

Aus dem
CharitéCentrum für Innere Medizin
Klinik für Nephrologie und Internistische Intensivmedizin
Kommissarische Leitung: Prof. Dr. R. Schindler, Prof. Dr. A. Jörres

Habilitationsschrift

Funktion und Signaltransduktion neutrophiler Granulozyten bei inflammatorischen Prozessen und ANCA- assoziierten Vaskulitiden

zur Erlangung der *Venia legendi*
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Mira Choi
geboren in Verden/ Aller

Eingereicht: September 2011

Wissenschaftlich-öffentlicher Vortrag: 16. April 2012

Dekanin: Univ.-Prof. Dr. Annette Grütters-Kieslich

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Friedrich Thaiss

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Ulrich Kunzendorf

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis.....	3
I. Einleitung.....	4
II. Eigene Originalarbeiten	13
1. Statine hemmen die ANCA-induzierte Aktivierung humaner neutrophiler Granulozyten über den ERK Signaltransduktionsweg	13
2. Die Hemmung von NF- κ B durch ein TAT-NEMO-Bindungsdomänen-Peptid akzeleriert die konstitutive Apoptose und verhindert die LPS-vermittelte Neutrophilenapoptose	26
3. Die PI3K/Akt-vermittelte Hemmung ANCA-induzierter Neutrophilenaktivierung durch febrile Temperaturen	38
4. Kurzzeitige Hitzeexpositionen hemmen entzündliche Prozesse durch Verhinderung der Neutrophilenmigration und Hemmung der NF- κ B Aktivierung in neutrophilen Granulozyten, die chemotaktischen Stimuli ausgesetzt sind.....	51
5. Identifikation von Inhibitoren der PR3-NB1 Interaktion durch ein small molecule high-throughput screening	66
III. Diskussion	78
IV. Zusammenfassung.....	83
V. Ausblick und Darstellung weiterer Vorhaben.....	85
Literaturverzeichnis.....	87
Danksagung	97
ERKLÄRUNG	99

Abkürzungsverzeichnis

ANCA	Antineutrophile-zytoplasmatische Antikörper
EMSA	Gelretardierungsassay (Shift)
ERK	MAP Kinase
FACS	Durchflusszytometrie
GM-CSF	Wachstumsfaktor
GN	Glomerulonephritis
HMG-CoA-	Statine
Reduktaseinhibitoren	
IgG	Immunglobulin G
I κ B α	Inhibitorisches Protein von NF- κ B
IKK	I κ B Kinase Komplex
IL-8	Interleukin 8 (=Zytokin)
LDL	Lipoprotein niederer Dichte
LPS	Lipopolysaccharid
MPO	Myeloperoxidase
NB1	Granulozytäres Antigen
NF- κ B	nukleärer Transkriptionsfaktor
PI3K/Akt	Phosphoinositol-3-Kinase/ Akt
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate (= Stimulator)
PMN	Polymorphonukleäre Granulozyten= neutrophile Granulozyten
mPR3	Proteinase 3 Expression auf der Membran neutrophiler Granulozyten
PR3	Proteinase 3
ROS	reaktive Sauerstoffradikale
RT-PCR	Reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha (=Zytokin)

I. Einleitung

Aulus Cornelius Celsus beschrieb zu Beginn des 1. Jahrhunderts n. Chr. die vier Kardinalsymptome einer akuten Entzündung: Rubor (Rötung), Tumor (Schwellung), Calor (Wärme) und Dolor (Schmerz). Als fünftes Zeichen wurde später von Claudius Galenus (129 – 199 AD) die Functio laesa, die gestörte Funktion, hinzugefügt, die jedoch eher die Folge eines Krankheitszustands darstellt und sich nicht primär auf die Inflammation bezieht. Celsus machte es sich zum Prinzip, bei der Behandlung von Erkrankungen erst die natürlichen Vorgänge der Krankheitsbewältigung zu beobachten und zu begleiten statt sofort gegenzusteuern. Er betrachtete z.B. Fieber als eine Maßnahme des Körpers, Pathogene zu bekämpfen und so wieder zur Genesung zu gelangen (in *De Medicina*, iii. 3 aus dem „Journal of the history of medicine and allied sciences“: Band 38, George Rosen, Yale University. Dept. of the History of Medicine - 1983).

