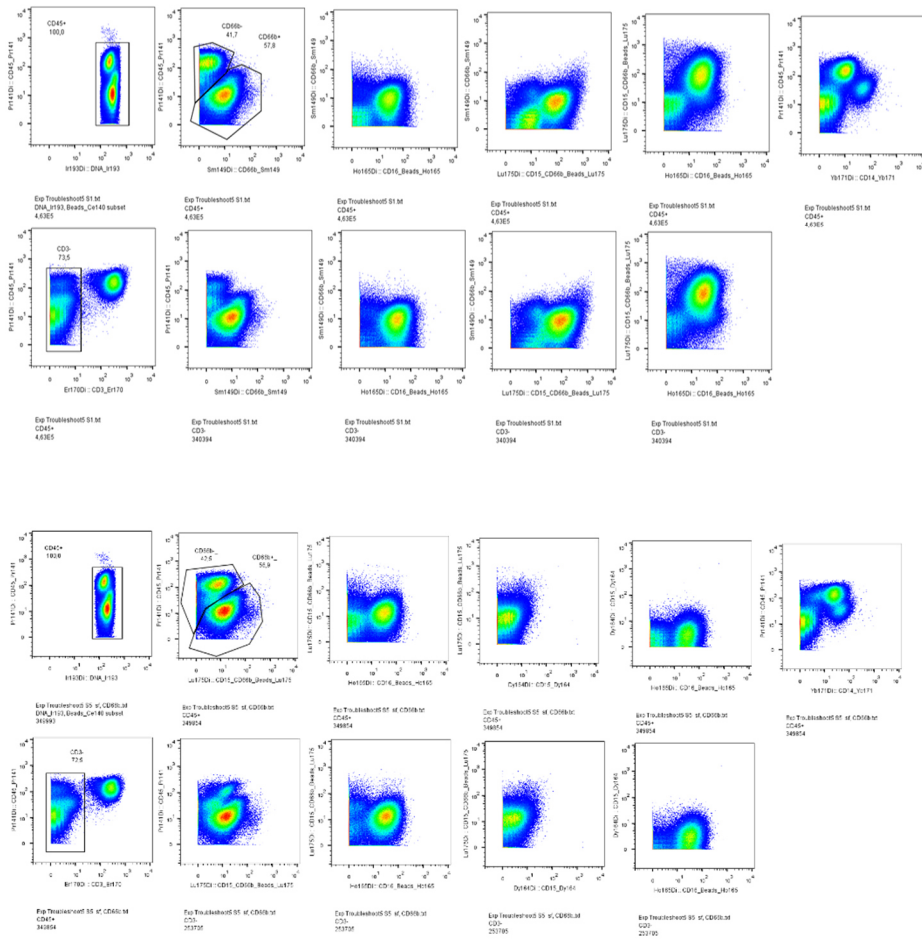
S2: Oberflächenfärbung und intrazelluläre Färbung in CSM ohne Permeabilisierung, nicht stimuliert.

*S3: Oberflächenfärbung und intrazelluläre Färbung in Saponin 0,3%, nicht stimuliert.*

*S4: Oberflächenfärbung und intrazelluläre Färbung in Saponin 0,3%, stimuliert.*

Obwohl in der Probe S2 keine Permeabilisierung erfolgte, konnte doch ein Signal der intrazellulären Marker TNF $\alpha$ , p38P und IL1 $\beta$  detektiert werden. Die Marker IL17A und IL17F zeigten –wie bereits in den vorhergehenden Experimenten- generell kein bzw. ein nur schwaches Signal im Vergleich zu der Kontrolle. Der Antikörper gegen AktP war in diesen Versuch nicht mit inbegriffen.

Ein relevanter Unterschied zwischen erfolgter und nicht erfolgter Permeabilisierung bzw. zwischen stimulierten und nicht stimulierten Zellen konnte anhand der Ergebnisse nicht objektiviert werden.



**Abb. 22** Vergleich verschiedener Antikörper-Metall-Konjugate.

Darstellung obere Reihe auf CD45+ Zellen, von links nach rechts: CD45/Ir, CD45/CD66b, CD66b/CD16, CD66b/CD15, CD15/CD16, CD45/CD14.

Darstellung untere Reihe: CD45/CD3 auf CD45+ Zellen, dann auf CD3- Zellen CD45/CD66b, CD66b/CD16, CD66b/CD15, CD15/CD16.

S1: alternatives CD15 und CD14 Antikörpermetall-Konjugat aus dem DRFZ, neu CD3 Marker, CD66b Marker aus dem ECRC.

S5: alternatives Antikörper-Metall-Konjugat für CD66b und CD14 aus dem DRFZ, neu CD3 Marker, CD15 aus dem ECRC.



Bezugnehmend auf den letzten Troubleshoot konnte durch den Einsatz des alternativen CD14 Antikörper-Metall-Konjugats (CD14-Yb171) ein besseres Signal für diesen Oberflächenmarker erreicht werden. Ein direkter Vergleich zwischen CD14-Lu175 und CD14-Yb171 war aufgrund der bereits besetzten Schwermetall-Kanäle durch die anderen Antikörper nicht realisierbar. Vor dem Hintergrund eines zu Beginn guten Signals des Konjugates CD14-Lu175 blieb unklar, ob der Effekt nicht auf einen Verfall der Antikörpercharge zurückzuführen ist.

Der Vergleich zwischen CD66b-Sm149 und CD66b-Lu175 zeigte für die Diskrimination der Populationen keinen relevanten Effekt.

Im Zuge der Analyse fiel auf, dass das CD15-Dy164 Metall-Konjugat (S5) im Vergleich zu dem Konjugat CD15-Lu175 (S1) ein schwächeres Resultat erzielte. Das zeigte das Gating CD66B/CD15 und CD15/CD16.

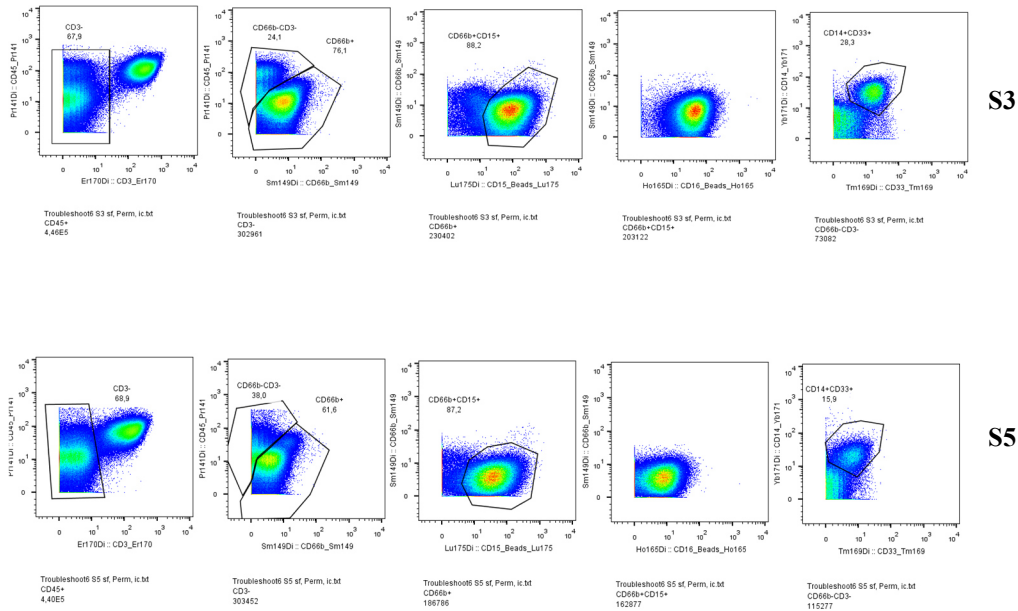
Zusammenfassend konnte in Bezug auf die Eingangsfrage gezeigt werden, dass die Bindung der intrazellulären Marker unspezifisch zu sein scheint. Bei fehlender Porenbildung an der Zelloberfläche hätte es zu keiner Bindung der intrazellulären Marker an das Zielantigen im Zellinneren kommen sollen, gemäß dem Fall einer spezifischen Antikörperbindung. In diesem Versuch konnte jedoch auch ein Signal in der Probe S2 -trotz fehlender Permeabilisierung- detektiert werden, sodass basierend auf diesen Ergebnissen das Protokoll erneut reevaluiert werden musste.

### 3.1.7 Troubleshoot 6: Der zweite Fc-Block und Vergleich der Methoden

Von der Hypothese ausgehend, dass die unspezifische Bindung der intrazellulären Marker durch die Bindung der Fc-Rezeptoren der Zelloberfläche an die Fc-Fragmente der Antikörper erzeugt wird, wurde im folgenden Experiment der Einfluss eines zweiten Fc-Blockes auf die Spezifität der intrazellulären Marker untersucht. Der zweite Fc-Block wurde im Verlauf des Protokolls vor die Färbung der intrazellulären Marker geschaltet.

Der Versuchsaufbau des vorausgegangenen Troubleshoots wurde weitgehend übernommen und um das Original-DVS-Protokoll (S5 unstimuliert, S6 stimuliert) erweitert. Zudem fand im Vorfeld ein Chargenwechsel und eine Neutitration der Antikörper CD15 und CD14 statt. Die Zellen stammen,

wie in den Experimenten zuvor, von einem HD und wurden entsprechend des oben aufgeführten Schemas stimuliert. Die Ergebnisse sind in den Abb. 23-24 abgebildet.



**Abb. 23** Kontrolle des Original-DVS-Protokolls und der modifizierten Saponin-Methode.

Gating von links nach rechts: CD45/CD3 auf CD45+ Zellen, CD45/CD66b auf den CD3- Zellen, CD66b/CD15 auf CD3-CD66b+ Zellen, CD66b/CD16 auf den CD3-CD66b+CD15+ Zellen, CD14/CD33 auf den CD3-CD66b-CD15- Zellen.

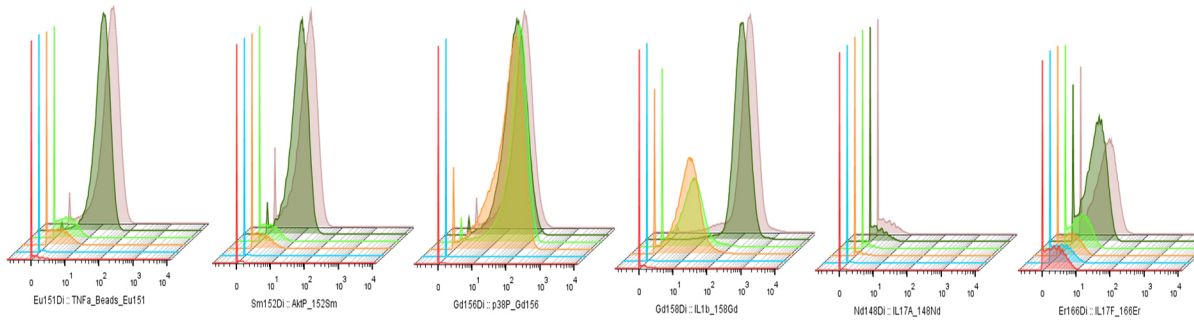
S3: surface staining und PFA 4% overnight, am Folgetag intracellular staining in Saponin 0,3% und Iridium-Intercalator in FixandPerm® (modifizierte Saponin-Methode).

S5: Original-DVS-Protokoll.

Nach Wechsel der Charge und Neutitration der Antikörper-Metall-Konjugate CD14-Lu175 und CD15-Dy164 konnten die Signalverluste des letzten Experimentes nicht reproduziert werden.

Bei der Analyse und dem Vergleich beider Methoden wurden auch in diesem Versuch -in Analogie zu den vorausgegangenen Experimenten- größere Oberflächenmarkerverluste auf Seiten des Original-

DVS-Protokolls verzeichnet. In Bezug auf die intrazellulären Marker TNF $\alpha$ ; IL1 $\beta$  und AktP ließen sich allerdings auch hier die besseren Ergebnisse erreichen (Abb. 26).



	Sample Name	Subset Name	Count
■	Troubleshoot6 S1 sf.bt	CD66b+CD15+	210505
■	Troubleshoot6 S2 sf, ic.bt	CD66b+CD15+	203129
■	Troubleshoot6 S3 sf, Perm, ic.bt	CD66b+CD15+	203122
■	Troubleshoot6 S4 stim, sf, Perm, ic.t	CD66b+CD15+	215831
■	Troubleshoot6 S5 sf, Perm, ic.bt	CD66b+CD15+	162877
■	Troubleshoot6 S6 stim, sf, Perm, ic.t	CD66b+CD15+	190643

**Abb. 24** Spezifitätskontrolle der intrazellulären Marker nach dem zweiten Fc-Block.

S1: Kontroll-Oberflächenfärbung (rot).

S2: surface staining und intracellular staining ohne Permeabilisierung (blau).

S3: surface staining, Permeabilisierung mit Saponin 0,3% und intracellular staining (orange).

S4: Stimulation mit TNF $\alpha$ , surface staining, Permeabilisierung mit Saponin 0,3%, intracellular staining (hellgrün).

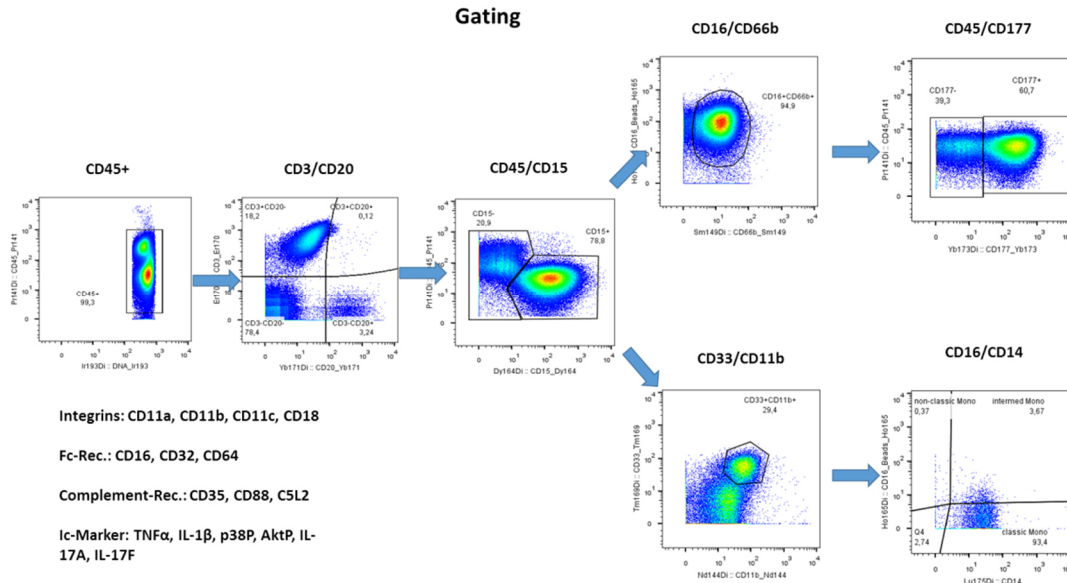
S5: Original-DVS-Protokoll, nicht stimuliert (dunkelgrün).

S6: Original-DVS-Protokoll, stimuliert (rosa).

Durch die Erweiterung des Protokolls um den zweiten Fc-Block ließen sich in dem Ansatz ohne Permeabilisierung (S2) keine Signale der intrazellulären Marker mehr nachweisen. Die Ergebnisse von S2 entsprachen der Kontrolle. Daraus konnte abgeleitet werden, dass durch einen vor die Inkubation mit dem intrazellulären Antikörpermix geschalteten zweiten Fc-Block die unspezifische Bindung der Antikörper minimiert wird.

### 3.1.8 Zusammenfassung der Ergebnisse des Etablierungsprozesses

In Zusammenschau der einzelnen Etablierungsschritte zeigten die Resultate der modifizierten Saponin-Methode (Verwendung von Saponin 0,3%, über Nacht Fixierung in PFA4%, Iridium-Intercalator Inkubation in FixandPerm®) die günstigste Balance zwischen dem Erhalt der Oberflächensignale und der Darstellung der intrazellulären Marker. Zudem wurde das Panel der Oberflächen-Antikörper um die Marker CD3 und CD20 erweitert. Diese ermöglichten nun eine Darstellung des Lymphozytenzweiges und somit eine reinere Diskrimination der Zellpopulation während des Gatings. Zur Unterscheidung der einzelnen Populationen wurde die in Abb. 25 dargestellte Gatingstrategie erarbeitet.



**Abb. 25** Gatingstrategie. Erstes Gate CD45 gegen DNA-Iridium, gefolgt von CD3/CD20 auf den CD45+ Zellen, dann CD45/CD15 auf den CD3-CD20- Zellen. Obere Reihe: Gating der CD15+ Zellen. Untere Reihe: Gating der CD15- Zellen.

Ausgehend von den CD45+ Zellen (Leukozyten) wurden in einem ersten Schritt die T-Lymphozyten (CD3+) und die B-Lymphozyten (CD20+) herausgefiltert (Negativgating). Anschließend erfolgte ein positives Gating zur weiteren Analyse: anhand des CD15-Markers die Unterscheidung zwischen polymorphkernigen Leukozyten (PMN, v.a. neutrophile Granulozyten, CD15+) und den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC, v.a. Monozyten, CD15-). Granulozyten wurden folgend mittels CD66b und CD16 differenziert (CD66b+CD16+). CD33 und CD11b dienen der weiteren Differenzierung der CD15- Zellen. Die Monozyten (CD33+CD11b+) wurden zudem unterteilt in klassische (CD16-CD14+), intermediäre (CD16+CD14+) und nicht klassische Monozyten (CD16+CD14-).

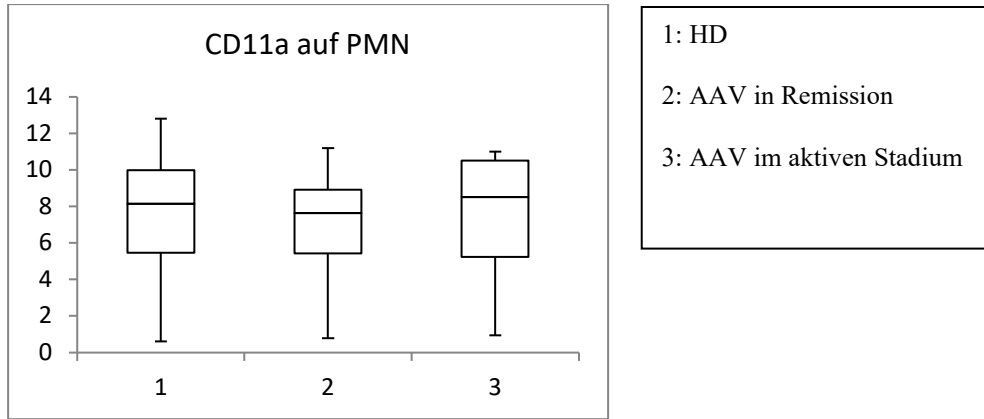
## 3.2. Analyse der Oberflächen- und intrazellulären Marker in Patienten\*innen mit AAV

Nachfolgend werden die Oberflächen- und die intrazellulären Marker im Vergleich zwischen Gesunden, aktiven AAV-Patienten\*innen und Patienten\*innen in Remission behandelt. Untersucht wurden die neutrophilen Granulozyten und die Monozyten bezüglich der Zelloberflächenexpression ihrer Fc-Rezeptoren (CD16, CD32, CD64), Komplement-Rezeptoren (CD35, CD88, C5L2), Integrine (CD11a, CD11b, CD11c, CD18) sowie CD177, MHCII und HLA-DR und bezüglich der intrazellulären Expression von IL17A, IL17F, TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , AktP und p38P. Vergleichswert war die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). Im Fokus standen die signifikanten Ergebnisse, für die jeweils ein Signifikanzniveau  $\alpha$  von 5% angelegt wurde.

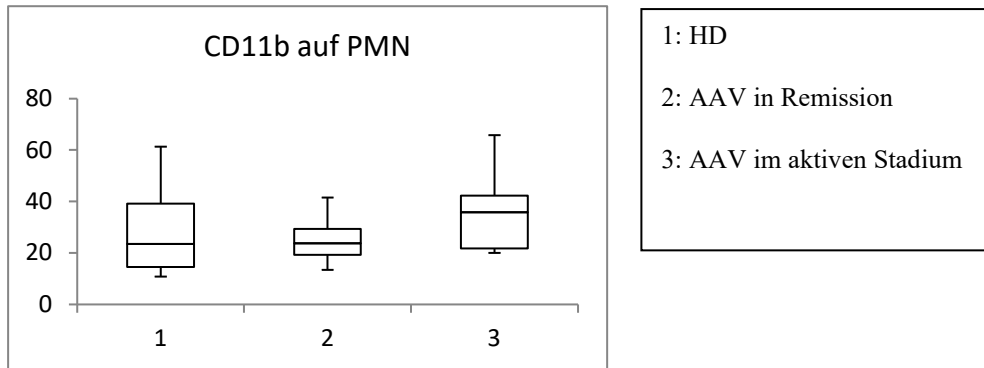
Hierbei muss allerdings berücksichtigt werden, dass die geringe Fallzahl von 8 aktiven Patienten\*innen die statistische Auswertung und Aussagekraft der Analyse erheblich limitiert.