Alle fünf Symptome treten in wechselnder Ausprägung und Kombination bei akuten Entzündungen auf. Initiiert wird eine Entzündung zum einen durch ortständige Zellen, wie z.B. Mastzellen und dendritische Zellen, die aktiviert werden und inflammatorische Mediatoren freisetzen. Zum anderen sind es vor allem infiltrierende Leukozyten, wie neutrophile Granulozyten und Monozyten bzw. Makrophagen, die durch freigesetzte chemotaktische Vermittler aus den Blutgefäßen angelockt werden und in das betroffene Gewebe einwandern.

Täglich werden in einem menschlichen Organismus ca. 9×10^8 neutrophile Granulozyten gebildet, die mit einer Lebensdauer von 8-20h zu den Zellpopulationen mit der kürzesten Lebensspanne zählen. Mit einem Anteil von 50-65% repräsentieren sie die Mehrheit unter den Leukozyten und spielen eine zentrale Rolle beim unspezifischen Immunsystem. Neutrophile Granulozyten sind wesentlich an der Immunantwort gegen Bakterien beteiligt, agieren aber ebenso gegen Viren- und Pilzinfektionen.

Im Rahmen entzündlicher Vorgänge kommt es durch proinflammatorische und chemotaktische Zytokine (sog. Chemokine) zur Aktivierung von neutrophilen Granulozyten. Ein häufiges proinflammatorisches Zytokin stellt $\text{TNF}\alpha$ dar, welches

mit Interleukin-1 und Interleukin-6 zu den zentralen Entzündungsmediatoren zählt. $\text{TNF}\alpha$ stimuliert die NADPH Oxidase, fördert die Degranulation von Proteasen, erhöht die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle wie $\beta 2$ -Integrine und führt damit zur Adhäsion an Endothelzellen und extrazellulären Matrixproteinen ^{1,2}. Dies ermöglicht es den Neutrophilen, durch das Endothel zu migrieren und dem chemotaktischen Reiz hin zum Entzündungsort zu folgen. Durch die Bildung von Sauerstoffradikalen, die Freisetzung von Proteasen und die Generation von Zytokinen erfolgt die Bekämpfung fremder Pathogene. Weitere zellbiologische Abwehrmechanismen sind die Phagozytose und die Ausbildung sogenannter extrazellulärer NETs (=neutrophil extracellular traps) ³. Neben den Makrophagen gehören neutrophile Granulozyten zu den „professionellen“ Phagozyten, die über spezifische Rezeptoren pathogenassoziierte Strukturmerkmale der Zielzelle erkennen. Neutrophile können sowohl opsonierte als auch nicht-opsonierte Partikel erkennen. Eine pathogene Opsonierung kann durch Komplementfaktoren wie C3c, C4 oder Antikörper entstehen bzw. durch pathogene DNA selbst. Typisch hierfür wären unmethylierte DNA, CpG Motive und ds RNA. Zu den pathogenspezifischen Rezeptoren zählen der Komplementrezeptor CR1 (CD35), die β -Integrin Untereinheit CD11b, Fc Rezeptoren (CD16, CD32, CD64) und der Toll-like Rezeptor ⁴. NETs bestehen aus Netzwerken extrazellulärer Matrix, die von Neutrophilen gebildet werden und in der Lage sind, Pathogene wie grampositive und gramnegative Bakterien, aber auch Pilze zu beseitigen ^{5,6}. Die Bildung der NETs erfolgt durch Sekretion von Granulaproteinen und Chromatin. Dies geschieht z.B. in Folge von Aktivierung mit PMA, Interleukin-8 oder LPS.

Allerdings können die Abwehrmechanismen der Neutrophilen, die zur Vernichtung eindringender Mikroorganismen führen, bei permanenter Aktivität zur Schädigung von eigenem Gewebe führen. Um dies zu verhindern, gehen die Neutrophilen in einem ersten Schritt in den natürlichen Zelltod (Apoptose) über, was eine Herabregulation der Neutrophilenfunktionen zur Folge hat. Der programmierte Zelltod geht mit Kernfragmentation, Chromatinkondensation, Schrumpfung der Zelle („membrane blebbing“) und Veränderungen an der Zelloberfläche einher. Veränderungen an der Zelloberfläche sind z.B. eine reduzierte Expression und Funktion von Adhäsionsmolekülen, die die Interaktion der Zelle mit extrazellulärer Matrix herabsetzt ⁷. Weitere Veränderungen an der Oberfläche sind u.a. die Reduktion von $\text{Fc}\gamma$ Rezeptoren, des CR1 Rezeptors und von Rezeptoren

proinflammatorischer Zytokine wie des C5a Rezeptors und des TNF α Rezeptors⁸. Apoptotische Neutrophile verlieren somit die Fähigkeit zu migrieren, zu phagozytieren, Sauerstoffradikale zu produzieren. Sie sind außerdem weniger empfänglich für externe Stimuli wie fMLP.

Das Ausmaß der Neutrophilenapoptose wird sowohl durch pro- als auch anti-apoptotische Signale, die von einer entzündlichen Mikroumgebung ausgehen, beeinflusst. Von TNF α und IL-10 ist z.B. bekannt, dass sie Apoptose akzelerieren, wobei TNF einen frühen pro-apoptotischen und einen späten anti-apoptotischen Effekt hat⁹⁻¹¹, LPS, Leukotrien B₄, IL-8 und GM-CSF dagegen verzögern die Neutrophilenapoptose¹²⁻¹⁴. Verzögerungen der Apoptose wurden auch in vivo bei Patienten mit inflammatorischen Erkrankungen beobachtet, etwa beim akuten respiratorischen Syndrom, bei der Sepsis oder beim akuten Koronarsyndrom¹⁵⁻¹⁷.

Verschiedene Signaltransduktionswege sind bei der Neutrophilenapoptose involviert. Es wurde gezeigt, dass Mitogen-aktivierende Proteinkinasen (MAPK) bei der Kontrolle der apoptotischen Vorgänge wichtig sind. Während eine Aktivierung der p38 MAPK Apoptose begünstigt, führt eine Aktivierung von ERK zur Hemmung der Apoptose^{18,19}. Die Phosphoinositol-3-Kinase reguliert ebenfalls die Apoptose über die Phosphorylierung von Akt (PI3K/Akt Signalweg)²⁰⁻²⁴. Von GM-CSF und IL-8 ist bekannt, dass sie über eine Aktivierung der PI3K/Akt und ERK Signalwege eine Verzögerung der Apoptose bewirken²⁵.

In zunehmendem Maße wurde in den letzten zehn Jahren die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B in neutrophilen Granulozyten untersucht. Der Nachweis von NF- κ B in humanen PMN gelang Ende der 90er Jahre erstmals von McDonald und Kollegen²⁶. Aufgrund der hohen proteolytischen Aktivität der neutrophilen Granulozyten erwies sich der Nachweis des Transkriptionsfaktors als kompliziert. Durch methodische Variationen und die Verwendung einer Stickstoff-Druckkammer gelang es, p50 und p65 (RelA) im Zytosol nachzuweisen, während andere Untereinheiten nicht zu detektieren waren²⁷. Die Autoren wiesen in den Neutrophilen eine (geringe) basale NF- κ B DNA Bindungsaktivität nach, die durch verschiedene Stimuli wie TNF α , LPS oder PMA erhöht wurde.

NF- κ B verzögert durch Transkription von "Survival"-Proteinen die Neutrophilenapoptose. Verschiedene Studien demonstrierten, dass die pharmakologische Inhibition von NF- κ B eine Akzeleration der konstitutiven

Neutrophilenapoptose verursachte, und dass bekannte apoptoseverzögernde Effekte durch $\text{TNF}\alpha$ und LPS gehemmt werden konnten²⁸⁻³¹.

Für die Entfernung apoptotischer Neutrophiler werden von diesen sogenannte „eat-me“-Signale auf der Zelloberfläche generiert. Dazu gehören die Präsentation von Phosphatidylserinen und Calreticulin, Veränderungen des Ladungs- und Glykosylierungsmusters an der Oberfläche und Veränderungen am ICAM-1 Epitop. Zur Präsentation der Phosphatidylserine existieren verschiedene Rezeptoren und „bridging“ Moleküle wie TIM-4, Gas 6 Protein S, CD 36, CD 68 und Thrombospondin³². In aktuellen Studien wurde eine Notwendigkeit des Rezeptors für Glykosylierungsprodukte (RAGE) für den Phagozytoseprozess demonstriert, wobei RAGE ebenfalls an Phosphatidylserine bindet^{33,34}. Ein Tiermodell bewies, dass Makrophagen von RAGE knockout Mäusen nur noch vermindert in der Lage waren, apoptotische Neutrophile zu phagozytieren.