### 3.2.1 Analyse der Integrine und CD177

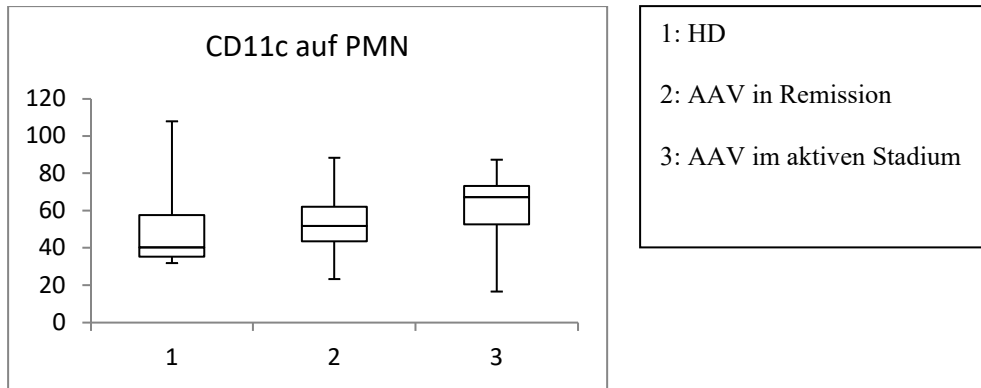
Bezogen auf die PMN zeigte sich bei der Betrachtung der Marker CD11a, CD11b, CD11c und CD18 eine auffällig höhere MFI von CD11b auf der Seite der aktiven Patienten\*innen (MFI-Mittelwert 36,6) im Vergleich zu den Patienten\*innen in Remission (MFI-Mittelwert 24,5) und gesunden Kontrollen (MFI-Mittelwert 29,2). Der Mittelwert der MFI von CD11b war im Kollektiv der aktiven Patienten\*innen höher. Das Signifikanzniveau wurde jedoch nicht erreicht, sodass ein höheres Vorkommen von CD11b auf der Zelloberfläche der Neutrophilen der aktiven Erkrankten nicht bestätigt werden konnte (Z HD/ aAAV: -1,37, [-1,96; +1,96], Z rAAV/ aAAV: -1,85, [-1,96; +1,96]). Auch für die restlichen Marker wurden keine relevanten Unterschiede ermittelt.



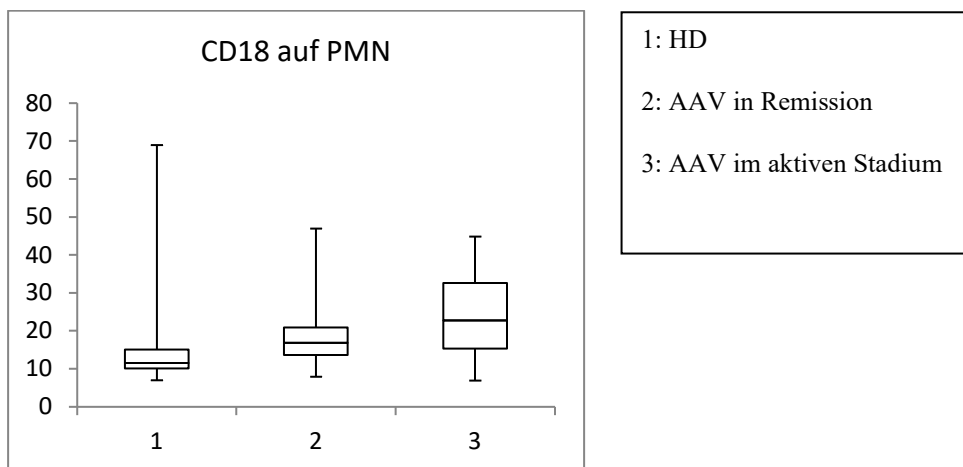
**Abb. 26** Boxplot CD11a auf der Oberfläche von PMN. 1. HD: MFI-Mittelwert 7,56. 2. Remission: MFI-Mittelwert 6,89. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 7,22.  $Z_{HD/aAAV} -0,21, [-1,96; +1,96], \min(U) 29 (> Ukrit. 13), p > 0,05$ .  $Z_{HD/rAAV} -0,15, [-1,96; +1,96], \min(U) 46 (> Ukrit. 22), p > 0,05$ .  $Z_{rAAV/aAAV} -0,39, [-1,96; +1,96], \min(U) 41 (> Ukrit. 22), p > 0,05$ .



**Abb. 27** Boxplot CD11b auf der Oberfläche von PMN. 1. HD: MFI-Mittelwert 29,16. 2. Remission: MFI-Mittelwert 24,51. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 36,56.  $Z_{HD/aAAV} -1,37, [-1,96; +1,96], \min(U) 20 (> Ukrit. 13), p > 0,05$ .  $Z_{HD/rAAV} -0,08, [-1,96; +1,96], \min(U) 48 (> Ukrit. 22), p > 0,05$ .  $Z_{rAAV/aAAV} -1,85, [-1,96; +1,96], \min(U) 24 (> Ukrit. 22), p > 0,05$ .



**Abb. 28** Boxplot CD11c auf der Oberfläche von PMN. 1. HD: MFI-Mittelwert 51,88. 2. Remission: MFI-Mittelwert 51,73. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 61,05. Z HD/ aAAV -1,16, [-1,96; +1,96], min(U) 21 (> Ukrit. 13),  $p > 0,05$ . Z HD/ rAAV -0,54, [-1,96; +1,96], min(U) 41 (>Ukrit. 22),  $p > 0,05$ . Z rAAV/ aAAV -1,39, [-1,96, +1,96], min(U) 30 (>Ukrit. 22),  $p > 0,05$ .

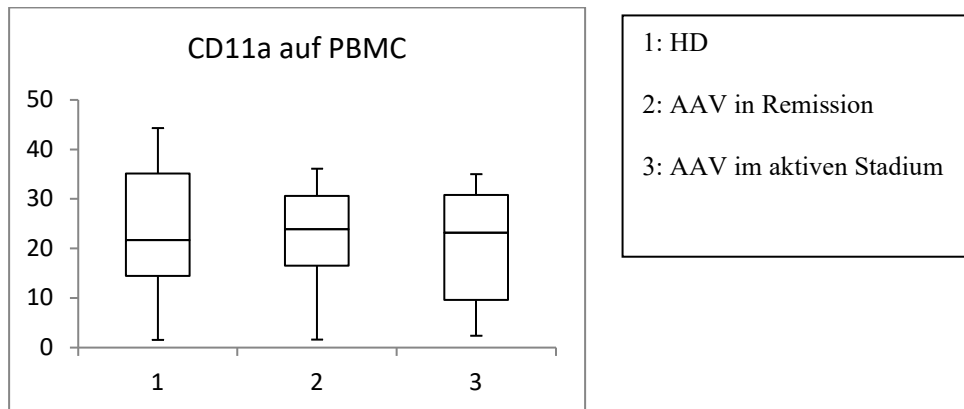


**Abb. 29** Boxplot CD18 auf der Oberfläche von PMN. 1. HD: MFI-Mittelwert 19,18. 2. Remission: MFI-Mittelwert 19,83. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 24. Z HD/ aAAV -1,05, [-1,96; +1,96], min(U) 22 (> Ukrit. 13),  $p > 0,05$ . Z HD/ rAAV -1,08, [-1,96; +1,96], min(U) 34 (>Ukrit. 22),  $p > 0,05$ . Z rAAV/ aAAV -0,77, [-1,96, +1,96], min(U) 38 (>Ukrit. 22),  $p > 0,05$ .

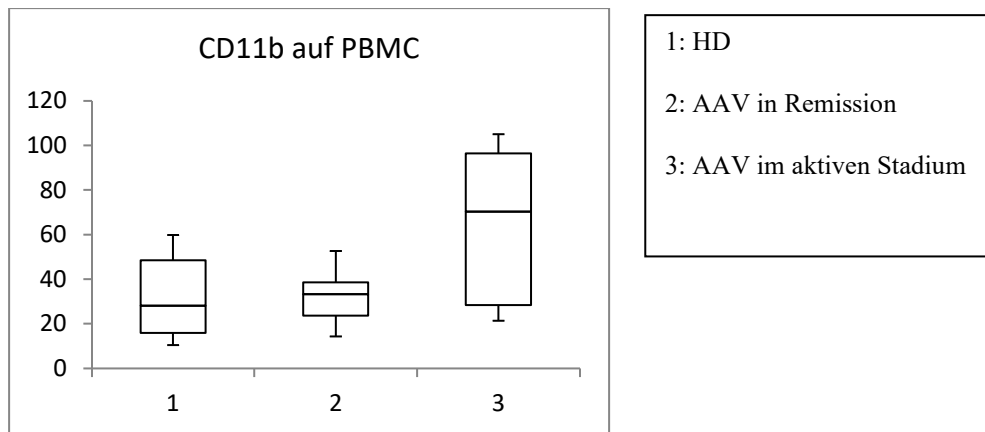
Bei den Monozyten fiel ein Unterschied des gleichen Markers sowohl zwischen den gesunden Kontrollen (MFI-Mittelwert 32,3) und dem Kollektiv der aktiven Patienten\*innen (MFI-Mittelwert



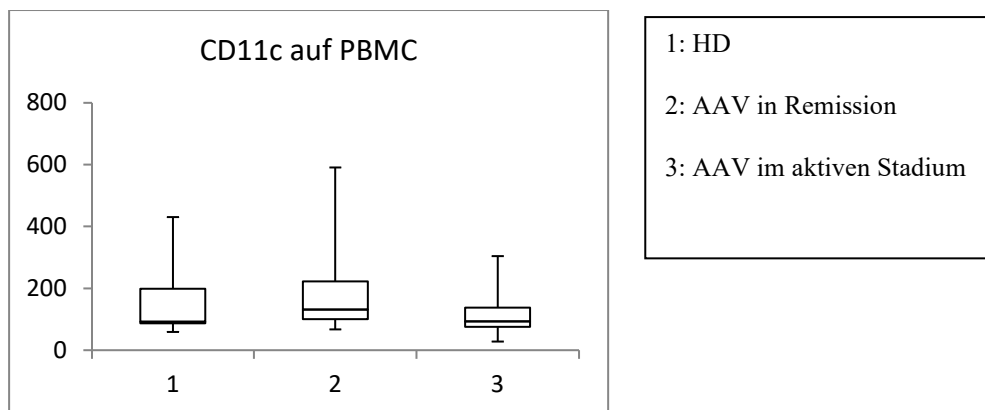
64,2) als auch zwischen den aktiven Patienten\*innen und den Patienten\*innen in Remission (MFI-Mittelwert 32,4) auf. Die MFI für CD11b war in beiden Fällen auf Seiten der aktiven Patienten\*innen höher. Allerdings wurde auch hier das Signifikanzniveau nicht erreicht ( $Z_{HD/aAAV} -1,68, [-1,96; +1,96]$ ,  $Z_{rAAV/aAAV} -1,7 [-1,96, +1,96]$ ).



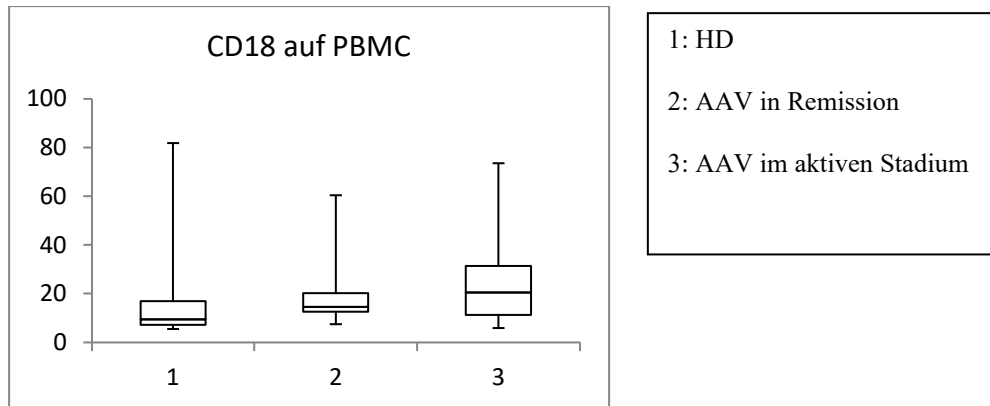
**Abb. 30** Boxplot CD11a auf der Oberfläche von PBMC. 1. HD: MFI-Mittelwert 24,15. 2. Remission: MFI-Mittelwert 22,19. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 20,16.  $Z_{HD/aAAV} -0,42, [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 28 (> U_{krit.} 13)$ ,  $p > 0,05$ .  $Z_{HD/rAAV} -0, [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 47 (> U_{krit.} 22)$ ,  $p > 0,05$ .  $Z_{rAAV/aAAV} -0,15, [-1,96, +1,96]$ ,  $\min(U) 45 (> U_{krit.} 22)$ ,  $p > 0,05$ .



**Abb. 31** Boxplot CD11b auf der Oberfläche von PBMC. 1. HD: MFI-Mittelwert 32,25. 2. Remission: MFI-Mittelwert 32,40. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 64,16.  $Z_{HD/aAAV} -1,68, [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 16 (> Ukrit. 13)$ ,  $p > 0,05$ .  $Z_{HD/rAAV} -0,31, [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 44 (> Ukrit. 22)$ ,  $p > 0,05$ .  $Z_{rAAV/aAAV} -1,7, [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 26 (> Ukrit. 22)$ ,  $p > 0,05$ .

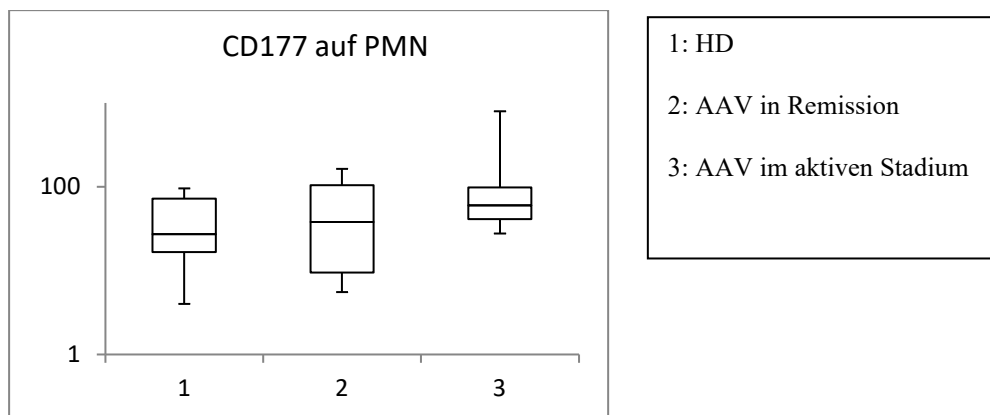


**Abb. 32** Boxplot CD11c auf der Oberfläche von PBMC. 1. HD: MFI-Mittelwert 166,76. 2. Remission: MFI-Mittelwert 188,76. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 120,35.  $Z_{HD/aAAV} -0,74, [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 25 (> Ukrit. 13)$ ,  $p > 0,05$ .  $Z_{HD/rAAV} -0,46, [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 42 (> Ukrit. 22)$ ,  $p > 0,05$ .  $Z_{rAAV/aAAV} -1,31, [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 31 (> Ukrit. 22)$ ,  $p > 0,05$ .



**Abb. 33** Boxplot CD18 auf der Oberfläche von PBMC. 1. HD: MFI-Mittelwert 19,32. 2. Remission: MFI-Mittelwert 19,09. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 27,73. Z HD/ aAAV -1,05, [-1,96; +1,96], min(U) 22 (> Ukrit. 13),  $p > 0,05$ . Z HD/ rAAV -1,31, [-1,96; +1,96], min(U) 30 (>Ukrit. 22),  $p > 0,05$ . Z rAAV/ aAAV -0,46, [-1,96, +1,96], min(U) 41 (>Ukrit. 22),  $p > 0,05$ .

Ein signifikanter Unterschied bezüglich der Expression von CD177 auf PMN zwischen den einzelnen Gruppen konnte nicht objektiviert werden.

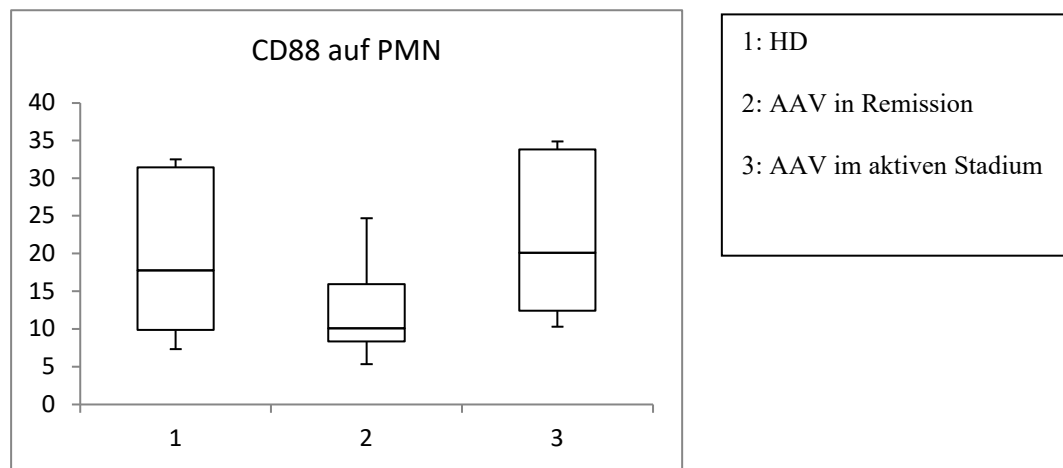


**Abb. 34** Boxplot CD177 auf der Oberfläche von PMN. 1. HD: MFI-Mittelwert 41,52. 2. Remission: MFI-Mittelwert 59,00. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 154,53. Z HD/ aAAV -1,37 [-1,96; +1,96], min(U) 19 (> Ukrit. 13),  $p > 0,05$ . Z HD/ rAAV -0,69, [-1,96; +1,96], min(U) 39 (>Ukrit. 22),  $p > 0,05$ . Z rAAV/ aAAV -1,16 [-1,96, +1,96], min(U) 32 (>Ukrit. 22),  $p > 0,05$ .

In Synopsis ließ sich weder für die neutrophilen Granulozyten noch für die Monozyten ein signifikant von den gesunden Kontrollen abweichendes Verteilungsmuster der Integrine oder CD177 feststellen.

### 3.2.2 Analyse der Komplement-Rezeptoren

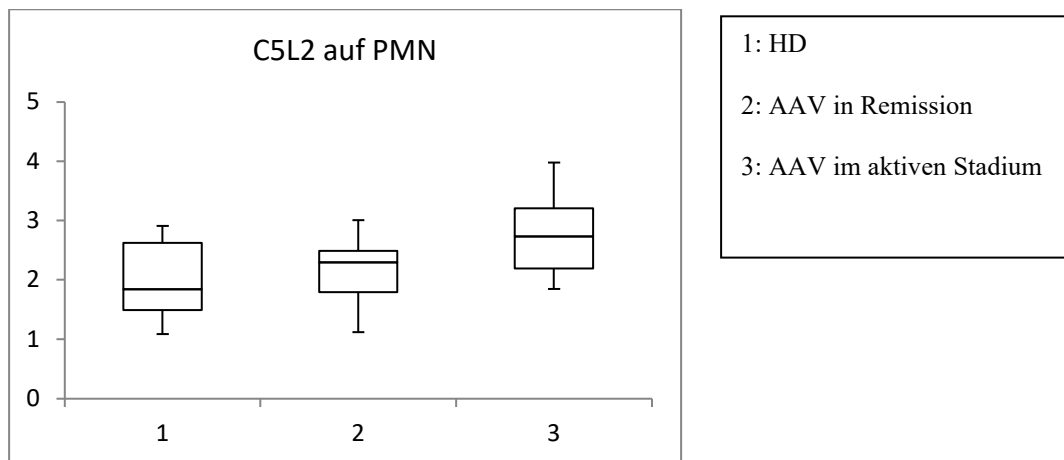
Im Vergleich der MFI der Marker CD35, CD88 und C5L2 auf den Neutrophilen zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei CD88 zwischen den aktiven (MFI-Mittelwert 22,2) und nicht-aktiven Patienten\*innen (MFI-Mittelwert 12,5). Das aktive Patientenkollektiv wies eine höhere CD88-Intensität auf, die Patienten\*innen in Remission die niedrigste (Z rAAV/ aAAV -2,16, [-1,96; +1,96]).



**Abb. 35** Boxplot CD88 auf der Oberfläche von PMN. 1. HD: MFI-Mittelwert 19,77. 2. Remission: MFI-Mittelwert 12,51. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 22,18. Z HD/ aAAV -0,84, [-1,96; +1,96], min(U) 23 (> Ukrit. 13),  $p > 0,05$ . Z HD/ rAAV -1,7, [-1,96; +1,96], min(U) 26 (>Ukrit. 22),  $p > 0,05$ . Z rAAV/ aAAV -2,16 [-1,96; +1,96], min(U) 18 (<Ukrit. 22),  $p < 0,05$ .