Die Entfernung apoptotischer Neutrophiler erfolgt durch Makrophagen, indem sie auf nicht-inflammatorische Weise phagozytieren³⁵. Die Aufnahme apoptotischer Neutrophiler stimuliert die Sekretion anti-inflammatorischer Mediatoren der Phagozyten wie $\text{TGF}\beta$, IL-10 und Prostaglandin E2 und inhibiert die Ausschüttung pro-inflammatorischer Mediatoren wie $\text{TNF}\alpha$ ^{36,37}.

Ist die Phagozytose neutrophiler Granulozyten gestört, gehen die apoptotischen Neutrophilen sekundär in nekrotische Zellen über, welches zur Ausschüttung zytotoxischer Produkte führt und eine weitere Gewebsverletzungen fördert bzw. Inflammation aufrecht erhalten kann^{35,38}.

Gegenüber den bisher mittels gezielter Neutrophilenaktivierung beschriebenen Mechanismen zur Beseitigung pathogener Keime oder zur Resolution von Entzündungen kann eine unkontrollierte Neutrophilenaktivierung anhaltende Inflammation mit ungewollten Gewebeschäden bewirken, wie es bei autoimmunen Erkrankungen vorkommt.

Unsere Arbeitsgruppe befasst sich, neben der allgemeinen Funktionsweise neutrophiler Granulozyten bei der Inflammation, mit den ANCA (Antineutrophilzytoplasmatische Antikörper)-assoziierten Vaskulitiden. Die Erkrankung ist durch eine nekrotisierende Entzündung der kleinen Blutgefäße und durch das Auftreten von ANCA charakterisiert. Innerhalb dieser Krankheitsgruppe unterscheidet man die

Wegenersche Granulomatose, die mikroskopische Polyangiitis, das Churg-Strauss-Syndrom und die renal-limitiert auftretende extrakapillär-proliferative Glomerulonephritis.

1990/91 entdeckte die Gruppe von Falk und Jennette, dass ANCA nicht nur einen serologischen Marker der Erkrankung darstellen, sondern selbst auch Granulozyten stimulieren können, was nachfolgend zur Degranulation und zur Produktion von Sauerstoffradikalen führt^{39,40}.

Dass ANCA eine direkt pathogenetische Rolle inne haben, wurde durch zahlreiche nachfolgende Arbeiten unterstützt, die zeigten, dass ANCA Granulozyten und Monozyten aktivieren⁴¹⁻⁴⁶.

Als primäre Zielantigene wurden eine 29-kDa große neutrale Serinprotease, die Proteinase 3 (PR3), und ein 140-kDa großes Protein, die Myeloperoxidase (MPO), identifiziert⁴⁷⁻⁵².

Im klinischen Alltag korreliert der serologische Nachweis von ANCA eng mit dem Vorhandensein einer aktiven ANCA-Vaskulitis. In einer prospektiven Studie an 180 Patienten vom „Wegener’s Granulomatosis Etanercept Trial (WGET)“ konnte bei 96% der Patienten mit schwerem vaskulitischem Befall und bei 83% mit lokal limitierter Form der Nachweis von ANCA erfolgen⁵³. Desweiteren sind ansteigende ANCA-Titer bei Patienten mit bekannter ANCA-Vaskulitis ein häufiger Vorbote eines drohenden Relaps der Erkrankung⁵⁴⁻⁵⁶. Finkielman und Kollegen zeigten allerdings, dass keine gute Korrelation zwischen Höhe der ANCA-Titer und klinischer Krankheitsaktivität beim Vergleich von ANCA-Patienten untereinander besteht (n=156), und auch nicht beim Vergleich von ANCA-Titern mit dem individuellen Krankheitsverlauf. Weder Anstieg noch Abfall der Titer erschienen zum alleinigen Monitoring einer immunsuppressiven Therapie sinnvoll⁵⁷.

Die Entstehung der ANCA-induzierten Vaskulitis ist ein Prozess, der eines ersten und zweiten “hits” bedarf. Zusammen mit proinflammatorischen Signalen, am ehesten im Rahmen einer Infektion, führen ANCA zur Entstehung des Vollbildes der ANCA Erkrankung.

Von Experimenten in in vitro Zellsystemen ist bekannt, dass niedrige Konzentrationen von proinflammatorischen Mediatoren wie TNF α oder IL-8 eine Voraussetzung für die nachfolgende Aktivierung durch ANCA darstellen^{39,41,58}. Diese niedrig dosierten Primer bewirken per se keine voll ausgeprägte Aktivierung, sondern bereiten den Neutrophilen auf eine nachfolgende Aktivierung vor. Hierbei laufen

verschiedene Reaktionen ab, wie eine Translokation und erhöhte Membranexpression der ANCA-Zielantigene an der Zelloberfläche, an die die ANCA binden können. Das führt zur Bildung reaktiver Sauerstoffradikale und zur Freisetzung lysosomaler proteolytischer Enzyme^{58,59}. Desweiteren führt die Aktivierung mit ANCA zur Hochregulation von Adhäsionsmolekülen wie den β 2-Integrinen CD11b/CD18 mit vermehrter Adhäsion der Neutrophilen an Endothelzellen. ANCA können in Interaktion mit Endothelzellen zur Zellablösung (detachment) und Lyse dieser führen⁶⁰⁻⁶⁴.

Um die direkt pathogene Rolle der ANCA in vivo zu demonstrieren, entwickelte die Gruppe von Charles Jennette und Ron Falk ein MPO-positives Vaskulitis Mausmodell. MPO knockout Mäuse wurden hierfür mit murinem MPO immunisiert und entwickelten Antikörper gegen MPO. Durch den Transfer von Splenozyten dieser Tiere in RAG2 knockout Mäuse, die weder funktionsfähige T- noch B-Lymphozyten besitzen, erkrankten die Tiere an einer extrakapillär proliferativen Glomerulonephritis und einer Vaskulitis der Lunge⁶⁵.

In derselben Arbeit wurde aus den immunisierten Mäusen isoliertes IgG in MPO- positive Wildtyp Tiere transferiert. Auch hierbei wurde eine proliferative Glomerulonephritis induziert. Sie war pauci-immun und glich damit der humanen Erkrankung. Schreiber et al. aus unser Arbeitsgruppe optimierten das Tiermodell durch Knochenmarktransfer von Wildtyptieren in MPO knockout Tiere, die zuvor durch Injektion von murinem MPO anti-MPO Antikörper gebildet hatten und durch Bestrahlung Knochenmark-eradiziert worden waren. Diese Tiere entwickelten ebenfalls das Vollbild der Vaskulitis, und die Ergebnisse verdeutlichten, dass MPO- positive zirkulierende Zellen das primäre Ziel der ANCA und ausreichend zur Krankheitsinduktion sind⁶⁶. Xiao et al. demonstrierten in einer weiteren Publikation, dass die Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und ANCA für die Erkrankung notwendig ist. Eine in deren Arbeit durchgeführte spezifische Depletion neutrophiler Granulozyten schützte die oben beschriebenen Tiere vor einer Erkrankung⁶⁷. Heeringa et al. benutzten LPS-geprimte Wildtyptiere, denen anti-MPO Antikörper injiziert wurden und die ebenfalls erkrankten⁶⁸.

Als wohl direktester Nachweis der pathogenen Rolle von ANCA im Menschen wurde im klinischen Alltag 2005 von einer schwangeren Frau berichtet, die in der Anamnese bereits ein durch MPO-Antikörper induziertes pulmo-renales Syndrom

erlitten hatte. Während der Schwangerschaft kam es zu einem transplazentaren Transfer von MPO-ANCA und zur Erkrankung des Neugeborenen mit eingeschränkter Nierenfunktion und Lungenbluten. Im Blut des Kindes gelang der Nachweis eines erhöhten MPO Titers, der dem der Mutter glich⁶⁹.