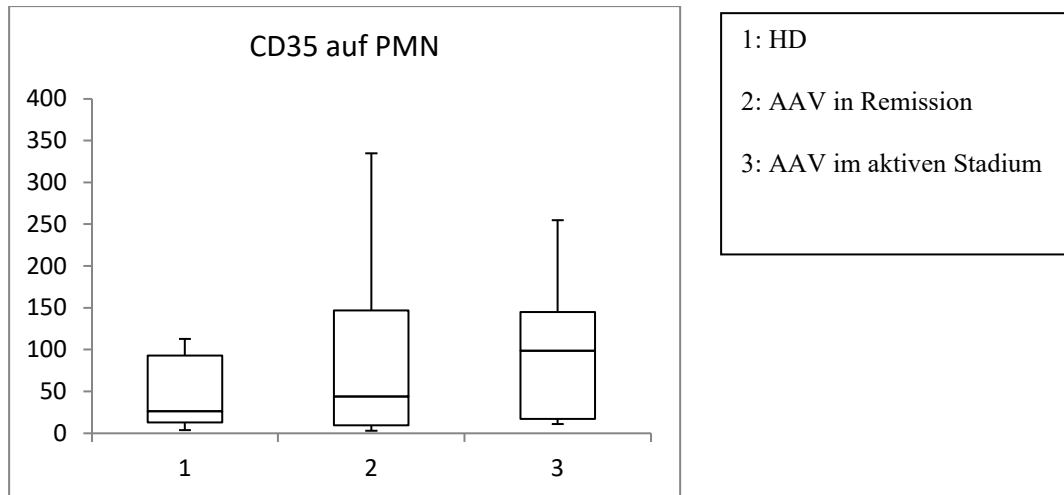
Zwischen der Gruppe der gesunden Probanden\*innen (MFI-Mittelwert 19,8) und den aktiven Patienten\*innen (MFI-Mittelwert 22,2) zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Z HD/ aAAV - 0,84, [-1,96; +1,96]).

In der Verteilung von C5L2 zwischen den Gesunden (MFI-Mittelwert 2,0) und den Patienten\*innen im aktiven Krankheitsstadium (MFI-Mittelwert 2,8) sowie zwischen den Aktiven und den Patienten\*innen in Remission (MFI-Mittelwert 2,1) fand sich die höchste Intensität auf Seiten der aktiven AAV-Patienten\*innen, jedoch ohne das Signifikanzniveau zu erreichen (Z HD/ aAAV -1,79, [-1,96; +1,96], Z rAAV/ aAAV -1,77, [-1,96; +1,96]).



**Abb. 36** Boxplot C5L2 auf der Oberfläche von PMN. 1. HD: MFI-Mittelwert 2,00. 2. Remission: MFI-Mittelwert 2,13. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 2,77. Z HD/ aAAV -1,79, [-1,96; +1,96], min(U) 15 (> Ukrit. 13),  $p > 0,05$ . Z HD/ rAAV -0,39 [-1,96; +1,96], min(U) 43 (>Ukrit. 22),  $p > 0,05$ . Z rAAV/ aAAV -1,77 [-1,96; +1,96], min(U) 24 (>Ukrit. 22),  $p > 0,05$ .

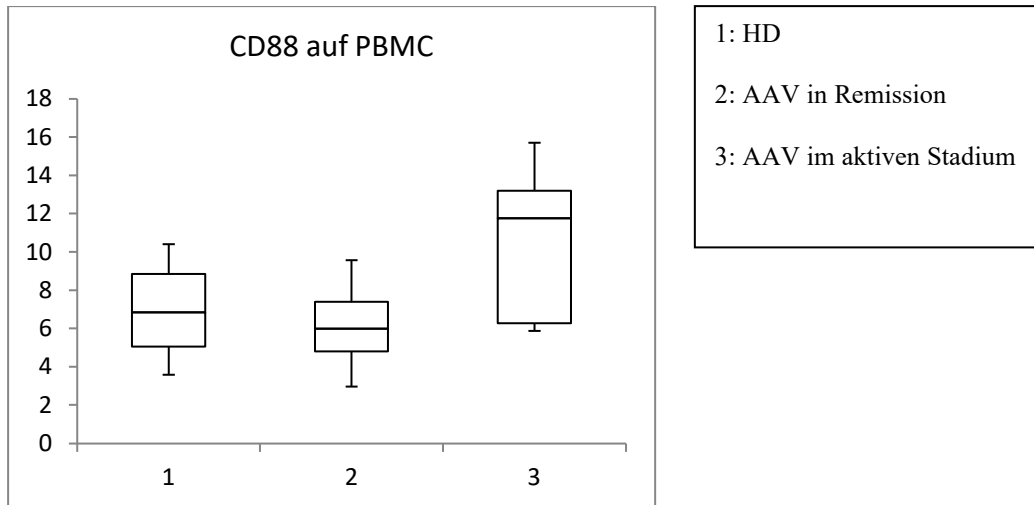
Signifikante Unterschiede für das Vorkommen des Markers CD35 auf der Oberfläche der Neutrophilen gab es nicht.



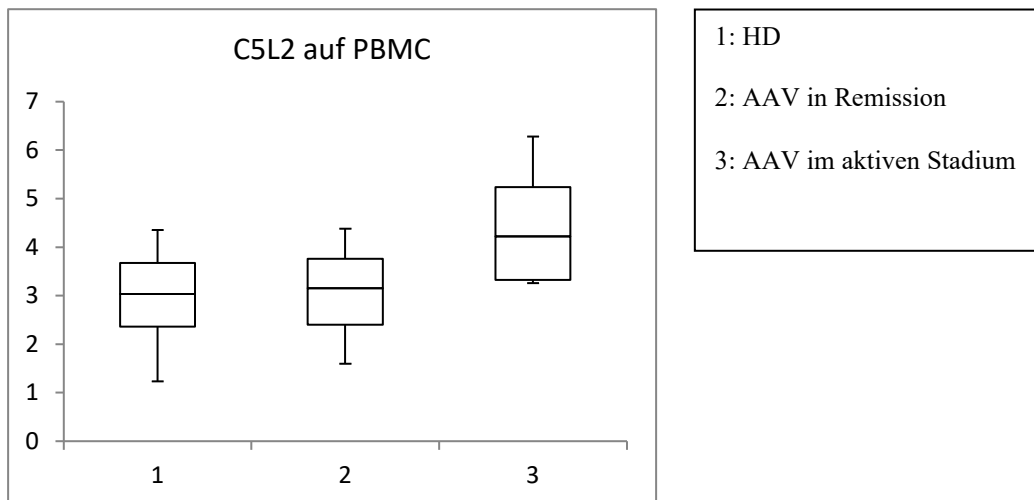
**Abb. 37** Boxplot CD35 auf der Oberfläche von PMN. 1. HD: MFI-Mittelwert 48,24. 2. Remission: MFI-Mittelwert 97,31. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 99,30. Z HD/ aAAV -1,37, [-1,96; +1,96], min(U) 19 (> Ukrit. 13),  $p > 0,05$ . Z HD/ rAAV -0,62, [-1,96; +1,96], min(U) 40 (>Ukrit. 22),  $p > 0,05$ . Z rAAV/ aAAV -0,62 [-1,96, +1,96], min(U) 40 (>Ukrit. 22),  $p > 0,05$ .

Im Fall der Monozyten wiesen die Marker CD88 und C5L2 im Vergleich der aktiven Erkrankten mit den Patienten\*innen in Remission eine signifikant höhere MFI seitens der aktiven Patientene\*innen auf.

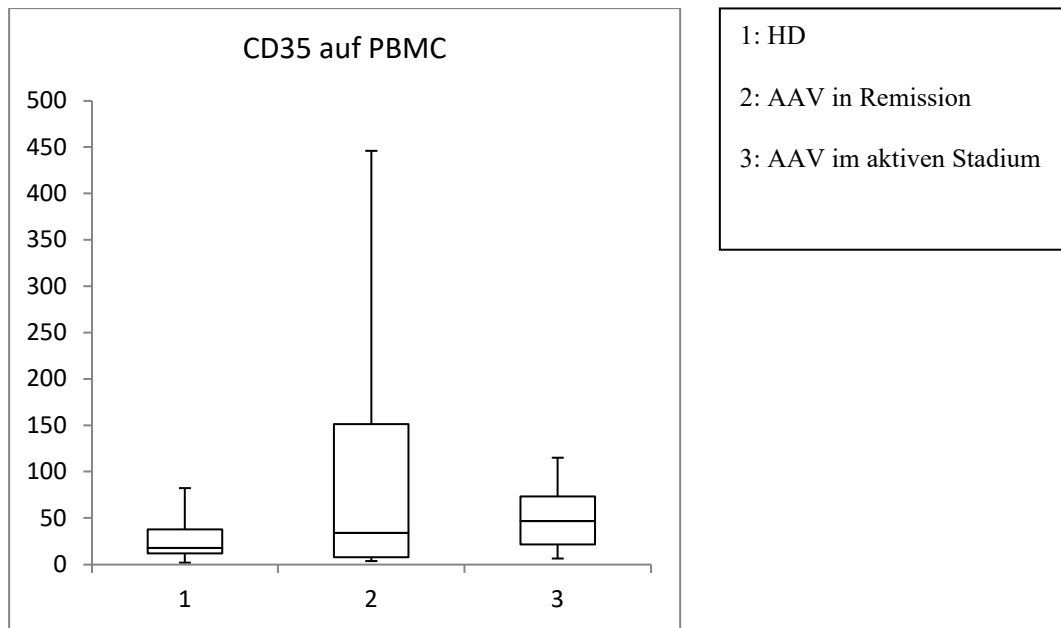
Für den Marker CD35 wurde kein signifikanter Unterschied detektiert.



**Abb. 38** Boxplot CD88 auf der Oberfläche von PBMC. 1. HD: MFI-Mittelwert 6,89. 2. Remission: MFI-Mittelwert 6,07. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 10,56.  $Z_{HD/aAAV} -1,89 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 14 (> Ukrit. 13)$ ,  $p > 0,05$ .  $Z_{HD/rAAV} -0,77 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 38 (> Ukrit. 22)$ ,  $p > 0,05$ .  $Z_{rAAV/aAAV} -2,39 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 17 (< Ukrit. 22)$ ,  $p < 0,05$ .



**Abb. 39** Boxplot C5L2 auf der Oberfläche von PBMC. 1. HD: MFI-Mittelwert 2,97. 2. Remission: MFI-Mittelwert 3,05. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 4,40.  $Z_{HD/aAAV} -1,89 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 14 (> Ukrit. 13)$ ,  $p > 0,05$ .  $Z_{HD/rAAV} -0,08 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 47 (> Ukrit. 22)$ ,  $p > 0,05$ .  $Z_{rAAV/aAAV} -2,31 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 18 (< Ukrit. 22)$ ,  $p < 0,05$ .



**Abb. 40** Boxplot CD35 auf der Oberfläche von PBMC. 1. HD: MFI-Mittelwert 28,95. 2. Remission: MFI-Mittelwert 97,82. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 52,16. Z HD/ aAAV -1,47 [-1,96; +1,96], min(U) 18 (> Ukrit. 13),  $p > 0,05$ . Z HD/ rAAV -0,77, [-1,96; +1,96], min(U) 38 (>Ukrit. 22),  $p > 0,05$ . Z rAAV/ aAAV -0,08 [-1,96, +1,96], min(U) 47 (>Ukrit. 22),  $p > 0,05$ .

Zusammenfassend zeigte sich eine signifikant höhere Dichte von CD88 auf der Zelloberfläche der neutrophilen Granulozyten der aktiven Patienten\*innen im Vergleich zu den Patienten\*innen in Remission.

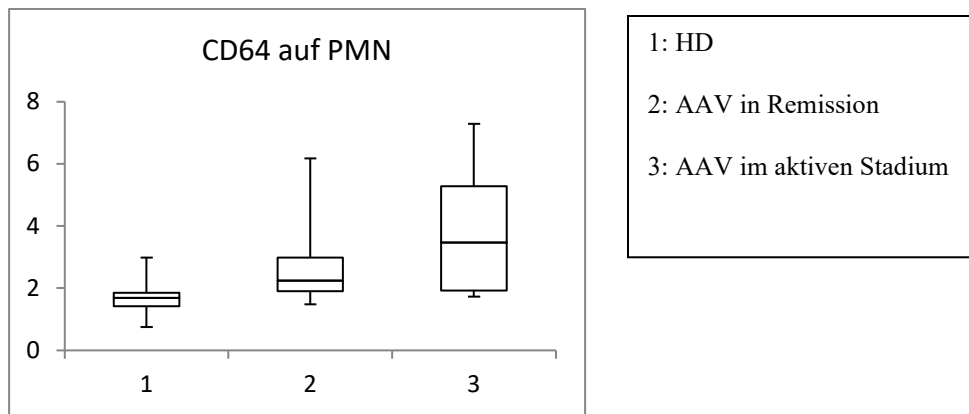
CD88 und C5L2 waren in der Gegenüberstellung der aktiven AAV-Patienten\*innen und denen in Remission signifikant stärker auf der Monozytenoberfläche der aktiven Patienten\*innen vertreten.

### 3.2.3 Analyse der Fc-Rezeptoren

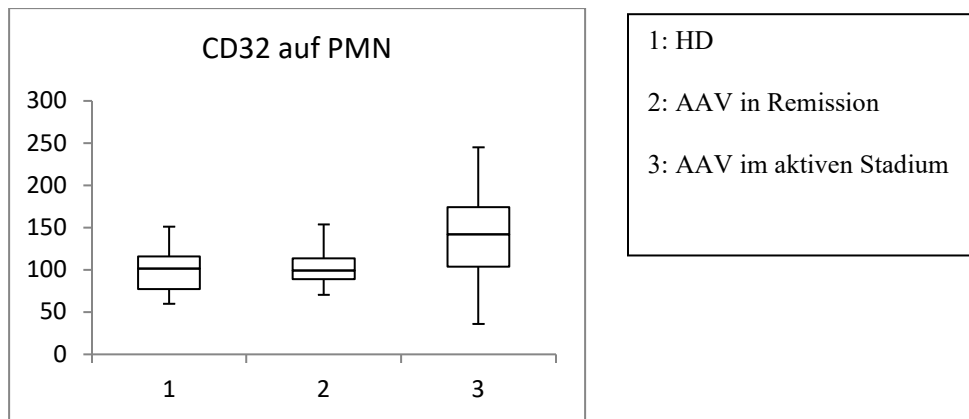
Bei der Betrachtung der Fc-Rezeptoren (CD16, CD32, CD64) zeigte im Fall der PMN der Marker CD64 im Vergleich der aktiven Patienten\*innen (MFI-Mittelwert 4 ) und den gesunden Probanden\*innen (MFI-Mittelwert 1,7) sowie in der Gegenüberstellung der Patienten\*innen in



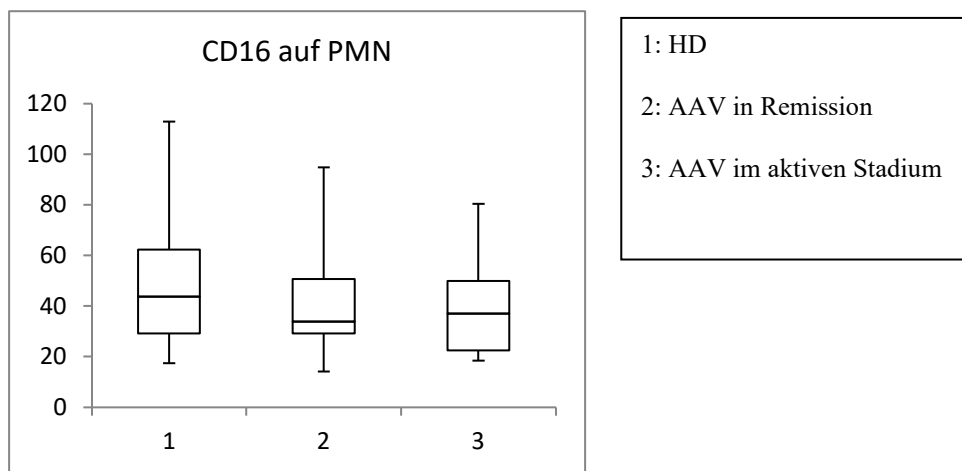
Remission (MFI-Mittelwert 2,7) und den gesunden Probanden\*innen signifikant höhere MFI in den Gruppen der AAV-Patienten\*innen mit der höchsten Intensität in aktiven Patienten\*innen (Z HD/ aAAV -2,52 [-1,96; +1,96], Z HD/ rAAV -2,39, [-1,96; +1,96]). Auch die CD32-Intensität fiel im Vergleich auf Seiten der aktiven Patienten\*innen (MFI-Mittelwert 139,7) höher aus, allerdings ohne signifikant zu sein (Z HD/ aAAV -1,47 [-1,96; +1,96]).



**Abb. 41** Boxplot CD64 auf der Oberfläche von PMN. 1. HD: MFI-Mittelwert 1,69. 2. Remission: MFI-Mittelwert 2,69. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 3,95. Z HD/ aAAV -2,52 [-1,96; +1,96],  $\min(U)$  8 (< Ukrit. 13),  $p < 0,05$ . Z HD/ rAAV -2,39, [-1,96; +1,96],  $\min(U)$  17 (<Ukrit. 22),  $p < 0,05$ . Z rAAV/ aAAV -0,96 [-1,96, +1,96],  $\min(U)$  35,5 (>Ukrit. 22),  $p > 0,05$ .



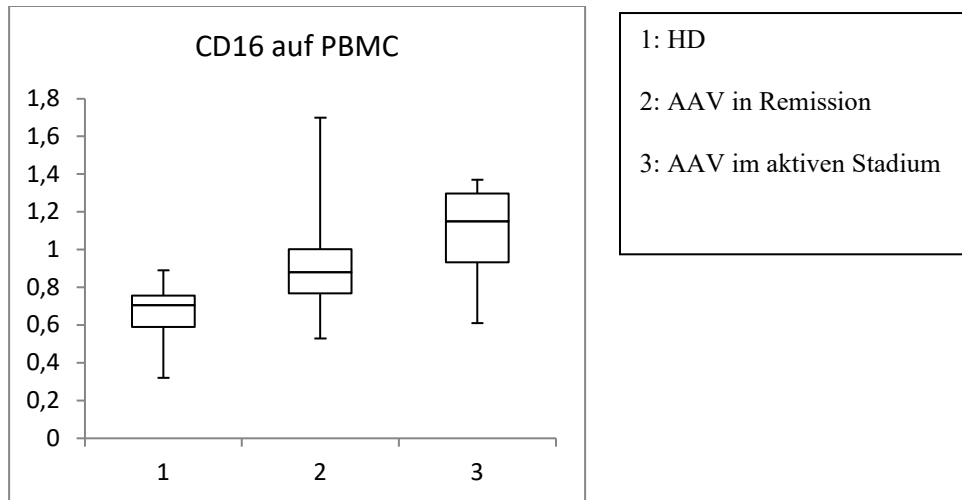
**Abb. 42** Boxplot CD32 auf der Oberfläche von PMN. 1. HD: MFI-Mittelwert 99,89. 2. Remission: MFI-Mittelwert 103,73. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 139,73.  $Z_{HD/aAAV} -1,47 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 18 (> Ukrit. 13)$ ,  $p > 0,05$ .  $Z_{HD/rAAV} -0,19 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 45,5 (> Ukrit. 22)$ ,  $p > 0,05$ .  $Z_{rAAV/aAAV} -1,58 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 27,5 (> Ukrit. 22)$ ,  $p > 0,05$ .



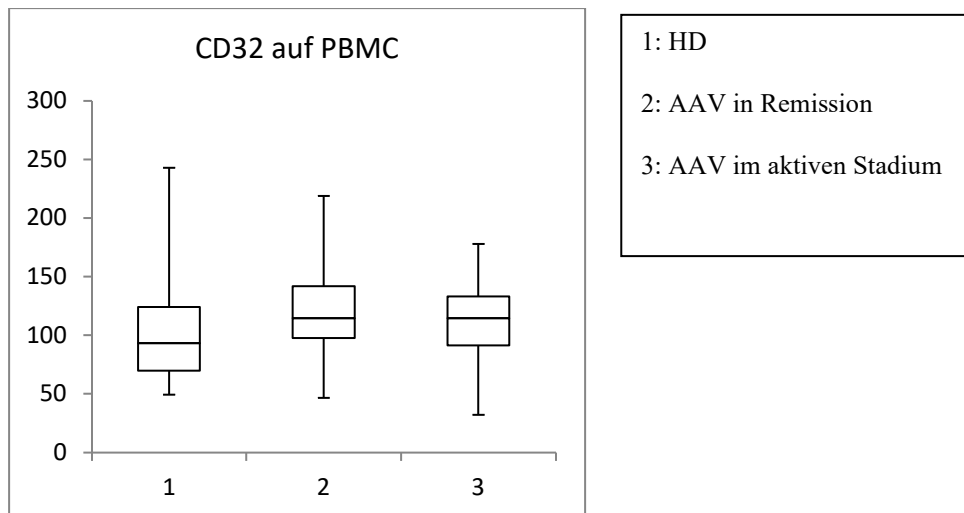
**Abb. 43** Boxplot CD16 auf der Oberfläche von PMN. 1. HD: MFI-Mittelwert 51,08. 2. Remission: MFI-Mittelwert 42,94. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 40,80.  $Z_{HD/aAAV} -0,53 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 27 (> Ukrit. 13)$ ,  $p > 0,05$ .  $Z_{HD/rAAV} -0,46 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 42 (> Ukrit. 22)$ ,  $p > 0,05$ .  $Z_{rAAV/aAAV} -0,12 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 46,5 (> Ukrit. 22)$ ,  $p > 0,05$ .

Für CD16 und CD 32 bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kollektiven.