Demgegenüber konnte bisher für anti-PR3 ANCA kein überzeugendes Tiermodell mit Induktion einer systemischen Vaskulitis und Glomerulonephritis entwickelt werden. Die Gruppe um Jenne behandelte Wildtypmäuse mittels passiven Transfers von murinem PR3-ANCA, welches zuvor in PR3-knockout Mäusen generiert worden war. Trotz des Nachweises von PR3-ANCA im Serum der Tiere konnte weder in der Niere noch in der Lunge eine Vaskulitis induziert werden. Ein Teil der Tiere wurde zusätzlich mit LPS vorbehandelt, auch mit diesem Priming kam es zu keiner Ausbildung einer Vaskulitis⁷⁰.

In unstimulierten neutrophilen Granulozyten existieren zwei Subpopulationen mit membranpositiver und membrannegativer PR3 Expression. Dieses bimodale PR3-Expressionsmuster ist intraindividuell stabil⁷¹⁻⁷⁴. Matsumoto et al. untersuchten 2006 die PR3 Expression bei Patienten mit Sepsis und stellten einen höheren prozentualen PR3 Anteil bei Patienten mit Sepsis fest. Zudem korrelierte der inflammatorische Marker CRP positiv mit der PR3 Expression⁷⁵. Der Verlauf der intraindividuellen PR3 Expression bei Patienten mit Sepsis im Vergleich zu Patienten mit anderen Krankheiten ist deswegen auch Gegenstand weiterer Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe.

Als Bindungspartner für PR3 identifizierte unsere Arbeitsgruppe sowie Bauer et al. einen Rezeptor, das CD177 (oder NB1), der auf der Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten exprimiert wird und ebenfalls ein bimodales Muster aufweist, welches dem prozentualen PR3 Anteil exakt entspricht^{76,77}. Die Autoren zeigten weiterhin, dass ANCA an die NB1^{pos}/mPR3^{high} Subpopulation binden. Die funktionelle Bedeutung dessen wurde nachfolgend von Schreiber et al. demonstriert, indem PR3-ANCA nur in der mPR3^{high} Subpopulation den Signalweg PI3K/Akt aktivierten und zur Sauerstoffradikalenproduktion und Degranulation führten⁷⁸.

Verschiedene Membranpartner wurden für die Proteinase 3 identifiziert. Dazu gehören CD16/Fc γ RIIIb, Phospholipid Scramblase-1, CD11b/CD18 und CD177/NB1^{76,79-83}. Unsere Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass sich bei der Präzipitation von NB1 aus der Neutrophilenmembran CD11b/CD18 als ein Bindungspartner

herausstellte, und dass die NB1-CD11b/CD18 Interaktion eine notwendige Voraussetzung für die PR3-ANCA vermittelte Neutrophilenaktivierung war⁸⁴. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Entwicklung eines spezifischen PR3 Inhibitors, der die aktive PR3 Form von der Membran aktivierter neutrophiler Granulozyten verdrängt bzw. die Bindung an den NB1 Rezeptor verhindert, von therapeutischem Nutzen sein könnte. Eine solche Substanz könnte die ANCA Bindung und Aktivierung beeinflussen. Es wäre somit eine therapeutische Anwendung bei Patienten mit PR3-ANCA vermittelten Vaskulitiden denkbar.

An der ANCA Aktivierung sind unterschiedliche Signalwege beteiligt, deren Beeinflussung durch Inhibitoren *in vitro* und/ oder *in vivo* und anhand von Knockout-Mausmodellen getestet wurde. Die bereits erwähnte TNF-induzierte Translokation der PR3/MPO Antigene in den Neutrophilen wird durch den p38 MAPK Signalweg kontrolliert⁴¹. Diese ANCA-Antigene binden an Fc γ Rezeptoren und stimulieren dabei zwei distinkte Signalwege, zum einen Syk und cbl und zum anderen das heterotrimere G-Protein Gi, welches wiederum die PI3-Kinase, Proteinkinase B und p21 ras aktiviert. Beide Signalwege sind zudem für die Sauerstoffradikalenproduktion notwendig⁸⁵⁻⁸⁹. Die *in vivo* Relevanz des PI3K/Akt Signalwegs wurde von Schreiber et al. untersucht. Insbesondere wurde hierbei gezeigt, dass die PI3K γ Unterform, als oraler Inhibitor verabreicht, eine deutliche Verminderung der Schwere der ANCA-induzierten Glomerulonephritis bewirkte. *In vitro* zeigte der Inhibitor eine Hemmung ANCA-induzierter Neutrophilenfunktionen wie Minderung der Degranulation, Sauerstoffradikalenproduktion und Neutrophilentransmigration⁹⁰.