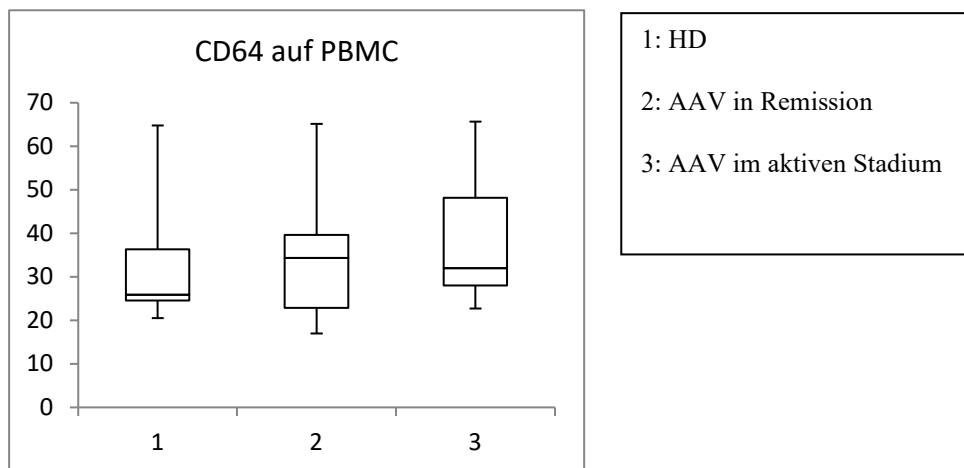
Bei den Monozyten wies der Marker CD16 im Vergleich der aktiven AAV-Patienten\*innen (MFI-Mittelwert 1,1) mit den gesunden Kontrollen (MFI-Mittelwert 0,7) und den Patienten\*innen in Remission (MFI-Mittelwert 0,9) und den gesunden Kontrollen signifikant höhere MFI seitens der AAV-Patienten\*innen auf (Z HD/ aAAV -2,52 [-1,96; +1,96], Z HD/ rAAV -2,35, [-1,96; +1,96]).



**Abb. 44** Boxplot CD16 auf der Oberfläche von PBMC. 1. HD: MFI-Mittelwert 0,66. 2. Remission: MFI-Mittelwert 0,93. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 1,09. Z HD/ aAAV -2,52 [-1,96; +1,96],  $\min(U)$  8 ( $< U_{\text{krit. 13}}$ ),  $p < 0,05$ . Z HD/ rAAV -2,35 [-1,96; +1,96],  $\min(U)$  17,5 ( $< U_{\text{krit. 22}}$ ),  $p < 0,05$ . Z rAAV/ aAAV -1,5 [-1,96; +1,96],  $\min(U)$  28,5 ( $> U_{\text{krit. 22}}$ ),  $p > 0,05$ .



**Abb. 45** Boxplot CD32 auf der Oberfläche von PBMC. 1. HD: MFI-Mittelwert 111,19. 2. Remission: MFI-Mittelwert 123,21. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 111,06.  $Z_{HD/aAAV} -0,53 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 27 (> Ukrit. 13)$ ,  $p > 0,05$ .  $Z_{HD/rAAV} -0,93 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 36 (> Ukrit. 22)$ ,  $p > 0,05$ .  $Z_{rAAV/aAAV} -0,31 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 44 (> Ukrit. 22)$ ,  $p > 0,05$ .



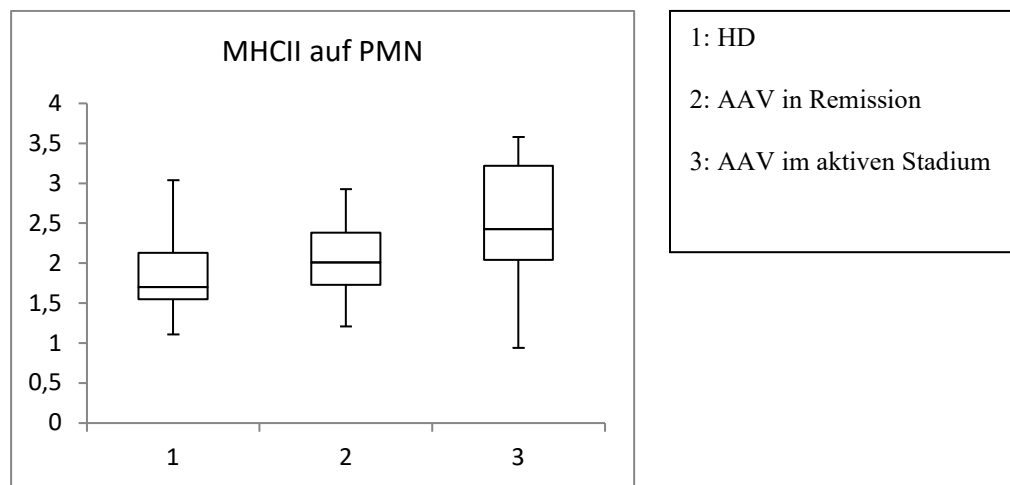
**Abb. 46** Boxplot CD64 auf der Oberfläche von PBMC. 1. HD: MFI-Mittelwert 32,83. 2. Remission: MFI-Mittelwert 33,38. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 38,04.  $Z_{HD/aAAV} -0,84 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 23 (> Ukrit. 13)$ ,  $p > 0,05$ .  $Z_{HD/rAAV} -0,08 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 47 (> Ukrit. 22)$ ,  $p > 0,05$ .  $Z_{rAAV/aAAV} -0,73 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 38,5 (> Ukrit. 22)$ ,  $p > 0,05$ .

Entsprechende Unterschiede konnten für die Marker CD32 und CD64 nicht festgestellt werden.

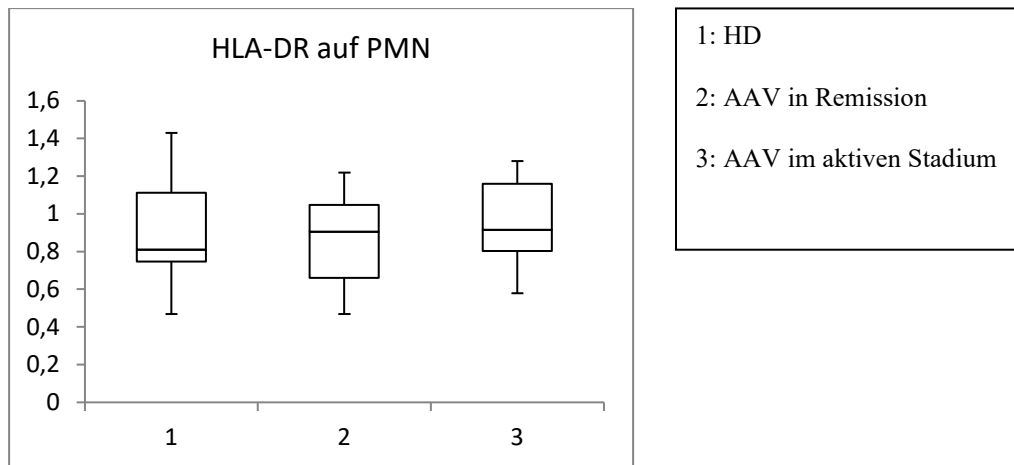
Bei der Betrachtung der Fc-Rezeptoren zeigte sich demnach die höchste Expression von CD64 auf der Oberfläche der Neutrophilen und von CD16 auf der Monozytenoberfläche in der Gruppe der aktiven Erkrankten. Patienten\*innen in Remission zeigten allerdings in Relation zu den gesunden Kontrollen weiterhin ein signifikant erhöhtes Vorkommen beider Marker.

### 3.2.4 Analyse der Marker MHCII und HLA-DR

Bei den PMN zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Marker MHCII und HLA-DR zwischen den einzelnen Gruppen, wobei sich diese auch erwartungsgemäß nur als gering exprimiert darstellten.



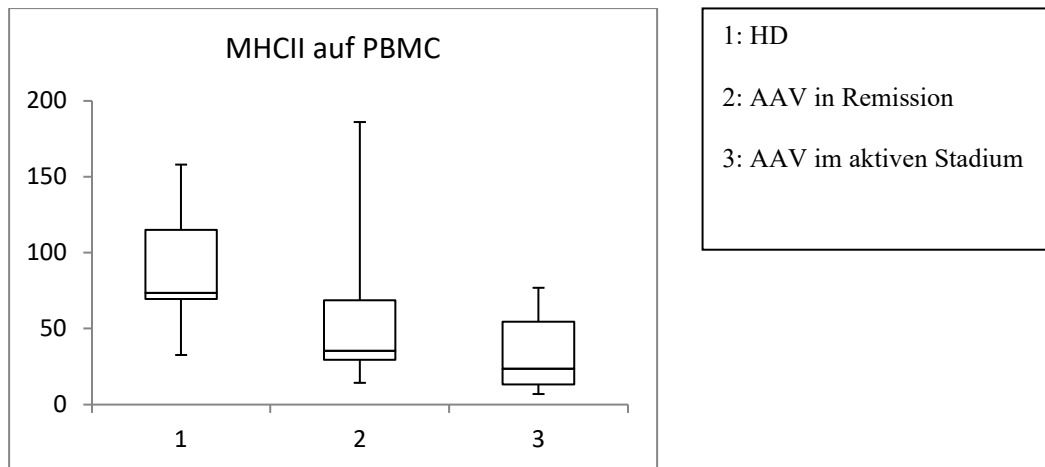
**Abb. 47** Boxplot MHCII auf der Oberfläche von PMN. 1. HD: MFI-Mittelwert 1,89. 2. Remission: MFI-Mittelwert 2,03. 3. Aktive Patient\*innen: MFI-Mittelwert 2,44. Z HD/ aAAV -1,26 [-1,96; +1,96], min(U) 20 (> Ukrit. 13),  $p > 0,05$ . Z HD/ rAAV -0,62 [-1,96; +1,96], min(U) 40 (>Ukrit. 22),  $p > 0,05$ . Z rAAV/ aAAV -1,16 [-1,96; +1,96], min(U) 33 (>Ukrit. 22),  $p > 0,05$ .



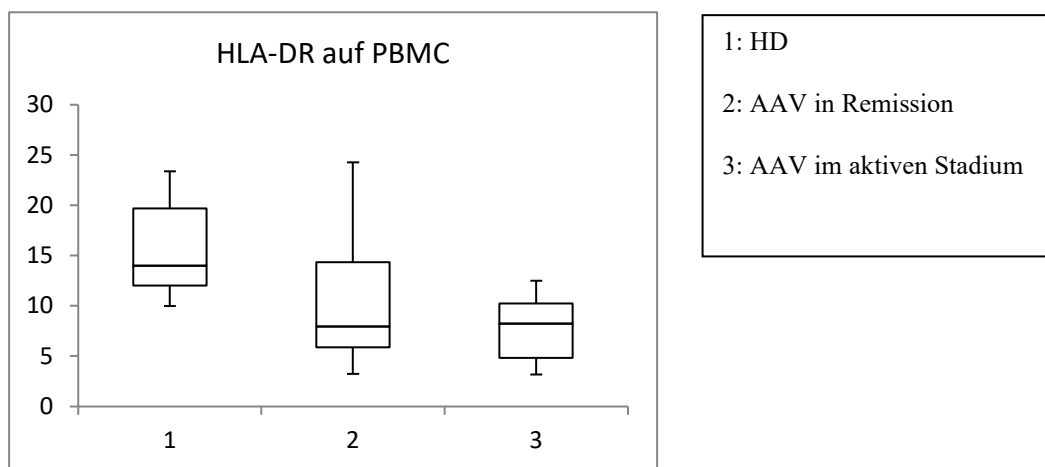
**Abb. 48** Boxplot HLA-DR auf der Oberfläche von PMN. 1. HD: MFI-Mittelwert 0,90. 2. Remission: MFI-Mittelwert 0,87. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 0,95. Z HD/ aAAV -0,63 [-1,96; +1,96], min(U) 25 (> Ukrit. 13),  $p > 0,05$ . Z HD/ rAAV -0 [-1,96; +1,96], min(U) 45 (>Ukrit. 22),  $p > 0,05$ . Z rAAV/ aAAV -0,54 [-1,96, +1,96], min(U) 38 (>Ukrit. 22),  $p > 0,05$ .

Bei den Monozyten fanden sich signifikant verminderte MFI-Werte sowohl für HLA-DR als auch für MHCII in der Gruppe der aktiven Patienten\*innen (MFI-Mittelwert HLA-DR 7,8, MFI-Mittelwert MHCII 33,5) jeweils im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (MFI-Mittelwert HLA-DR 15,7, MFI-Mittelwert MHCII 88,7), (MHCII Z HD/ aAAV -2,63 [-1,96; +1,96], HLA-DR Z HD/ aAAV -2,84 [-1,96; +1,96]). In der Gegenüberstellung der Patienten\*innen in Remission (MFI-Mittelwert HLA-DR 10,3, MFI-Mittelwert MHCII 57,6) und den Gesunden konnte keine unterschiedliche Expression von MHCII und HLA-DR beobachtet werden.

Die Intensität der beiden Marker fiel in den Patientengruppen geringer aus im Vergleich zu den gesunden Probanden\*innen, mit dem niedrigsten Wert im Kollektiv der aktiven Erkrankten.



**Abb. 49** Boxplot MHCII auf der Oberfläche von PBMC. 1. HD: MFI-Mittelwert 88,73. 2. Remission: MFI-Mittelwert 57,58. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 33,47.  $Z_{HD/aAAV} -2,63 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 7 (< U_{krit.} 13)$ ,  $p < 0,05$ .  $Z_{HD/rAAV} -1,85 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 25 (> U_{krit.} 22)$ ,  $p > 0,05$ .  $Z_{rAAV/aAAV} -1,47 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 29 (> U_{krit.} 22)$ ,  $p > 0,05$ .

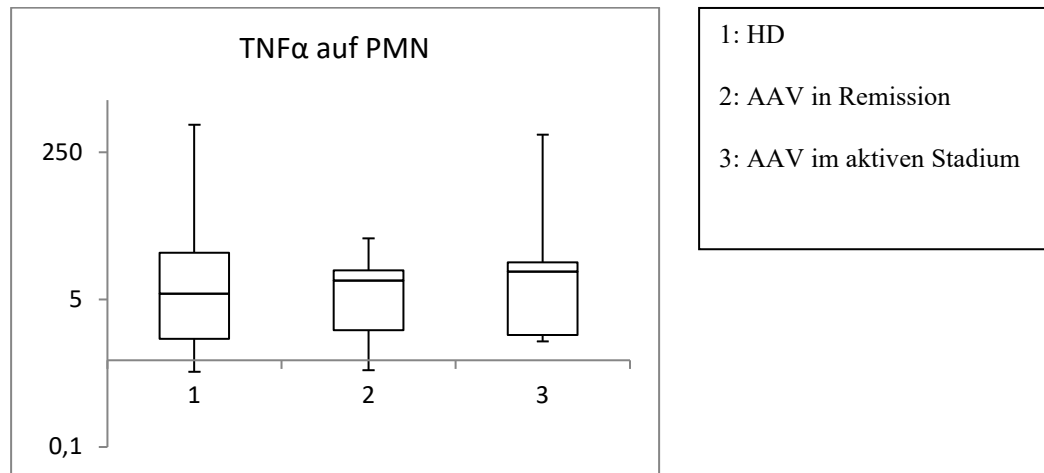


**Abb. 50** Boxplot HLA-DR auf der Oberfläche von PBMC. 1. HD: MFI-Mittelwert 15,71. 2. Remission: MFI-Mittelwert 10,25. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 7,84.  $Z_{HD/aAAV} -2,84 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 4 (< U_{krit.} 13)$ ,  $p < 0,05$ .  $Z_{HD/rAAV} -1,85 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 23 (> U_{krit.} 22)$ ,  $p > 0,05$ .  $Z_{rAAV/aAAV} -0,77 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 38 (> U_{krit.} 22)$ ,  $p > 0,05$ .

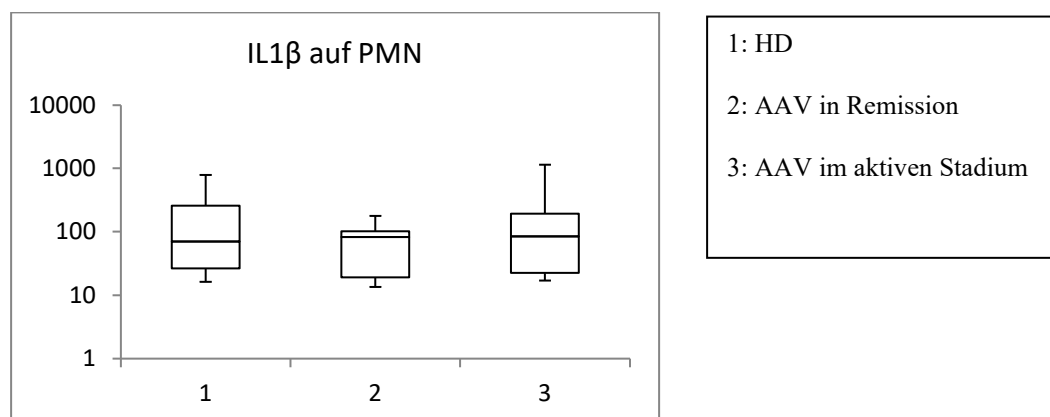
Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass in aktiven Patienten\*innen Monozyten die niedrigste Expression an MHCII und HLA-DR-Molekülen auf der Zelloberfläche aufweisen.

### 3.2.5 Analyse der intrazellulären Marker

Bei der Analyse der intrazellulären Marker der PMN ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen detektieren.



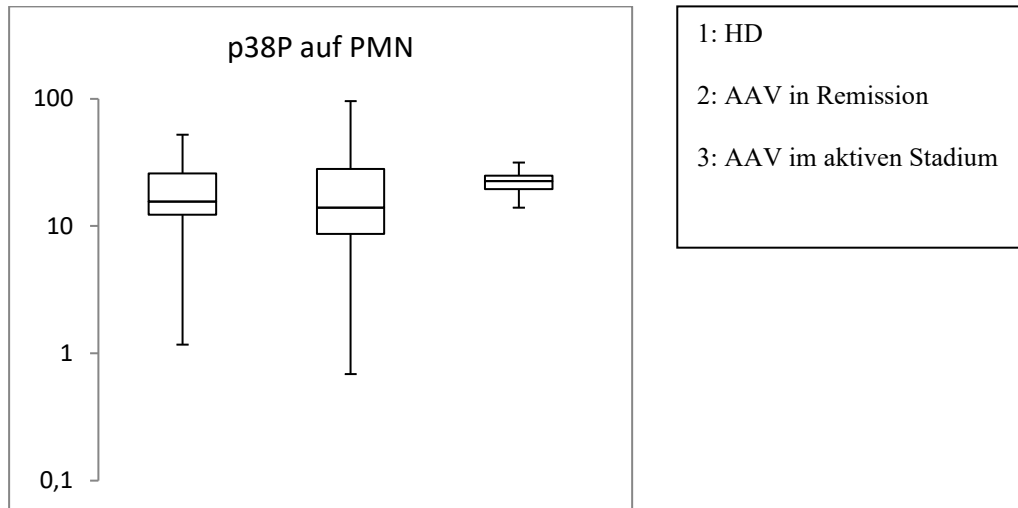
**Abb. 51** Boxplot intrazelluläres TNFα in PMN. 1. HD: MFI-Mittelwert 72,47. 2. Remission: MFI-Mittelwert 8,10. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 56,90.  $Z_{HD/aAAV} -0,32 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 29 (> U_{krit. 13})$ ,  $p > 0,05$ .  $Z_{HD/rAAV} -0,15 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 46 (> U_{krit. 22})$ ,  $p > 0,05$ .  $Z_{rAAV/aAAV} -0,77 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 38 (> U_{krit. 22})$ ,  $p > 0,05$ .



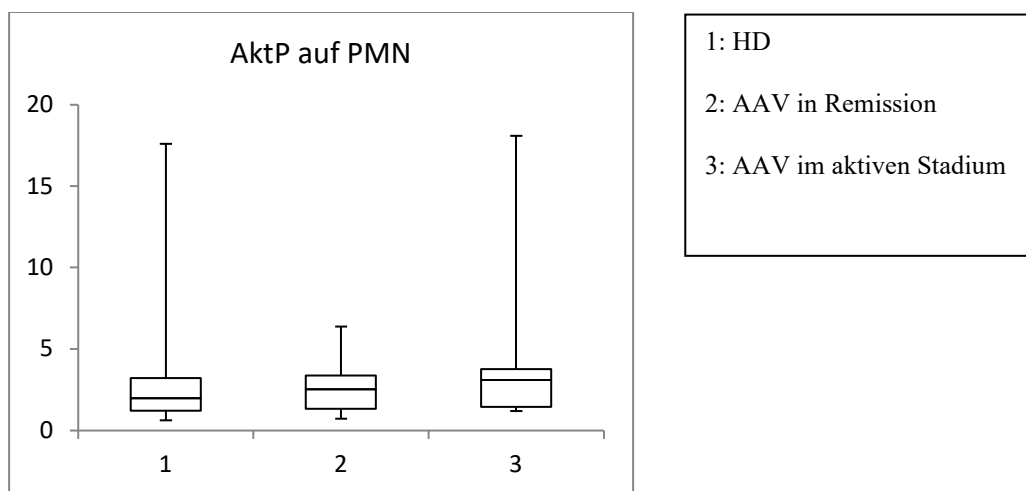
**Abb. 52** Boxplot intrazelluläres IL1β in PMN. 1. HD: MFI-Mittelwert 221,44. 2. Remission: MFI-Mittelwert 71,28. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 247,14.  $Z_{HD/aAAV} 0,21 [-1,96; +1,96]$ ,



$\min(U)$  34 ( $> U_{krit. 13}$ ),  $p > 0,05$ .  $Z_{HD/rAAV}$  -0,62 [-1,96; +1,96],  $\min(U)$  40 ( $> U_{krit. 22}$ ),  $p > 0,05$ .  
 $Z_{rAAV/aAAV}$  -0,39 [-1,96; +1,96],  $\min(U)$  43 ( $> U_{krit. 22}$ ),  $p > 0,05$ .

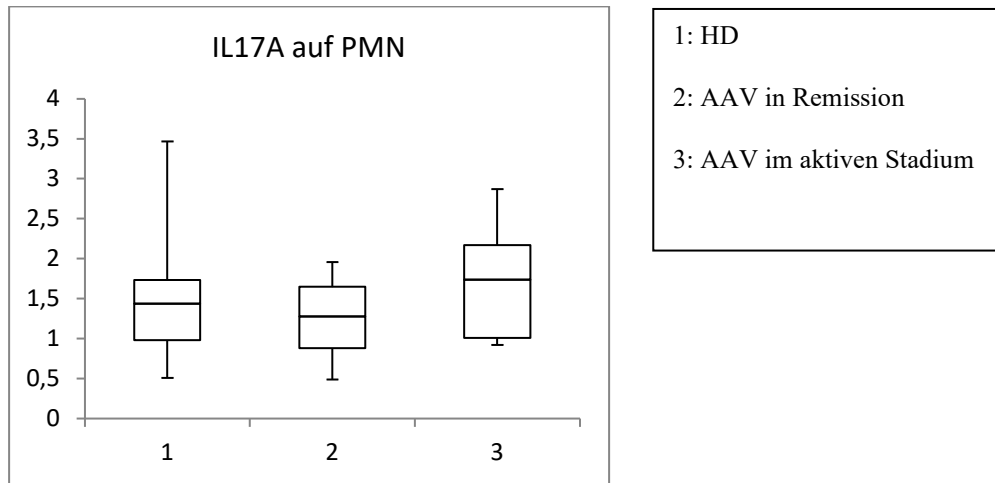


**Abb. 53** Boxplot intrazelluläres p38P in PMN. 1. HD: MFI-Mittelwert 19,96. 2. Remission: MFI-Mittelwert 27,84. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 22,43.  $Z_{HD/aAAV}$  -1,05 [-1,96; +1,96],  $\min(U)$  22 ( $> U_{krit. 13}$ ),  $p > 0,05$ .  $Z_{HD/rAAV}$  -0,31 [-1,96; +1,96],  $\min(U)$  44 ( $> U_{krit. 22}$ ),  $p > 0,05$ .  $Z_{rAAV/aAAV}$  -1,62 [-1,96; +1,96],  $\min(U)$  27 ( $> U_{krit. 22}$ ),  $p > 0,05$ .

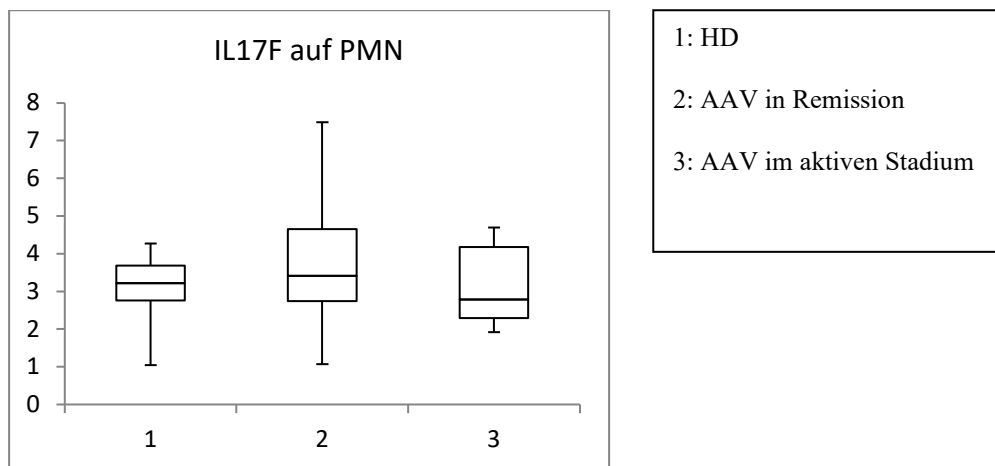


**Abb. 54** Boxplot intrazelluläres AktP in PMN. 1. HD: MFI-Mittelwert 3,96. 2. Remission: MFI-Mittelwert 2,53. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 4,50.  $Z_{HD/aAAV}$  -0,84 [-1,96; +1,96],

$\min(U)$  24 ( $> U_{\text{krit. 13}}$ ),  $p > 0,05$ .  $Z_{HD/rAAV}$  -0,15 [-1,96; +1,96],  $\min(U)$  46 ( $> U_{\text{krit. 22}}$ ),  $p > 0,05$ .  
 $Z_{rAAV/aAAV}$  -0,81 [-1,96, +1,96],  $\min(U)$  36 ( $> U_{\text{krit. 22}}$ ),  $p > 0,05$ .



**Abb. 55** Boxplot intrazelluläres IL17A in PMN. 1. HD: MFI-Mittelwert 1,54. 2. Remission: MFI-Mittelwert 1,25. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 1,72.  $Z_{HD/aAAV}$  -0,63 [-1,96; +1,96],  $\min(U)$  26 ( $> U_{\text{krit. 13}}$ ),  $p > 0,05$ .  $Z_{HD/rAAV}$  -0,46 [-1,96; +1,96],  $\min(U)$  42 ( $> U_{\text{krit. 22}}$ ),  $p > 0,05$ .  $Z_{rAAV/aAAV}$  -1,54 [-1,96, +1,96],  $\min(U)$  28 ( $> U_{\text{krit. 22}}$ ),  $p > 0,05$ .

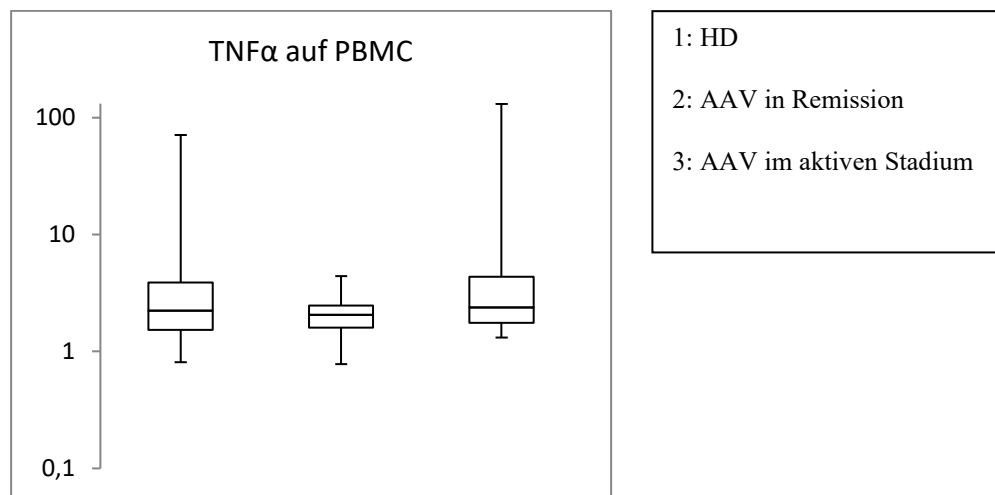


**Abb. 56** Boxplot intrazelluläres IL17F in PMN. 1. HD: MFI-Mittelwert 3,06. 2. Remission: MFI-Mittelwert 3,74. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 3,17.  $Z_{HD/aAAV}$  0 [-1,96; +1,96],  $\min(U)$  31 ( $> U_{\text{krit. 13}}$ ),  $p > 0,05$ .  $Z_{HD/rAAV}$  -0,93 [-1,96; +1,96],  $\min(U)$  36 ( $> U_{\text{krit. 22}}$ ),  $p > 0,05$ .  $Z_{rAAV/aAAV}$  -0,54 [-1,96, +1,96],  $\min(U)$  41 ( $> U_{\text{krit. 22}}$ ),  $p > 0,05$ .

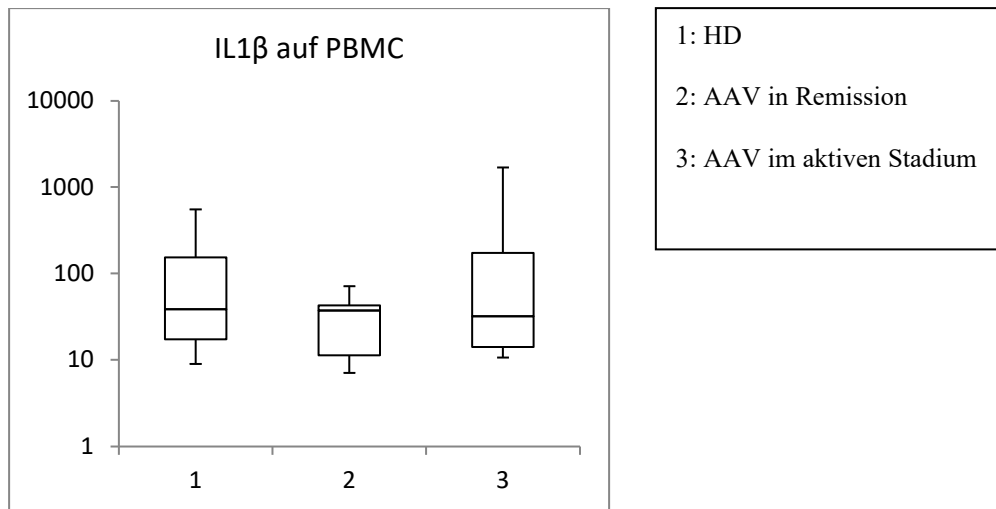
Bei den Monozyten wies der Marker IL17A im Vergleich der aktiven Patienten\*innen (MFI-Mittelwert 1,1) und der Patienten\*innen in Remission (MFI-Mittelwert 0,74) einen signifikanten Unterschied auf (Z rAAV/ aAAV -2,08 [-1,96, +1,96]). Die MFI zeigte sich auf Seiten der aktiven Patienten\*innen signifikant höher.

Der MFI-Mittelwert von IL1 $\beta$  war in der Gruppe der aktiven Erkrankten (MFI-Mittelwert 301,5) nicht-signifikant höher als in der Gruppe der Patienten\*innen in Remission (MFI-Mittelwert 31,5) und den gesunden Kontrollen (147,1) gemäß dem Mann-Whitney-U-Test (Z HD/ aAAV -0, 11 [-1,96; +1,96], Z rAAV/ aAAV -0,15 [-1,96, +1,96]).

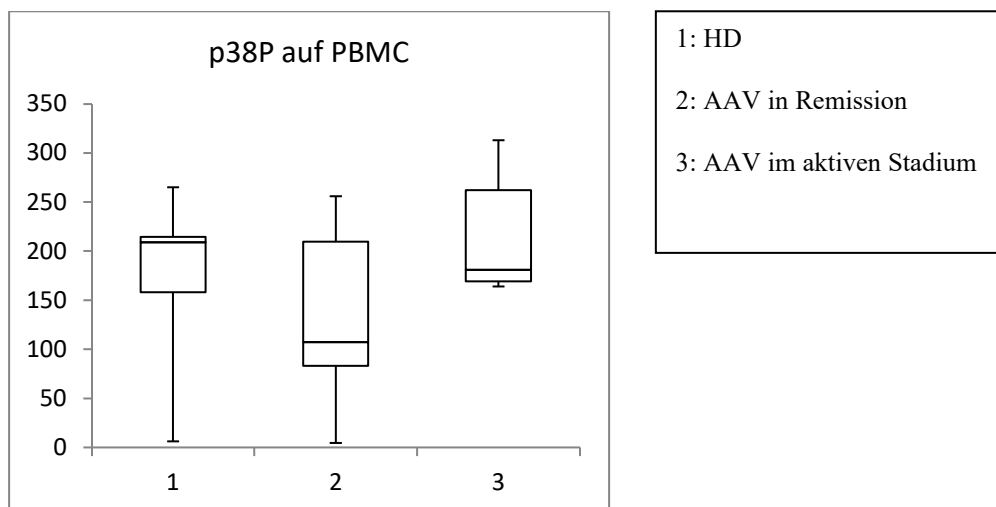
Auch der Marker p38P zeigte keine signifikanten Unterschiede.



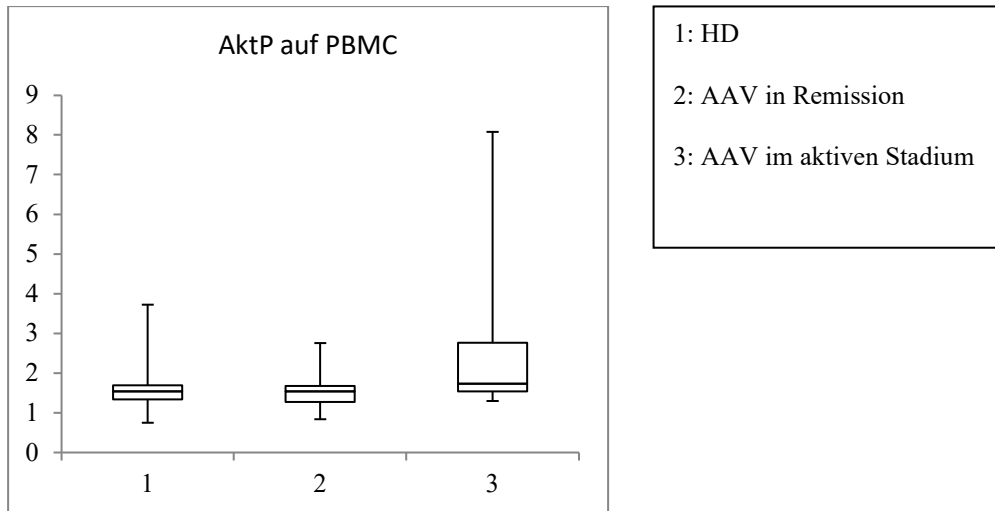
**Abb. 57** Boxplot intrazelluläres TNF $\alpha$  in PBMC. 1. HD: MFI-Mittelwert 10,95. 2. Remission: MFI-Mittelwert 2,17. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 18,69. Z HD/ aAAV -0, 42 [-1,96; +1,96], min(U) 28 (> Ukrit. 13),  $p > 0,05$ . Z HD/ rAAV -0,31 [-1,96; +1,96], min(U) 42 (>Ukrit. 22),  $p > 0,05$ . Z rAAV/ aAAV -0,77 [-1,96, +1,96], min(U) 38 (>Ukrit. 22),  $p > 0,05$ .



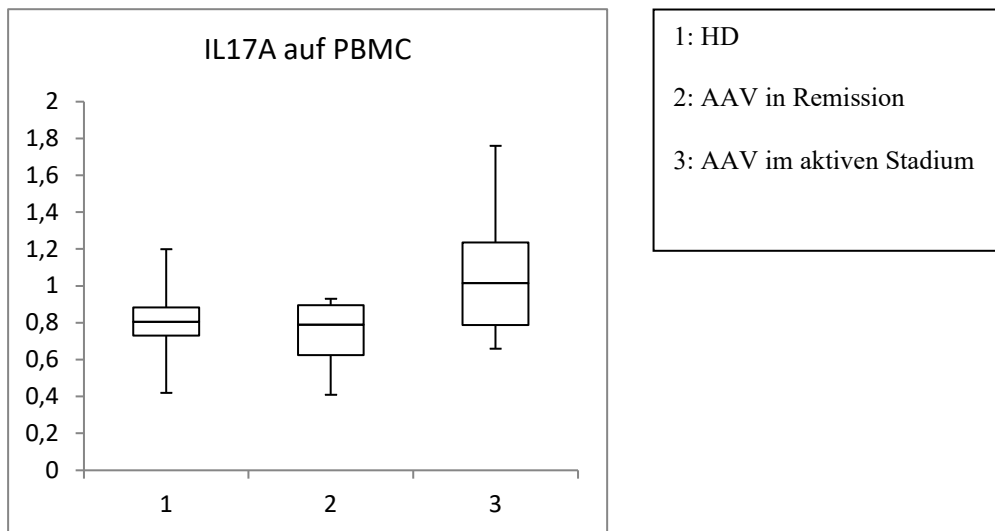
**Abb. 58** Boxplot intrazelluläres  $IL1\beta$  in PBMC. 1. HD: MFI-Mittelwert 147,05. 2. Remission: MFI-Mittelwert 31,53. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 301,45. Z HD/ aAAV -0,11 [-1,96; +1,96],  $\min(U)$  31 ( $> Ukrit. 13$ ),  $p > 0,05$ . Z HD/ rAAV -1 [-1,96; +1,96],  $\min(U)$  35 ( $> Ukrit. 22$ ),  $p > 0,05$ . Z rAAV/ aAAV -0,15 [-1,96; +1,96],  $\min(U)$  45 ( $> Ukrit. 22$ ),  $p > 0,05$ .



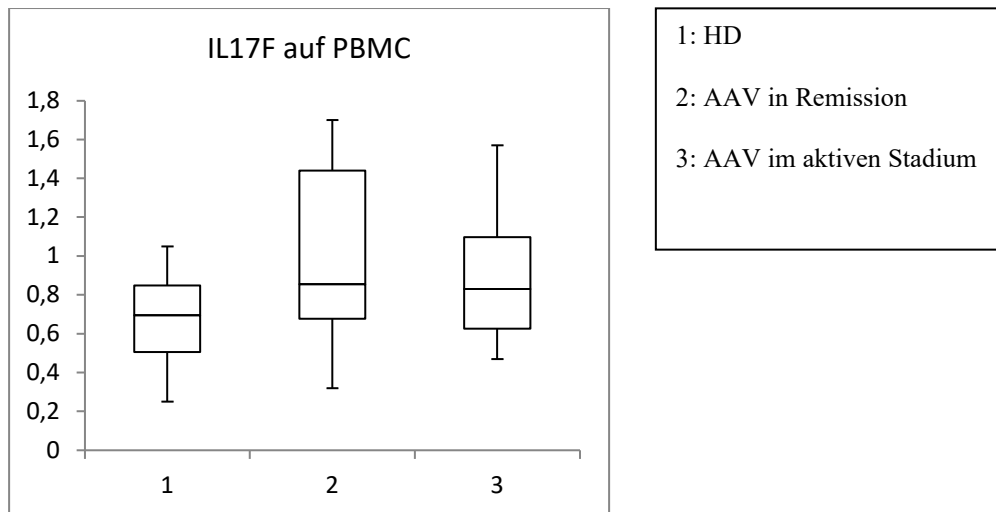
**Abb. 59** Boxplot intrazelluläres p38P in PBMC. 1. HD: MFI-Mittelwert 178,17. 2. Remission: MFI-Mittelwert 128,60. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 215,88. Z HD/ aAAV -0,42 [-1,96; +1,96],  $\min(U)$  27 ( $> Ukrit. 13$ ),  $p > 0,05$ . Z HD/ rAAV -1,31 [-1,96; +1,96],  $\min(U)$  31 ( $> Ukrit. 22$ ),  $p > 0,05$ . Z rAAV/ aAAV -1,77 [-1,96; +1,96],  $\min(U)$  25 ( $> Ukrit. 22$ ),  $p > 0,05$ .



**Abb. 60** Boxplot intrazelluläres  $IL1\beta$  in AktP in PBMC. 1. HD: MFI-Mittelwert 1,70. 2. Remission: MFI-Mittelwert 1,54. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 2,68. Z HD/ aAAV  $-1,16 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U)$  20 ( $> Ukrit.$  13),  $p > 0,05$ . Z HD/ rAAV  $0,08 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U)$  47 ( $> Ukrit.$  22),  $p > 0,05$ . Z rAAV/ aAAV  $-1,39 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U)$  29 ( $> Ukrit.$  22),  $p > 0,05$ .



**Abb. 61** Boxplot intrazelluläres  $IL17A$  in PBMC. 1. HD: MFI-Mittelwert 0,81. 2. Remission: MFI-Mittelwert 0,74. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 1,07. Z HD/ aAAV  $-1,31 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U)$  18,5 ( $> Ukrit.$  13),  $p > 0,05$ . Z HD/ rAAV  $-0,5 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U)$  41,5 ( $> Ukrit.$  22),  $p > 0,05$ . Z rAAV/ aAAV  $-2,08 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U)$  21 ( $< Ukrit.$  22),  $p < 0,05$ .



**Abb. 62** Boxplot intrazelluläres IL17F in PBMC. 1. HD: MFI-Mittelwert 0,68. 2. Remission: MFI-Mittelwert 0,99. 3. Aktive Patienten\*innen: MFI-Mittelwert 0,90.  $Z_{HD/aAAV} -1,05 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 22 (> Ukrit. 13)$ ,  $p > 0,05$ .  $Z_{HD/rAAV} -1,2 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 32,5 (> Ukrit. 22)$ ,  $p > 0,05$ .  $Z_{rAAV/aAAV} -0,35 [-1,96; +1,96]$ ,  $\min(U) 43,5 (> Ukrit. 22)$ ,  $p > 0,05$ .

## 4. Diskussion

### 4.1 Methodendiskussion

Die durch aktivierte neutrophile Granulozyten und Monozyten ablaufende Degranulation lytischer Enzyme und die Freisetzung aktiver O<sub>2</sub>-Radikale bilden Schlüsselpunkte in der Entstehung einer ANCA assoziierten Vaskulitis. Gleichzeitig sind das die Endpunkte eines vielschichtigen Prozesses beginnend mit dem Priming der Neutrophilen und Monozyten und resultierend in der Destruktion der Gefäßwände. Die einzelnen Schritte dazwischen wurden vielseitig beforscht, sind jedoch nach wie vor nicht gänzlich verstanden.