Obwohl es sich bei der ANCA-induzierten Glomerulonephritis um eine pauci-immune Form handelt, kommt der Komplementkaskade bei der Entstehung der ANCA-Erkrankung eine wesentliche Rolle zu. Mäuse, die einen Mangel an Faktor B oder C3 aufwiesen, die dem alternativen Komplementweg zugehören, waren vor einer ANCA-Erkrankung geschützt⁹¹. Schreiber et al. zeigten in einer Nachfolgearbeit, dass insbesondere der Anaphylatoxinrezeptor für C5a die Neutrophilenaktivierung und den Progress der Glomerulonephritis bestimmt⁹². Anhand von Nierenbiopsien von sieben Patienten mit nachgewiesener MPO-positiver Vaskulitis zeigten Xing et al. mittels immunhistochemischer Färbungen ebenfalls die Beteiligung des alternativen Komplementweges und postulieren eine pathogene Rolle bei der Nierenschädigung

Ziel meiner experimentellen Arbeiten war es, weitere Mechanismen der Aktivierung neutrophiler Granulozyten zu charakterisieren und nach therapeutischen Strategien zur Minimierung der ANCA- vermittelten Neutrophilenaktivierung zu suchen.

II. Eigene Originalarbeiten

1. Statine hemmen die ANCA-induzierte Aktivierung humaner neutrophiler Granulozyten über den ERK Signaltransduktionsweg.

Choi M, Rolle S, Rane M, Haller H, Luft FC, Kettritz R. *Extracellular signal-regulated kinase inhibition by statins inhibits neutrophil activation by ANCA. Kidney Int. 2003 Jan;63(1):96-106*

HMG-CoA Reduktaseinhibitoren (Statine) werden zur Senkung des LDL-Cholesterins angewendet und zur Prevention oder zur Vermeidung einer Progression von Arteriosklerose bzw. zur Sekundärprävention kardiologischer Ereignisse bei bekannter KHK oder bei Diabetes mellitus eingesetzt⁹⁴⁻⁹⁸.

Zahlreiche Arbeiten zeigten pleiotrope Effekte, die unabhängig von der Cholesterolsenkenden Wirkung waren. Statine senken z.B. C-reaktives Protein unabhängig von der Höhe des LDL-Levels⁹⁹⁻¹⁰¹.

Desweiteren wurde gezeigt, dass Angiotensin II-induzierte Nierenschädigungen durch Statine vermindert werden konnten¹⁰². Zusätzliche Daten weisen darauf hin, dass Pravastatin zum einen die Neutrophilenchemotaxis und –transmigration hemmt, und zum anderen die Sauerstoffradikalenproduktion in fMLP stimulierten Neutrophilen durch Hemmung der Tyrosinphosphorylierung inhibiert^{103,104}.

Die ANCA-Vaskulitis wird mit Glukokortikoiden und Immunsuppressiva behandelt. Wünschenswert wäre ein besseres Verständnis der intrazellulären Mechanismen, um ANCA-induzierte entzündliche Prozesse mit spezifischen und damit weniger toxischen Ansätzen beeinflussen zu können. Deswegen war es Ziel der Untersuchung, die Einflüsse von Statinen auf die ANCA-induzierte Aktivierung humaner neutrophiler Granulozyten zu untersuchen. Wir testeten die Hypothese, dass Statine die ANCA-induzierte Sauerstoffradikalenproduktion vermindern können. Zu diesem Zweck isolierten wir humane neutrophile Granulozyten von gesunden Spendern und stimulierten diese nach Priming mit TNF α mit monoklonalen MPO-Antikörpern. Vorbehandlung der PMN mit Statinen, sowohl mit dem eher lipophilen