ANCA konnten auch in gesunden Individuen nachgewiesen werden (85). Weshalb kam es in diesen Fällen nicht zur Entwicklung einer ANCA assoziierten Vaskulitis? Wie determinierend ist der Einfluß der anderen Faktoren auf die Entstehung der Erkrankung? Im Fokus zur Entschlüsselung der

Pathogenese stehen nicht nur die ANCA selbst sondern auch die Mechanismen hinter der Aktivierung der Effektorzellen, dem Instandhalten dieser Aktivierung, der Adhäsion der Zellen an das Endothel und schließlich auch die intrazellulär ablaufenden Kaskaden. Aus dem Pool der Integrine, Komplementfaktoren, Fc-Rezeptoren, MHC-Moleküle sowie bestimmter intrazellulärer Proteine traten im Laufe der Jahre bestimmte Vertreter der einzelnen Proteinklassen als Hauptverdächtige in den Vordergrund.

In der vorliegenden Arbeit wurde aus diesem Pool ein Panel an Oberflächen- und intrazellulären Markern erstellt und eine Methode zur Multiparameter-Analyse der Effektorzellen etabliert. Dahinter stand die Idee, ein Protokoll zu konzipieren, welches anhand der gewählten Marker erlaubt, die Vorstellung einer potentiellen AAV prädisponierenden Subpopulation in den Reihen der Neutrophilen und Monozyten zu untersuchen. Durch den Vergleich der gesunden Kontrollen mit dem Patientenkollektiv sollte die Frage geklärt werden, ob die Neutrophilen und Monozyten der AAV-Patienten\*innen ein spezifisches Auftreten der entsprechenden Marker aufweisen und gemäß dem Fall, ob dieses Auftreten ein stabiles Muster zeigt, das Hinweise auf eine spezifische Subpopulation geben könnte.

Da eine Multiparameter-Analyse mit dem Einsatz von schlussendlich 26 verschiedenen Markern geplant war, konnte eine Untersuchung rein auf Basis der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie nicht erfolgen. Gewählt wurde ein CyTOF basierter Aufbau, der Charakteristika der Massenzytometrie mit Aspekten der Durchflusszytometrie vereint und den Einsatz einer größeren Menge an Antikörpern ermöglicht. Das hierfür bereits existierende Original-DVS-Protokoll wurde entsprechend der Fragestellung angepasst und modifiziert.

Die Ergebnisse des Etablierungsprozesses zeigten, dass, um einen Verlust der Oberflächenmarker durch die Porenbildung im Zuge der Permeabilisierung zu reduzieren, eine hinreichende Stabilisierung der Oberfläche vorgeschaltet werden musste. Diese Stabilisierung konnte durch eine längere Fixierung der Zellen über Nacht in 4% PFA erreicht werden. Hierfür wurde das Protokoll auf zwei Tage ausgedehnt mit der Färbung der Zelloberfläche am ersten Tag, der folgenden Fixierung über Nacht und der Färbung der intrazellulären Marker am Folgetag. Neben der zeitlichen Ausdehnung des Original-Protokolls wurden auch die fixierenden und permeabilisierenden Medien ausgetauscht. Anhand der Resultate aus dem Methodenvergleich wurde der Fix1 Puffer durch 4%

PFA ersetzt. Anstelle von Perm-S fand 0,3% Saponin Anwendung. Die Differenzen zwischen den jeweiligen Medien präsentierten sich visuell jedoch nicht gravierend.

Durch das Original-DVS-Protokoll konnten allerdings im Zuge der Methodenetablierung reproduzierbar die besseren Ergebnisse bezüglich der Darstellbarkeit der intrazellulären Marker erzielt werden. Diskutiert wurde, ob eine längere Fixierung der Zellen zugunsten der Oberfläche einen negativen Einfluß auf die Porenbildung und somit die intrazelluläre Färbung hat. Ein Grund für das schlechtere intrazelluläre Signal u.a. von AktP und IL1 $\beta$  könnte eine instabile Porenbildung und ein hieraus resultierendes Nicht-Erreichen des Ziel-Antigens im Zellinneren sein. Dies würde die besseren Ergebnisse der „leichteren“ Fixierung bezüglich AktP, TNF $\alpha$  und IL1 $\beta$  erklären. Die Darstellung von IL-17A und IL-17F gestaltete sich während des gesamten Untersuchungsverlaufes, protokollunabhängig schwierig. Ein Erklärungsansatz könnte die Fokussierung des Protokolls auf PMN und Monozyten sein. Eine Isolierung und Differenzierung der IL-17 produzierenden TH17-Lymphozyten war nicht Teil der Methode. Allerdings zeigen Studien, dass auch ANCA aktivierte Neutrophile vermehrt IL-17 produzieren (88). Das deckte sich nicht mit den Ergebnissen dieser Arbeit.

## 4.2 Ergebnisdiskussion

### 4.2.1 Integrine und CD117

Das Hauptcharakteristikum der Vaskulitis ist die inflammatorische Zerstörung der Gefäßwand. Nach Aktivierung der Neutrophilen und Monozyten durchlaufen die Zellen einen koordinierten Prozess, der sie letztendlich zur transendothelialen Migration und inflammatorischen Destruktion der Gefäße befähigt. Dieser Endpunkt stützt sich u.a. auf Integrine.

Es gibt Hinweise, dass CD11b/CD18 in den Prozess der Migration involviert ist (89, 90). Als Mitglied der  $\beta$ 2-Integrin-Familie wird CD11b/ CD18 u.a. auf Neutrophilen und Monozyten exprimiert. Im Zuge der Aktivierung der Zellen wird auch eine Veränderung der  $\beta$ 2-Integrine bewirkt welches folgend die Interaktion mit den Rezeptoren des Endothels begünstigt und erst ermöglicht. Die Bedeutung von CD11b/ CD18 auf die Stabilität der Interaktion wurde in Experimenten mit Monozyten und Granulozyten aufgezeigt. Es entstand die Hypothese, dass der initiale Kontakt



zwischen Zellen und Endothel durch CD11a/ CD18 vermittelt wird, während CD11b/ CD18 für die Stabilisierung im Verlauf verantwortlich ist. Eine Blockade von CD18 bzw. CD11a oder CD11b führte zu einer Zunahme des Rollens der Zellen und einer Abnahme der Immobilisierung, was insgesamt mit einer Reduktion der Neutrophilen-Endothel-Interaktion assoziiert ist (91, 92).

Die Hoch-Regulation der Integrine auf der Zelloberfläche ist Studien zufolge abhängig von der Aktivierung dieser Zellen und wurde für CD18, CD11a und CD11b in aktiven Patienten\*innen beobachtet (89, 93-99). Einige postulieren sogar eine Abnahme der Expression im Zuge der Behandlung (89). Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte ein tendenziell höheres Signal für CD11b im Vergleich zwischen aktiven und sich in Remission-befindlichen Patienten\*innen (PMN) und auch zwischen aktiven Erkrankten und Gesunden bzw. dem inaktiven Krankheitsstadium (PBMC) detektiert werden. Signifikant präsentierten sich die Unterschiede allerdings am ehesten aufgrund der geringen Fallzahlen nicht. Einen Erklärungsansatz könnte auch die Arbeit von Naomi Rebeck und Adam Finn liefern. In einem Vergleich der Integrinexpression auf der PMN-Oberfläche unterschiedlicher gesunder Probanden\*innen zeigte sich eine angeborene hohe Variabilität zwischen und innerhalb der Individuen (100). Diese große Spannbreite könnte eine Gegenüberstellung von Gesunden und Erkrankten erschweren. Zudem wird die Adhäsion über CD11b modellhaft als ein relativ stabiler Prozess beschrieben, sodass die Proben aus dem peripheren Blut die Zellen, die das Blut bereits verlassen haben, nicht einschließen.

PR3, welches als eines der beiden Antigene für die ANCA agiert, befindet sich in ruhenden Neutrophilen v.a. in deren azurophilen Granula. Daneben konnte auch eine membrangebundene Form detektiert werden. Innerhalb der Bevölkerung umspannt die membrangebundene Expression 0-100%. Intraindividuell verhält sie sich konstant (57).

CD177 ist ein Neutrophilen spezifisches GPI-verankertes Glykoprotein. Seine Expression umfasst ähnlich der PR3 ebenso eine große Spannbreite bezüglich Lokalisation in der Granula oder integriert in die Membran. Eine Kolo-kalisation beider Proteine konnte nachgewiesen werden und letztlich konnte CD177 als der PR3-Membranrezeptor etabliert werden (63).

Eine vergleichende Studie über die Expression von CD177 und PR3 auf Neutrophilen in AAV-Patienten\*innen in Gegenüberstellung mit gesunden Probanden\*innen und anderen autoimmunologischen Erkrankungen demonstrierte ein höheres Auftreten von verstärkt

membrangebundenem PR3 (mPR3) in Assoziation mit CD177 (mPR3<sup>high</sup>/ CD177+) in AAV-Patienten\*innen. Allerdings zeigten die CD177 negativen (CD177-) Neutrophilen nach einem Priming-Prozess ebenso ein erhöhtes Auftreten von mPR3. Die Neutrophilenaktivierung konnte demzufolge unabhängig von den Mechanismen der CD177 gebundenen PR3-Präsentation induziert werden. Das gibt Hinweise darauf, dass die Präsentation von PR3 durch CD177 nicht zwangsläufig notwendig ist für eine anti-PR3-ANCA assoziierte Neutrophilenaktivierung. Die CD177-Expression ist zudem unabhängig von der Schwere, Dauer und Therapie der Erkrankung (101).

Signifikante Unterschiede in der Expression von CD177 zwischen Erkrankten und Gesunden konnten in dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Die Größe der Stichprobe und die nicht berücksichtigte Unterscheidung zwischen PR3-oder MPO-ANCA assoziierter Vaskulitis limitieren allerdings die Repräsentierbarkeit der Ergebnisse.

In der Literatur wird eine Assoziation zwischen mPR3<sup>high</sup>/ CD177+ exprimierenden Neutrophilen und dem Exazerbationsrisiko der AAV beschrieben (60).

#### 4.2.2. Komplement-Rezeptoren

Basierend auf der Tatsache, dass in histologischen Untersuchungen kaum Komplementablagerungen detektiert wurden und auch das Serum der aktiven Patienten\*innen keine Anzeichen eines Komplementverbrauches aufwies, wurde der Rolle des Komplementsystems in der Pathogenese der AAV zunächst keine große Bedeutung zugesprochen (102). Im Verlauf fanden sich allerdings mehr und mehr Hinweise darauf, dass der alternative Weg der Komplementaktivierung eine Schlüsselrolle in der Entstehung der AAV einnehmen könnte (25, 43-46).

C5a ist das aktive Spaltprodukt des Komplementfaktors C5 mit chemotaktischen und anaphylaktischen Eigenschaften. Es entfaltet seine Wirkung über Interaktion mit 2 unterschiedlichen Rezeptoren: C5aR (CD88) und C5a receptor-like 2 (C5L2). Beide binden C5a mit hoher Affinität (103).

Während CD88 in Verbindung gebracht wird mit Chemotaxis, Enzymfreisetzung und Bildung von ROS, das heißt dem Anstoßen einer akuten Immunreaktion, werden bei C5L2 auch

antiinflammatorische Eigenschaften diskutiert indem es sich kompetitiv zu CD88 verhält und somit die proinflammatorischen Eigenschaften des C5a minimiert (103, 104). Diese Theorie wird kontrovers diskutiert, da auch Hinweise auf eine Mitbeteiligung an Entzündungsreaktionen existieren (105).

Die exakte Rolle von C5L2 ist noch nicht definiert, im Kontext der AAV werden jedoch proinflammatorische Eigenschaften vermutet (105).

Des Weiteren fielen bei Analysen der Blut-und Urin-Proben von AAV-Patienten\*innen sowohl im Serum als auch im Urin höhere Spiegel von C5a in der aktiven Phase auf. Dies stützt das Modell einer vermehrten Komplementaktivierung in der AAV. In Remission glichen die Spiegel denen gesunder Kontrollen (47). Histologische Untersuchungen von Biopsien aus der Niere zeigten, dass C5L2 in den Glomeruli der AAV-Patienten\*innen signifikant höher vertreten war als in gesunden Kontrollen, wohingegen die Expression von CD88 –hauptsächlich im Tubulointerstitium- stark mit der renalen Funktion und dem Ausmaß der interstitiellen Infiltration korrelierte, aber im Vergleich zu gesunden Probanden\*innen signifikant niedriger ausfiel. Der Studie nach sei der Mangel an CD88 exprimierenden Neutrophilen nicht mit einem generellen Mangel an Neutrophilen in der Niere zu erklären. Immunhistochemische Färbungen wiesen ein erhöhtes glomeruläres Auftreten von Neutrophilen in der aktiven Phase nach (47). Demnach könnte die Ursache eher in einem Verlust von CD88 gesucht werden. Das wird durch die Hypothese einer raschen Internalisierung des C5a-Rezeptors nach Kontakt zu C5a gestützt (47, 106). C5L2 zeigt keine Internalisierung nach dem Kontakt zu C5a. Die Down-Regulation von CD88 könnte somit ein Effekt der Internalisierung sein (47, 107). In Tier-Modellen schützte eine Blockade von CD88 vor der Entwicklung einer NCGN.

In dieser Arbeit konnten tendenziell höhere MFI sowohl für CD88 als auch für C5L2 auf Seiten der aktiven AAV-Patienten\*innen demonstriert werden. Bei der Betrachtung der PMN zeigte sich im Vergleich zwischen aktiven und sich in Remission-befindlichen Patienten\*innen ein signifikanter Unterschied bezüglich der Expression von CD88, in Gegenüberstellung mit den HD wurde das Signifikanzniveau allerdings nicht erreicht. Auf Seiten der PBMC war die Expression von CD88 und C5L2 im aktiven Stadium signifikant erhöht verglichen zum Stadium der Remission. Anzeichen einer Hoch-Regulation des C5L2 gäbe es demnach auch in dieser Arbeit. Die Herunter-Regulation von CD88 ließe sich anhand dieser Ergebnisse nicht bestätigen. Jedoch muss hierbei die unterschiedliche Herangehensweise berücksichtigt werden. Verwendet wurden Zellen aus dem peripheren Blut und nicht Gewebematerial aus Nierenbiopsien. Eine Internalisierung des CD88 könnte daher auch bei dem

Vergleich dieser Ergebnisse mit den bisherigen Studien eine tragende Rolle spielen. Zudem basieren viele der Experimente besonders auf Patienten\*innen mit einer MPO-AAV. Eine solche Unterscheidung wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht getroffen.

Die exakte Rolle beider Rezeptoren und deren Regulationsmechanismen bedürfen weiterer Forschung.

### 4.2.3 Fc-Rezeptoren

Nach dem Modell der Zellaktivierung ist es nicht nur erforderlich, dass der Fab-Teil der ANCA-IgG das entsprechende Antigen an der Zelloberfläche erkennt, sondern auch dass der Fc-Teil der Autoantikörper durch Fc $\gamma$ -Rezeptoren gebunden wird. Erst diese Kreuzbindung mündet in eine Zellaktivierung, bemessen an Sekretion, Phagozytose und ROS-Bildung. Die Interaktion zwischen dem Fc-Teil der ANCA und den Fc $\gamma$ -Rezeptoren der Effektorzellen wird ermöglicht, wenn der Fab-Teil der ANCA MPO bzw. PR3 erkannt hat und die Bindung ein Zellprogramm initiiert. Dabei spielt der Phänotyp der Fc $\gamma$ -Rezeptoren eine erhebliche Rolle (26, 50).

Neutrophile exprimieren mehrere strukturell und funktional unterschiedliche Fc $\gamma$ -Rezeptoren. Zweien davon wird bei der Aktivierung der Neutrophilen eine tragende Rolle zugesprochen: Fc $\gamma$ RIIA (CD32) und Fc $\gamma$ RIIIB (CD16). Dabei ist die Dichte des GPI-gebundenen Fc $\gamma$ RIIIB auf der Zelloberfläche 10-mal höher als die des transmembranen Fc $\gamma$ RIIA. Beide können unabhängig voneinander auf Basis unterschiedlicher Signalwege eine Zellaktivierung induzieren (50, 51).

Die Beteiligung des Fc $\gamma$ RIIA konnte in zahlreichen Studien demonstriert werden. Die Versuche die Bedeutung des Fc $\gamma$ RIIIB zu belegen, erwiesen sich allerdings als komplizierter, nicht zuletzt durch das rasche Abwerfen des Rezeptors nach der Zellaktivierung (26, 108). Kocher et. al. zeigten, dass auch der Fc $\gamma$ RIIIB der Neutrophilen ANCA bindet- und zwar sowohl PR3- als auch MPO-ANCA. Zudem wurde demonstriert, dass für die Interaktion mit dem Fc $\gamma$ RIIA eine höhere quantitative Verfügbarkeit von ANCA notwendig ist als für Fc $\gamma$ RIIIB (50). Im Falle eines limitierten Vorkommens an ANCA-Antigenen könnte demnach der Fc $\gamma$ RIIIB von ANCA präferiert werden. In diesem Kontext ließe sich auch die höhere Dichte des Rezeptors an der Zelloberfläche deuten. Der Vorteil der stärkeren Oberflächenexpression könnte unterstützt und getragen werden durch die Translokation des

präformierten intrazellulären FcγRIIIB-Pools an die Zelloberfläche nach der Aktivierung der Zellen. Hierauf könnte sich die Hypothese aufbauen, dass die initiale Neutrophilenaktivierung über FcγRIIIB erfolgt (50). Es wurde beobachtet, dass PR3-ANCA-Bindung an Neutrophile über FcγRIIIB eine transiente Phänotypänderung mit u.a. erhöhter Expression von CD11b und CD62L bewirkt (27). Die Signifikanz könnte somit in der transienten Induktion eines qualitativ anderen Adhäsionsphänotyps liegen. Zudem wird die Interaktion der ANCA mit den Fcγ-Rezeptoren u.a. beeinflusst von der Allel-Varianz der Fcγ-Rezeptoren. Das NA1-Allel des FcγRIIIB ist ein signifikanter Risikofaktor in der Entwicklung der GPA (27, 50).

In dieser Arbeit konnte eine signifikant höhere Expression von FcγRIIIB auf der Oberfläche von Monozyten in aktiven Patienten\*innen und Patienten\*innen in Remission im Vergleich zu gesunden Probanden\*innen beobachtet werden. Dies galt nicht für die neutrophilen Granulozyten. Ein Erklärungsansatz könnte in dem Abwerfen des Rezeptors nach der Aktivierung liegen.

Signifikante Unterschiede für FcγRIIA wurden weder auf Neutrophilen noch Monozyten dargestellt. Allerdings zeigte sich eine tendenziell höhere Expression im aktiven Krankheitsstadium, was sich mit den bisherigen Studien decken würde.

Bei CD64 handelt es sich um den Fc-Rezeptor FcγRI, welcher bei Inflammation und v.a. in septischen Zuständen hochreguliert wird. Exprimiert wird der Rezeptor auf der Oberfläche von Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen und Eosinophilen. In gesunden Individuen tragen die PMN kein oder nur wenig CD64. Im Vergleich hierzu zeigten GPA-Patienten\*innen eine höhere Expression, wobei allerdings kein Unterschied zwischen dem aktiven Krankheitsstadium und der Remission detektiert werden konnte (55, 56).

Auch in dieser Arbeit war die Expression von CD64 auf PMN insgesamt gering ausgeprägt, zeigte gleichzeitig jedoch einen signifikanten Unterschied zwischen AAV-Patienten\*innen und den gesunden Kontrollen. Die Patienten\*innen exprimierten unabhängig von der Krankheitsaktivität mehr CD64. Das könnte z.T. dem inflammatorischen Milieu geschuldet sein. Die Hochregulation der CD64-Expression kann durch verschiedenen Interleukine getriggert werden und zeigt sich besonders hoch im Kontext einer bakteriellen Infektion. Somit könnte der Marker zur Differenzierung zwischen Infektion und einer akuten Phase der Vaskulitis herangezogen werden (56).

#### 4.2.4 MHCII und HLA-DR

Lange Zeit wurde angenommen, dass die PMN nicht fähig wären, MHCII (HLA II) Moleküle zu exprimieren. In der Literatur wird die Rolle dieser Moleküle bei der Pathogenese der AAV demnach verhalten diskutiert. Die genome-wide-association study (GWAS) gab Hinweise auf eine gewisse Assoziation der Suszeptibilität für MPA mit Polymorphismen in den HLAII-Genen. Demnach ist in Japan die MPA mit dem HLA-Allel HLA-DRB1\* assoziiert (109). Die Hauptaufgabe von HLAII Molekülen ist die Präsentation von Antigenen für T-Lymphozyten. Diese Aufgabe übernehmen antigenpräsentierende Zellen (APC), zu denen Monozyten, Makrophagen, B-Lymphozyten und dendritische Zellen gehören. Als kein Mitglied der APC-Familie tragen Neutrophile demnach keine bzw. eine verschwindend geringe Anzahl an MHCII-Molekülen. Die Expression kann allerdings durch die Kultivierung der Zellen unter Interferon  $\gamma$  oder GM-CSF induziert werden (55).

Die Gruppe um Hänsch und Radsak untersuchte die Expression von MHCII-Molekülen auf PMN und deren Korrelation mit der Erkrankungsaktivität. Verwendet wurden Vollblut und Marker für HLA-DP, -DQ und -DR. Die Ergebnisse zeigten, dass 15% der peripheren Neutrophilen von aktiven GPA-Patienten\*innen MHCII-Moleküle exprimierten und follow-up Studien gaben Hinweise auf eine Korrelation mit der Erkrankungsaktivität. Unter einer immunsuppressiven Therapie konnte eine Abnahme der Expression beobachtet werden, während im Fall eines Relapse die Expression zunahm. Zudem scheint die Hochregulation der MHCII-Moleküle auf PMN nicht mit bakteriellen Infektionen assoziiert zu sein. Vor diesem Hintergrund könnte MHCII als Marker für die Aktivität der Erkrankung/ Relapse bzw. zur Differenzierung zwischen aktivem Stadium und Symptomausbruch im Rahmen einer Infektion dienen (55).

Die Expression von MHCII auf PMN ist nicht auf aktive GPA-Patienten\*innen begrenzt. Auch Patienten\*innen im aktiven Stadium der MPA und EGPA zeigten eine erhöhte Expression (55).

Isolierte Neutrophile von MPA-Patienten\*innen trugen HLA-DR auf ihrer Oberfläche. Untersucht wurde die Rolle von MHCII bei der Expression von MPO. Dabei wurde MPO in Anwesenheit von HLA-DR auf der Zelloberfläche der Neutrophilen detektiert. Der HLA-DR/ MPO-Komplex konnte von MPO-ANCA erkannt werden. Diese Ergebnisse unterstützten die Hypothese, dass MPO durch Assoziation mit HLA-DR zur Zelloberfläche transportiert werden könnte (55).

Im Gegensatz zu den bisherigen Studien zu der Assoziation von MHCII und AAV fiel in der vorliegenden Arbeit eher eine Tendenz zur Abnahme der MHCII und HLA-DR-Expression auf den PBMC im Vergleich zwischen HD und den aktiven AAV-Patienten\*innen auf. Auf Seiten der PMN gab es keine signifikanten Unterschiede. Grundsätzlich ist jedoch zu konstatieren, dass die Expression von sowohl MHCII als auch HLA-DR auf den PMN sehr gering war. Die verminderte Expression auf den PBMC könnte dem zeitlichen Faktor einer schnellen MHCII-Expression und turn-overs der Zellen geschuldet sein, sodass die Ergebnisse den Effekt nicht abbilden konnten. Einige der Patienten\*innen waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme bereits einige Tage hospitalisiert und unter Therapie mit Cortison. Durch die kleine Stichprobengröße wurde auf eine entsprechende Kategorisierung verzichtet.

#### 4.2.5 Intrazelluläre Marker

Für das Gesamtbild der Mechanismen in der Pathogenese der AVV sollte der Blick von der Zelloberfläche auch nach innen gerichtet werden. Den bisherigen Erkenntnissen zufolge sind intrazelluläre Proteine nicht nur an dem Priming der Neutrophilen und Monozyten beteiligt -ein Prozess, der Voraussetzung ist für die folgende Stimulierung der Zellen- sondern auch an der Steuerung der direkten Zerstörung des Endothels durch Bildung freier O<sub>2</sub>-Radikale und der Degranulation lytischer Enzyme. Die Rolle von TNF $\alpha$  und p38-MAPK liegt Untersuchungen zufolge unter anderem in der Beteiligung an der Translokation der ANCA-Antigene aus den intrazellulären Granula an die Zelloberfläche (22, 24). Zudem soll p38-MAPK an der Aktivierung von Akt mitwirken. Akt wiederum kontrolliert den „respiratory burst“ der aktivierten Neutrophilen (69).

Eine Blockade des p38-Signalweges resultiert in einer Abnahme der Bildung von O<sub>2</sub>-Radikalen und der Degranulation (29, 69).

IL-1 $\beta$  ist in unterschiedliche Entzündungsreaktionen involviert (72-74). Eine Blockade des IL-1 $\beta$  durch Anakinra reduzierte das Ausmaß der NCGN im Tiermodell (74).

Ein signifikanter Unterschied der Marker TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , p38P-MAPK und Akt zwischen AVV-Patienten\*innen und gesunden Kontrollen konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Es

zeigte sich allerdings ein tendenziell höheres Vorkommen von p38P-MAPK und IL-1 $\beta$  in den PBMC der AAV-Patienten\*innen. Diese Tendenz kann in die bislang existierende Datenlage eingebettet werden. Zumal gelten die Monozyten als Hauptquelle der IL-1 $\beta$  Produktion, ein stärkerer Effekt war somit eher auf Seiten der PBMC als auf der der PMN erwartet.

Die Ergebnisse müssen jedoch auch im Kontext der Problematik der intrazellulären Färbung diskutiert werden. Es ist nicht sicher auszuschließen, dass der fehlende Unterschied im Vergleich zwischen Erkrankten und Gesunden eine Konsequenz der inadäquaten Porenbildung und damit methodenbedingt ist.

Neben TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , Akt-P und p38P-MAPK gerät auch IL-17 bei der Betrachtung der Autoimmunität in den Fokus. IL-17 umfasst eine Proteinfamilie von IL-17A bis IL-17F und ist ein Zytokin mit proinflammatorischen Eigenschaften (80-82). In einigen Fällen der ANCA-assoziierten Vaskulitis konnten erhöhte IL-17 Konzentrationen in aktiven und sich in Remission befindlichen Patienten\*innen im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachgewiesen werden (110). Nach der Behandlung kam es nicht bei allen Patienten\*innen zu einer Reduktion der IL-17 Konzentration. Bei der Hälfte der sich in Remission befindlichen Patienten\*innen fanden sich zirkulierende T-Gedächtniszellen, die auf ANCA-Antigene mit der Produktion von IL-17 reagierten (110). Diese Daten unterstützen die Hypothese einer persistierenden CD4<sup>+</sup>TH17-Gedächtniszellpopulation (110). Einige der Patienten\*innen im akuten Krankheitsstadium zeigten jedoch völlig unauffällige IL-17 Spiegel (110).

Bei der Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit vor dem Hintergrund bisheriger Studien sollte betont werden, dass eine Isolierung von CD4<sup>+</sup> Zellen nicht erfolgte. Somit fand der Vergleich der IL-17 Produktion nicht isoliert für potentielle TH17-Zellen statt, sondern in der Betrachtung der Gesamtleukozyten und isoliert für Neutrophile und Monozyten. Signifikante Unterschiede fanden sich hierbei nicht. Daneben wird üblicherweise bei der Detektion von TH17-Zellen eine ex vivo Stimulation zum Nachweis dieser IL-17 produzierenden Zellen angewendet, welches in dem vorliegenden Protokoll nicht durchgeführt wurde. In diesem Kontext ist es daher auch nicht verwunderlich, dass insgesamt nur sehr geringe IL-17A und IL-17F Mengen detektierbar waren.

Die Arbeit von u.a. Akiyoshi et. al. lieferte Hinweise auf eine IL-17 Produktion bedingt durch aktivierte Neutrophile, sodass es sinnvoll erschien, die PMN und PBMC zusätzlich isoliert zu



betrachten. Eine höhere Produktion konnte lediglich für IL-17A in PBMC im Vergleich der aktiven und sich in Remission befindlichen Patienten\*innen detektiert werden. Insgesamt fiel die Produktion jedoch sehr gering aus.

## 4.2.6 Fazit und Ausblick

Ein zentrales Thema und Problem bei der Betreuung von Patienten\*innen mit AAV ist das Monitoring der Krankheitsaktivität und die Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten.

Die ANCA, die für die Diagnosestellung eine große Bedeutung haben, sind nur eingeschränkt hilfreich in der Einschätzung der Aktivität der AAV. Zum einen, weil negative Befunde ein aktives Stadium nicht ausschließen und zum anderen, weil steigende Titer nicht in jedem Fall mit einem Rezidiv korrelieren. Die Deutsche Gesellschaft der Rheumatologie (DGRh) sowie die British Society for Rheumatology (BSR), die European League against Rheumatism (EULAR) zusammen mit der European Renal Association (ERA) warnen vor einer Modifizierung der Therapie allein auf Basis einer Titeränderung der ANCA. Nach wie vor lautet die Empfehlung, die Krankheitsaktivität regelmäßig anhand des klinischen Bildes zu evaluieren. Ebenhierauf können sich Schwierigkeiten erheben, denn das klinische Bild der AAV ist vielgestaltig und zudem eine Differenzierung zwischen einem akuten Schub und beispielsweise einer Symptomexazerbation im Rahmen einer Infektion nicht immer leicht. Bislang fehlen jedoch verlässliche Aktivitätsmarker der Vaskulitis. Ein Verstehen der Pathogenese hinter der Klinik und Identifizierung der einzelnen Beteiligten könnten in Zukunft Biomarker liefern.

Mit einer Prävalenz von 150/1 Mio. und Inzidenz von 12/ 1Mio./ Jahr in Deutschland gehören alle Erkrankungen aus der Gruppe der AAV zu den seltenen Erkrankungen. Doch auch als Rarität können sie für den Betroffenen von gravierender Konsequenz sein. Die AAV zeigt z.T. rasch progrediente Verläufe und kann binnen kürzester Zeit zu schweren chronischen Organschäden (terminales Nierenversagen, schwere alveoläre Hämorrhagien, irreversible Schäden des Nervensystems) oder sogar zum Tod führen. Als systematische Erkrankung kann sie potentiell jedes Organsystem betreffen und bringt häufig chronische Schäden sowie Komorbiditäten bereits früh im Krankheitsverlauf mit sich. Diese Komorbiditäten sind u.a. auch Produkt der aktuell verfügbaren Therapie im Sinne von

unerwünschten Arzneimittelnebenwirkungen. In der Phase der Remissionsinduktion wird bezüglich der Wahl der Therapie zwischen AAV mit und ohne potentiellen lebens-oder organbedrohlichen Manifestationen unterschieden. Bei drohendem Organschaden erfolgt die Behandlung mit hochdosierten Glukokortikoiden und Cyclophosphamid oder Rituximab (zugelassen nur für GPA und MPA). Lassen sich noch keine Organschäden detektieren, ist die Wahl Glukokortikoide und Methotrexat. Nach Erreichen der Remission folgt der Wechsel auf mittelpotente Immunsuppressiva (Azathioprim, Methotrexat, Rituximab) gegebenenfalls in Kombination mit niedrigdosierten Glukokortikoiden für mindestens 24 Monate. Nach 12 Monaten Stabilität kann eine langsame Reduktion beginnen.

Im ersten Jahr nach der Diagnosestellung sind die Hauptursachen der Mortalität Infektionen (59%) und aktive Vaskulitis (11%), in Folgejahren kardiovaskuläre Ereignisse, Malignome und Infektionen. All das u.a. auch getragen durch die Nebenwirkungen der Therapie. Neue Therapieansätze –nicht zuletzt um Glukokortikoide einzusparen- können aus dem Verständnis des Krankheitsmodells gewonnen werden. Alternative Therapieansätze könnten perspektivisch die Inhibition einzelner Stufen in der Pathogenese umfassen wie Bindung der ANCA, Aktivierung des p38-MAPK Signalweges, Adhäsion etc..

Die Idee eines AAV prädisponierenden Neutrophilenzweiges konnte in dieser Dissertationsarbeit nicht bestätigt werden. Die SPADE-Analysen der CyTOF-Daten lieferten keine stabilen Muster im Vorkommen der gewählten Marker, um die Hypothese einer entsprechenden Subpopulation zu stützen. Einige signifikante Unterschiede ließen sich allerdings darstellen. In den Fokus traten u.a. die Marker: MHCII und HLA-DR auf der Oberfläche der PBMC, CD88 sowohl für PMN als auch PBMC, C5L2 seitens der PBMC, CD16 für PBMC und CD64 für PMN. Die Auffälligkeiten dieser Marker könnten als potentieller Hinweis für ihre pathogenetische Relevanz und möglicher Ansatzpunkt für neue Therapieansätze verstanden werden. Insbesondere der C5a-Rezeptor CD88 ist rezent durch die positiven Daten der Phase 3 Studie ADVOCATE mit der Anwendung des oralen C5aR Blockers Avacopan in den Fokus geraten, so dass die Hochregulation Bestandteil einer autoinflammatorischen Kaskade in der AAV sein könnte.

Das im Zuge dieser Arbeit modifizierte Original-DVS-Protokoll bietet die Möglichkeit zur simultanen Multiparameteranalyse von Oberflächen- und intrazellulären Markern. Methodenbetreffendes Verbesserungspotential besteht nach wie vor in der Porenbildung zur intrazellulären Färbung.

Limitierende Faktoren für die generelle Interpretierbarkeit der hier vorliegenden Studie liegen zum Einen in der geringen Größe der vorliegenden Stichprobe und in der fehlenden Unterteilung in MPO- oder PR3-ANCA positive Vaskulitiden bzw. in die Entitäten GPA, MPA und EGPA. Zudem wurden Patienten\*innen mit bereits eingeleiteter Therapie als auch therapie-naive Patienten\*innen eingeschlossen. Ein potentieller Therapieeffekt konnte demnach nicht herausgerechnet werden. Perspektivisch könnte die Gruppe der aktiven Probanden\*innen auch nach Erstdiagnostizierten und akutem Rezidiv subklassifiziert werden. Nach dem aktuellen Stand der Forschung könnte die Horizonterweiterung der Vorstellung der Effektorzellen ebenso sinnvoll sein u.a. unter Einbezug der Lymphozyten und damit isolierten Betrachtung der TH17-Zellen. Das würde eine Reevaluation des Panels und Erweiterung des eingesetzten Markerspektrums voraussetzen.

Letztlich kann die vorliegende Arbeit eine Grundlage für die weitere Optimierung des Versuchsaufbaus (größere Stichprobe, weitere Unterteilung der Probanden\*innen, Reevaluation der Marker etc.) legen.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. Duale Reihe Biochemie. 2. Auflage. Stuttgart, Deutschland: Thieme; 2008.
2. Eckstein R., Zimmermann R. Immunhämatologie und Transfusionsmedizin: Theorie und Praxis kompakt. 6. Auflage. München, Deutschland: Urban & Fischer bei Elsevier; 2010.
3. Eder M., Gedigk P. Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie. Berlin, Deutschland: Springer-Verlag; 1990.
4. Davies DJ, Moran JE, Niall JF, Ryan GB. Segmental necrotizing glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology? Br. Med. J. (Clin. Res. Ed) 1982; 285: 606.
5. Van der Woude FJ, Rassmusen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, van Es LA, van der Giessen M, van der Hem GK, The TH. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. Lancet 1985; 325 (8426): 425-429.
6. Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, Basu N, Cid MC, Ferrario F, Flores-Suarez LF, Gross WL, Guillevin L, Hagen EC, Hoffman GS, Jayne DR, Kallenberg CGM, Lamprecht P, Langford CA, Luqmani RA, Mahr AD, Matteson EL, Merkel PA, Ozen S, Pusey CD, Rasmussen N, Rees AJ, Scott DGI, Specks U, Stone JH, Takahashi K, Watts RA. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference nomenclature of vasculitides. Arthritis Rheumatol 2013; 65 (1): 1-11.
7. Schirmer JH, Aries PM, de Groot K, Hellmich B, Holle JU, Kneitz C, Kötter I, Lamprecht P, Müller-Ladner U, Reinhold-Keller E, Specker C, Zänker M, Moosig F. S1-Leitlinie Diagnostik und Therapie der ANCA-assoziierten Vaskulitiden. Z Rheumatol 2017; 76 (3): 77–104.
8. Lesavre P. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies antigen specificity. Am J Kidney Dis 1991; 18 (2): 159-163.
9. Peter H-H, Pichler WJ. Klinische Immunologie. 2. Auflage. München, Deutschland: Urban & Schwarzenberg; 1996.

10. Xiao H, Heeringa P, Liu Z, Huugen D, Hu P, Maeda N, Falk RJ, Jennette JC. The role of neutrophils in the induction of glomerulonephritis by antimyeloperoxidase antibodies. *Am J Pathol* 2005; 167 (1): 39-45.
11. Xiao H, Heeringa P, Hu P, Liu Z, Zhao M, Aratani Y, Maeda N, Falk RJ, Jennette JC. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *J Clin Invest* 2002; 110 (7): 955-963.
12. Jennette JC, Xiao H, Falk RJ, Gasim AMH. Experimental models of vasculitis and glomerulonephritis induced by antineutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Contrib Nephrol* 2011; 169: 211-220.
13. van Timmeren MM, Heeringa P. Pathogenesis of ANCA-associated vasculitis: recent insights from animal models. *Curr Opin Rheumatol* 2012; 24 (1): 8-14.
14. Schreiber A, Xiao H, Falk RJ, Jennette JC. Bone marrow-derived cells are sufficient and necessary targets to mediate glomerulonephritis and vasculitis induced by anti-myeloperoxidase antibodies. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17 (12): 3355-3364.
15. Kanzaki G, Nagasaka S, Higo S, Kajimoto Y, Kanemitsu T, Aoki M, Nagahama K, Natori Y, Tsuboi N, Yokoo T, Shimizu A. Impact of anti-glomerular basement membrane antibodies and glomerular neutrophil activation on glomerulonephritis in experimental myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody vasculitis. *Nephrol Dial Transplant* 2016; 31 (4): 574-585.
16. Rousselle A, Kettritz R, Schreiber A. Monocytes promote crescent formation in anti-myeloperoxidase antibody-induced glomerulonephritis. *Am J Pathol* 2017; 187 (9): 1908-1915.
17. Jennette JC. Nomenclature and Classification of vasculitis: lesson learned from granulomatosis with polyangiitis (Wegner's granulomatosis). *Clin Exp Immunol* 2011; 164 (Suppl.1): 7-10.
18. Mark EJ, Matsubara O, Tan-Liu NS, Fienberg R. The pulmonary biopsy in early diagnosis of Wegner's (pathergic) granulomatosis: a study based on 35 open lung biopsies. *Hum Pathol* 1988; 19 (9): 1065-1071.

19. Weidner S, Carl M, Riess R, Rupprecht HD. Histologic analysis of renal leukocyte infiltration in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis: importance of monocyte and neutrophil infiltration in tissue damage. *Arthritis Rheumatol* 2004; 50 (11): 3651-3657.
20. Cunningham MA, Huang XR, Dowling JP, Tipping PG, Holdsworth SR. Prominence of cell-mediated immunity effectors in „pauci-immune” glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10 (3): 499-506.
21. Csernok E, Ernst M, Schmitt W, Bainton DF, Gross WL. Activated neutrophils express proteinase 3 on their plasma membrane in vitro and in vivo. *Clin Exp Immunol* 1994; 95 (2): 244–250.
22. Kettritz R, Schreiber A, Luft FC, Haller H. Role of mitogen-activated protein kinases in activation of human neutrophils by antineutrophil cytoplasmic antibodies. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12 (1): 37–46.
23. Falk RJ, Terrell RS, Charles LA, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87 (11): 4115-4119.
24. Huugen D, Xiao H, van Esch A, Falk RJ, Peutz-Kootstra CJ, Buurman WA, Tervaert JWC, Jennette JC, Heeringa P. Aggravation of anti-myeloperoxidase antibody induced glomerulonephritis by bacterial lipopolysaccharide: role of tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Am J Pathol* 2005; 167 (1): 47-58.
25. Schreiber A, Xiao H, Jennette JC, Schneider W, Luft FC, Kettritz R. C5a receptor mediates neutrophil activation and ANCA-induced glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20 (2): 289-298.
26. Porges AJ, Redecha PB, Kimberly WT, Csernok E, Gross WL, Kimberly RP. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies engage and activate human neutrophils via Fc $\gamma$ RIIIa. *J Immunol* 1994; 153 (3): 1271-1280.
27. Kocher M, Siegel ME, Edberg JC, Kimberly RP. Cross-linking of Fc $\gamma$  receptor IIa and Fc $\gamma$  receptor IIIb induces different proadhesive phenotypes on human neutrophils. *J Immunol*. 1997; 159 (8): 3940-3948.

28. Kettritz R, Jennette JC, Falk RJ. Cross-linking of ANCA-antigens stimulates superoxide release by human neutrophils. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8 (3): 386-394.
29. van der Veen BS, Chen M, Müller R, van Timmeren MM, Petersen AH, Lee PA, Satchell SC, Mathieson PW, Saleem MA, Stegeman CA, Zwerina J, Molema G, Heeringa P. Effects of p38 mitogen-activated protein kinase inhibition on antineutrophil cytoplasmic autoantibody pathogenicity in vitro and in vivo. *Ann Rheum Dis* 2011; 70 (2): 356-365.
30. Brooks CJ, King WJ, Radford DJ, Adu D, McGrath M, Savage COS. IL-1 production by human polymorphonuclear leucocytes stimulated by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies: relevance to systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1996; 106 (2): 273–279.
31. Radford DJ, Luu NT, Hewins, P, Nash GB, Savage COS. Antineutrophil cytoplasmic antibodies stabilize adhesion and promote migration of flowing neutrophils on endothelial cells. *Arthritis Rheumatol* 2001; 44 (12): 2851–2861.
32. Mayet WJ, Schwarting A, Orth T, Duchmann R, Meyer zum Büschenfelde KH. Antibodies to proteinase 3 mediate expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *Clin Exp Immunol* 1996; 103 (2): 259–267.
33. Muller Kobold AC, Van Wijk RT, Franssen CFM, Molema G, Kallenberg CGM, Tervaert JW. In vitro up-regulation of E-selectin and induction of interleukin-6 in endothelial cells by autoantibodies in Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis. *Clin Exp Rheumatol* 1999; 17 (4): 433–440.
34. Kuligowski MP, Kwan RJQ, Lo C, Wong C, James WG, Bourges D, Ooi JD, Abeynaike LD, Hall P, Kitching AR, Hickey MJ. Antimyeloperoxidase antibodies rapidly induce  $\alpha$ -4-integrin-dependent glomerular neutrophil adhesion. *Blood* 2009; 113 (25): 6485–6494.
35. Franssen CFM, Huitema MG, Muller Kobold AC, Oost-Kort WW, Limburg PC, Tiebosch A, Stegeman CA, Kallenberg CGM, Tervaert JW. In vitro neutrophil activation by antibodies to proteinase 3 and myeloperoxidase from patients with crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10 (7): 1506–1515.

36. Hattar K, Bickenbach A, Csernok E, Rosseau S, Grandel U, Seeger W, Grimminger F, Sibelius U. Wegener's granulomatosis: antiproteinase 3 antibodies induce monocyte cytokine and prostanoid release-role of autocrine cell activation. *J Leukoc Biol* 2002; 71 (6): 996–1004.
37. Savage CO, Pottinger BE, Gaskin G, Pusey CD, Pearson JD. Autoantibodies developing to myeloperoxidase and proteinase 3 in systemic vasculitis stimulate neutrophil cytotoxicity toward cultured endothelial cells. *Am. J Pathol* 1992; 141 (2): 335–342.
38. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönemarker U, Back W, Gross WL, Werb Z, Gröne H-J, Brinkmann V, Jenne DE. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med* 2009; 15 (6): 623–625.
39. Sangaletti S, Tripodo C, Chiodoni C, Guarnotta C, Cappetti B, Casalini P, Piconese S, Parenza M, Guiducci C, Vitali C, Colombo MP. Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity. *Blood* 2012; 120 (15): 3007–3018.
40. Schreiber A, Rousselle A, Becker JU, von Mässenhausen A, Linkermann A, Kettritz R. Necroptosis controls NET generation and mediates complement activation, endothelial damage, and autoimmune vasculitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; 114 (45): E9618-E9625.
41. Charles LA, Falk RJ, Jennette JC. Reactivity of antineutrophil cytoplasmic autoantibodies with mononuclear phagocytes. *J Leukoc Biol* 1992; 51 (1): 65–68.
42. Nowack R, Schwalbe K, Flores-Suárez LF, Yard B, Van der Woude FJ. Upregulation of CD14 and CD18 on monocytes in vitro by antineutrophil cytoplasmic autoantibodies. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11 (9): 1639–1646.
43. Bröker B, Schütt C, Fleischer B. *Grundwissen Immunologie*, 4. Auflage, Berlin, Deutschland: Springer Spektrum; 2019.
44. Xiao H, Schreiber A, Heeringa P, Falk RJ, Jennette JC. Alternative complement pathway in the pathogenesis of disease mediated by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Am J Pathol* 2007; 170 (1): 52–64.



45. Huugen D, Van Esch A, Xiao H, Peutz-Kootstra CJ, Buurman WA, Tervaert JW, Jennette JC, Heeringa P. Inhibition of complement factor C5 protects against anti-myeloperoxidase antibody-mediated glomerulonephritis in mice. *Kidney Int* 2007; 71 (7): 646–654.
46. Camous L, Roumenina L, Bigot S, Brachemi S, Frémeaux-Bacchi V, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Complement alternative pathway acts as a positive feedback amplification of neutrophil activation. *Blood* 2011; 117 (4): 1340–1349.
47. Yuan J, Gou SJ, Huang J, Hao J, Chen M, Zhao MH. C5a and its receptors in human anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis. *Arthritis Res Ther* 2012; 14 (3): R140.
48. Tesar V, Hruskova Z. Avacopan in the treatment of ANCA-associated vasculitis. *Expert Opin Investig Drugs* 2018; 27 (5): 491-496.
49. Jayne DRW, Merkel PA, Schall TJ, Bekker P, ADVOCATE Study Group. Avacopan for the Treatment of ANCA-Associated Vasculitis. *N Engl J Med* 2021; 384 (7): 599-609.
50. Kocher M, Edberg JC, Fleit HB, Kimberly RP. Antineutrophil cytoplasmic antibodies preferentially engage Fc gammaRIIIb on human neutrophils. *J Immunol* 1998; 161 (12): 6909–6914.
51. Hulett MD, Hogarth PM. Molecular basis of Fc receptor function. *Adv Immunol* 1994; 57: 1-127.
52. Frohlich D, Spertini O, Moser R. The Fcγ receptor-mediated respiratory burst of rolling neutrophils to cytokine-activated, immune complex-bearing endothelial cells depends on L-selectin but not on E-selectin. *Blood* 1998; 91 (7): 2558-2564.
53. van Timmeren MM, van der Veen BS, Stegeman CA, Petersen AH, Hellmark T, Collin M, Heeringa P. IgG glycan hydrolysis attenuates ANCA-mediated glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21 (7): 1103–1114.
54. Ooi JD, Gan PY, Chen T, Eggenhuizen PJ, Chang J, Alikhan MA, Odobasic D, Holdsworth SR, Kitching AR. FcγRIIB regulates T-cell autoreactivity, ANCA production, and neutrophil activation to suppress antimyeloperoxidase glomerulonephritis. *Kidney Int* 2014; 86 (6): 1140-1149.

55. Hänsch GM, Radsak M, Wagner C, Reis B, Koch A, Breitbart A, Andrassy K. Expression of major histocompatibility class II antigens on polymorphonuclear neutrophils in patients with Wegener's granulomatosis. *Kidney Int* 1999; 55 (5): 1811–1818.
56. Ajmani S, Singh H, Chaturvedi S, Mishra R, Rai MK, Jain A, Misra DP, Agarwal V. Utility of neutrophil CD64 and Serum TREM-1 in distinguishing bacterial infection from disease flare in SLE and ANCA-associated vasculitis. *Clin Rheumatol* 2019; 38 (4): 997-1005.
57. Halbwachs-Mecarelli L, Bessou G, Lesavre P, Lopez S, Witko-Sarsat V. Bimodal distribution of proteinase 3 (PR3) surface expression reflects a constitutive heterogeneity in the polymorphonuclear neutrophil pool. *FEBS Lett* 1995; 374 (1): 29–33.
58. Schreiber A, Busjahn A, Luft FC, Kettritz R. Membrane expression of proteinase 3 is genetically determined. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14 (1): 68–75.
59. Witko-Sarsat V, Lesavre P, Lopez S, Bessou G, Hieblot C, Prum B, Noël LH, Guillevin L, Ravaud P, Sermet-Gaudelus I, Timsit J, Grünfeld JP, Halbwachs-Mecarelli L. A large subset of neutrophils expressing membrane proteinase 3 is a risk factor for vasculitis and rheumatoid arthritis. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10 (6): 1224–1233.
60. Rarok AA, Stegeman CA, Limburg PC, Kallenberg CGM. Neutrophil membrane expression of proteinase 3 (PR3) is related to relapse in PR3-ANCA-associated vasculitis. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13 (9): 2232–2238.
61. Jerke U, Rolle S, Dittmar G, Bayat B, Santoso S, Sporbert A, Luft FC, Kettritz R. Complement receptor Mac-1 is an adaptor for NB1 (CD177)-mediated PR3-ANCA neutrophil activation. *J Biol Chem* 2011; 286 (9): 7070–7081.
62. Bauer S, Abdgawad M, Gunnarsson L, Segelmark M, Tapper H, Hellmark T. Proteinase 3 and CD177 are expressed on the plasma membrane of the same subset of neutrophils. *J Leukoc Biol* 2007; 81 (2): 458–464.
63. Von Vietinghoff S, Tunnemann G, Eulenberg C, Wellner M, Cardoso CM, Luft FC, Kettritz R. NB1 mediates surface expression of the ANCA antigen proteinase 3 on human neutrophils. *Blood* 2007; 109 (10): 4487–4493.

64. Gabillet J, Millet A, Pederzoli-Ribeil M, Tacnet-Delorme P, Guillevin L, Mouthon L, Frachet P, Witko-Sarsat V. Proteinase 3, the autoantigen in granulomatosis with polyangiitis, associates with calreticulin on apoptotic neutrophils, impairs macrophage phagocytosis, and promotes inflammation. *J Immunol* 2012; 189 (5): 2574–2583.
65. Brady HR. Leukozyte adhesion molecules and kidney diseases. *Kidney Int* 1994; 45 (5): 1285-1300.
66. Butcher EC. Leukozyte-endothelial cell recognition: Three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991; 67 (6): 1033-1036.
67. Harian JM, Liu DY. Adhesion: Its role in inflammatory disease. New York: WH Freeman and Co; 1992.
68. Schweighoffer T, Shaw S. Adhesion cascades: Diversity through combinatorial strategies. *Curr Opin Cell Biol* 1992; 4 (5): 824-829.
69. Kettritz R, Choi M, Butt W, Rane M, Rolle S, Luft FC, Klein JB. Phosphatidylinositol 3-Kinase Controls Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies—Induced Respiratory Burst in Human Neutrophils. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13 (7): 1740-1749.
70. Rane MJ, Coxon PY, Powell DW, Webster R, Klein JB, Pierce W, Ping P, McLeish KR. p38 Kinase-dependent MAPKAPK-2 activation functions as 3-phosphoinositide-dependent kinase-2 for Akt in human neutrophils. *J Biol Chem* 2001; 276 (5): 3517–3523.
71. Perera NC, Wiesmuller KH, Larsen MT, Schacher B, Eickholz P, Borregaard N, Jenne DE. NSP4 is stored in azurophil granules and released by activated neutrophils as active endoprotease with restricted specificity. *J Immunol* 2013; 191 (5): 2700–2707.
72. Pham CTN. Neutrophil serine proteases finetune the inflammatory response. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40 (6-7): 1317–1333.
73. Noronha IL, Krüger C, Andrassy K, Ritz E, Waldherr R. In situ production of TNF-alpha, IL-1 beta and IL-2R in ANCA-positive glomerulonephritis. *Kidney Int* 1993; 43 (3): 682–692.

74. Schreiber A, Pham CT, Hu Y, Schneider W, Luft FC, Kettritz R. Neutrophil serine proteases promote IL-1 generation and injury in necrotizing crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23 (3): 470–482.
75. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 229–265.
76. Griffith ME, Coulthart A, Pusey CD. T cell responses to myeloperoxidase (MPO) and proteinase 3 (PR3) in patients with systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1996; 103 (2): 253–258.
77. Christensson M, Pettersson E, Sundqvist KG, Christensson B. T cell activation in patients with ANCA-associated vasculitis: inefficient immune suppression by therapy. *Clin Nephrol* 2002; 54 (6): 435–442.
78. Marinaki S, Kälsch AI, Grimminger P, Breedijk A, Birck R, Schmitt WH, Weiss C, van der Woude FJ, Yard BA. Persistent T-cell activation and clinical correlations in patients with ANCA-associated systemic vasculitis. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21 (7): 1825–1832.
79. Schmitt WH, Hagen EC, Neumann I, Nowack R, Flores-Suárez FL, van de Woude FJ, European Vasculitis Study Group. Treatment of refractory Wegener's granulomatosis with antithymocyte globulin (ATG): an open study in 15 patients. *Kidney Int* 2004; 65 (4): 1440–1448.
80. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005; 6 (11): 1133–1141.
81. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin JJ, Garrone P, Garcia E, Saeland S, Blanchard D, Gaillard C, Das Mahapatra B, Rouvier E, Golstein P, Banchereau J, Lebecque S. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* 1996; 183 (6): 2593–2603.
82. Katz Y, Nativ O, Beer Y. Interleukin-17 enhances tumor necrosis factor alpha-induced synthesis of interleukins 1, 6, and 8 in skin and synovial fibroblasts: a possible role as a “fine-tuning cytokine” in inflammation processes. *Arthritis Rheumatol* 2001; 44 (9): 2176–2184.

83. Schreiber A, Rousselle A, Klocke J, Bachmann S, Popovic S, Bontscho J, Schmidt-Ott KM, Siffrin V, Jerke U, Ashraf MI, Panzer U, Kettritz R. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin protects from ANCA-induced GN by inhibiting TH 17 immunity. *J Am Soc Nephrol* 2020; 31 (7): 1569-1584.
84. Gan P-Y, Steinmetz OM, Tan DSY, O'Sullivan KM, Ooi JD, Iwakura Y, Kitching AR, Holdsworth SR. Th17 cells promote autoimmune anti-myeloperoxidase glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21 (6): 925-931.
85. Jeffs LS, Peh CA, Nelson A, Tan PG, Davey E, Chappell K, Perkins GB, Hurtado PR. IgM ANCA in healthy individuals and in patients with ANCA-associated vasculitis. *Immunol Res* 2019; 67 (4-5): 325-336.
86. Bendell SC, Simonds EF, Qiu P, Amir ED, Krutzik PO, Finck R, Bruggner RV, Melamed R, Trejo A, Ornatsky OI, Balderas RS, Plevritis SK, Sachs K, Pe'er D, Tanner SD, Nolan GP. Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum. *Science* 2011; 332 (6030): 687-696.
87. Anchang B, Hart TDP, Bendell SC, Qiu P, Bjornson Z, Lindermann M, Nolan GP, Plevritis SK. Visualization and cellular hierarchy inference of single-cell data using SPADE. *Nat Protoc* 2016; 11: 1264-1279.
88. Akiyoshi H, Tomokazu N, Noriko N, Naohito O, Masato Y, Kenji Y, Nakayama T, Suzuki K. MPO-ANCA induces IL-17 production by activated neutrophils in vitro via its Fc region and complement-dependent manner. *J Autoimmun* 2008; 31 (1): 79-89.
89. Haller H, Eichhorn J, Pieper K, Göbel U, Luft FC. Circulating Leucocyte Integrin Expression in Wegener's Granulomatosis. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7 (1): 40-48.
90. Radford DJ, Savage COS, Nash GB. Treatment of rolling neutrophils with anti-neutrophil cytoplasm autoantibodies causes conversion to firm integrin-mediated adhesion. *Arthritis Rheumatol* 2000; 43 (6): 1337-1344.
91. Weber C, Kitayama J, Springer TA. Differential regulation of 1 and 2 integrin avidity by chemoattractants in eosinophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93 (20): 10939-10944.

92. Weber KCS, Klickstein LB, Weber C. Specific activation of leukocyte  $\beta 2$  integrins lymphocyte function-associated antigen-1 and Mac-1 by chemokines mediated by distinct pathways via the subunit cytoplasmic domains. *Mol Biol Cell* 1999; 10 (4), 819–1287.
93. von Andrian UH von, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors KE, Butcher EC. Two-step model of leucocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leucocyte  $\beta 2$  -integrins in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88 (17): 7538-7542.
94. Palecanda A, Walchek B, Bishop DK, Jutila MA. Rapid activation-independent shedding of leucocyte L-selectin induced by crosslinking of the surface antigen. *Eur J Immunol* 1992; 22 (5): 1279-1286.
95. Calderwood JW, Williams JM, Morgan MD, Nash GB, Savage COS. ANCA induces  $\alpha 2$  integrin and CXC chemokine-dependent neutrophil-endothelial cell interactions that mimic those of highly cytokine-activated endothelium. *J Leukoc Biol* 2005; 77 (1): 33-43.
96. Williams MA, Solomkin JS. Integrin-mediated signaling in human neutrophil functioning. *J Leukoc Biol* 1999; 65 (6): 725–736.
97. Harris ES, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. The leukocyte integrins. *J Biol Chem* 2000; 275 (31): 23409–23412.
98. Berton G, Lowell CA. Integrin signaling in neutrophils and macrophages. *Cell Signal* 1999; 11 (9): 621–635.
99. Arnaout MA. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood* 1990; 75 (5): 1037–1050.
100. Rebuck N, Finn A. Polymorphnuclear granulocyte expression of CD11a/ CD18, CD11b/ CD18 and L-selectin in normal individuals. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 1994; 8 (3): 189-195.
101. Hu N, Westra J, Huitema MG, Bijl M, Brouwer E, Stegeman CA, Heeringa P, Limburg PC, Kallenberg CGM. Coexpression of CD177 and Membrane Proteinase 3 on neutrophils in antineutrophil cytoplasmic autoantibody–associated systemic vasculitis: Anti–Proteinase 3–mediated

neutrophil activation is independent of the role of CD177-expressing neutrophils. *Arthritis Rheumatol* 2009; 60 (5): 1548–1557.

102. Van Timmeren MM, Chen M, Heeringa P. Review article: pathogenic role of complement activation in anti-neutrophil cytoplasmic auto-antibody-associated vasculitis. *Nephrology (Carlton)* 2009; 14 (1): 16-25.

103. Manthey HD, Woodruff TM, Taylor SM, Monk PN. Complement component 5a (C5a). *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41 (11): 2114-2117.

104. Ward PA. Functions of C5a receptors. *J Mol Med* 2009; 87 (4): 375-378.

105. Chen NJ, Mirsos C, Suh D, Lu YC., Lin WJ., McKerlie C, Lee T, Baribault H, Tian H, Yeh W-C. C5L2 is critical for the biological activities of the anaphylatoxins C5a and C3a. *Nature* 2007; 446 (7132): 203-207.

106. Huey R, Hugli TE. Characterization of a C5a receptor on human polymorphonuclear leukocytes (PMN). *J Immunol* 1985; 135 (3): 2063-2068.

107. Cain SA, Monk PN. The orphan receptor C5L2 has high affinity binding sites for complement fragments C5a and C5a des-Arg74. *J Biol Chem* 2002; 277 (9): 7165-7169.

108. Mulder AHL, Heeringa P, Brouwer E, Limburg PC, Kallenberg CGM. Activation of granulocytes by anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): a FcγRII-dependent process. *Clin Exp Immunol* 1994; 98 (2): 270-278.

109. Ryosuke H, Koichiro O, Noriko A, Hui J, Kouyuki H, Masako K, Suenaga T, Saito F, Terao C, Atsumi T, Iwatani H, Mimori T, Arase M. Myeloperoxidase/HLA Class II Complexes Recognized by Autoantibodies in Microscopic Polyangiitis. *Arthritis Rheumatol* 2017; 69 (10): 2069–2080.

110. Nogueira E, Hamour S, Sawant D, Henderson S, Mansfield N, Chavele KM, Pusey CD, Salama AD. Serum IL-17 and IL-23 levels and autoantigen-specific Th17 cells are elevated in patients with ANCA-associated vasculitis. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25 (7): 2209–2217.

## 6. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Eugenia Frank, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Charakterisierung des myeloiden Compartments in Patienten\*innen mit ANCA-assoziierten Erkrankungen mittels CyTOF/ Characterization of the myeloid compartment in patients with ANCA-associated diseases using CyTOF

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren\*innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.



Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

**Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen**

Eugenia Frank hatte keinen Anteil an Publikationen:

---

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## **7. Lebenslauf**

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



## **8. Danksagung**

Die Entstehung dieser Dissertation war ein langer Weg und intensiver Prozess. Besondere Menschen haben mich hierbei begleitet und unterstützt. An dieser Stelle möchte ich allen Beteiligten einen großen Dank aussprechen.

Herrn Dr. med. Adrian Schreiber danke ich für die Themenwahl, hervorragende Betreuung und außerordentliche Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Sabine Baumgart vom DRFZ Berlin bedanken für die unerschöpfliche Hilfsbereitschaft und die wertvollen Anregungen.

Ein großer Dank gilt auch der gesamten Arbeitsgruppe Kettritz des ECRC (gemeinsame Einrichtung des Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin und der Charité-Universitätsmedizin Berlin), allen voran Susanne Rolle und Dr. Uwe Jerke, für die wissenschaftlichen Hinweise und die harmonische Arbeitsatmosphäre.

Die vergangene Zeit war nicht minder herausfordernd für meine Familie und Freunde, die mir in allen Phasen mit viel Geduld und liebevoller Ermutigung beigestanden haben. Ihnen möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen.

## 9. Bescheinigung des Statistikers

MyAuswertung – Statistik Auswertung und Beratung  
Naunynstraße 30 | 10997 Berlin

Zur Vorlage bei der

**Promotionskommission** der

Charité – Universitätsmedizin Berlin

MyAuswertung – Statistik Auswertung und Beratung

Naunynstraße 30 | 10997 Berlin

Mobil +49 (0) 170 231 43 98

Mail info@myauswertung.de

Berlin, den 28.08.2021

### Bescheinigung nach § 8 Abs. 2a PO 2017

Sehr geehrte Frau Eugenia Frank,

hiermit bestätige ich Ihnen zum Zwecke der Vorlage beim Promotionsbüro der Charité die erfolgte Beratung zu Ihrem Promotionsprojekt. Die Durchführung und Beschreibung der statistischen Methoden der mir vorgelegten Schrift ist in Art und Umfang für die Erarbeitung adäquat. Nach Einsicht in Datenbank und der mir vorgelegten Beschreibung von Methoden und Berechnungen sehe ich eine sorgfältige und detaillierte statistische Bearbeitung.

Ergänzend erfolgte eine Beratung zu deskriptiver und induktiver Statistik, Boxplots und Anwendung von „nicht-parametrische Verfahren - Mann-Whitney-U-Test“.

Ich wünsche Ihnen für die Zukunft alles Gute!

Murat Karaman

Akkreditierter Statistiker der Promotionskommission

MyAuswertung – Statistik Auswertung und Beratung

Naunynstraße 30 | 10997 Berlin