Simvastatin als auch mit dem eher hydrophilem Cerivastatin, führten zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der Sauerstoffradikalenproduktion. Dies konnten wir in zwei verschiedenen Tests, dem Ferricytochromreduktionsassay und dem Nitroblue Tetrazolium Test, bestätigen. Denselben hemmenden Effekt zeigten wir auch unter Verwendung von ANCA-Präparationen, die aus Vaskulitispatienten aufgereinigt wurden (PR3-ANCA oder MPO-ANCA). Um zu differenzieren, ob Statine das Priming der PMN oder ANCA-induziertes Signaling beeinflussen, fügten wir das Statin in einem nächsten Schritt erst nach der Priming Phase der Neutrophilen hinzu. Die Sauerstoffradikalenproduktion nach anschließender ANCA-Aktivierung konnte jedoch nicht mehr gehemmt werden.

TNF α Priming führt in Neutrophilen zur Translokation von MPO- und PR3-Antigen vom Zytoplasma an die Zelloberfläche. Wir untersuchten deswegen den Einfluss der Statine auf die Translokation anhand der FACS-Durchflusszytometrie. In der Tat konnten wir eine verminderte Translokation der Antigene an die Oberfläche bei TNF α -geprimten PMN beobachten, die zuvor mit Statin inkubiert wurden. Da der Vorgang des TNF-Primings durch die Signaltransduktionswege p38 MAPkinase und ERK kontrolliert wird, prüften wir mittels Western Blot Assays, welche Signalwege durch Statine beeinflusst werden. Hierbei stellten wir fest, dass Statine den ERK Signalweg während des TNF α -Primings dosisabhängig hemmten, während sie keinen Einfluss auf die p38 MAPkinase zeigten.

Unsere Daten zeigten erstmalig eine Reduktion der Sauerstoffradikalenproduktion in ANCA-aktivierten humanen PMN durch Statine. Wir fanden heraus, dass Statine vorwiegend die Priming-Phase beeinflussen, und dass der verantwortliche Signaltransduktionsweg dabei die MAPKinase ERK ist. Unsere Daten gehen konform mit anderen Studien, die den Einfluss der Statine auf MAPKinasen untersuchten. Simvastatin verminderte die MAPKinasen Aktivität in humanen koronaren Endothelzellen, Cerivastatin verhinderte eine Angiotensin-II-induzierte ERK Phosphorylierung in aortalen Muskelzellen von Ratten^{102,105}.

Statine könnten dazu beitragen, während der inflammatorischen Prozesse bei ANCA-assoziierten Vaskulitiden die Krankheitsaktivität zu vermindern. Diese in vitro Daten erweitern unser Verständnis zu intrazellulären Signalwegen in ANCA-aktivierten Neutrophilen und bieten einen therapeutischen Ansatz an, der jedoch sicherlich weiterer Untersuchungen in vivo bedarf.

2. Die Hemmung von NF- κ B durch ein TAT-NEMO-Bindungsdomänen Peptid akzeleriert die konstitutive Apoptose und verhindert die LPS-vermittelte Neutrophilenapoptose

Choi M, Rolle S, Wellner M, Cardoso MC, Scheidereit C, Luft FC, Kettritz R. *Inhibition of NF- κ B by a TAT-NEMO-binding domain peptide accelerates constitutive apoptosis and abrogates LPS-delayed neutrophil apoptosis.* *Blood.* 2003 Sep 15;102(6):2259-67.

Die Terminierung entzündlicher Prozesse wird zum großen Teil durch die Apoptose neutrophiler Granulozyten reguliert. Die Entfernung apoptotischer PMN geschieht auf nicht-inflammatorische Weise ¹⁰⁶. Eine verzögerte Apoptose oder eine gestörte Entfernung neutrophiler Granulozyten führt gegenseitig zur Zunahme von Entzündung und zur gesteigerten oder prolongierten Gewebsverletzung.

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B kontrolliert die Expression zahlreicher Gene während entzündlicher Vorgänge, bei der Zellproliferation, bei Stressantworten und während der Apoptose ¹⁰⁷⁻¹¹⁰. Die wenigen Studien, die bis zum Beginn meines Projekts in Neutrophilen durchgeführt wurden, legten nahe, dass NF- κ B in der Regulation der Apoptose dieser Zellen eine bedeutsame Rolle spielt ^{30,31,111}. Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt durch Zytokine, virale Infektionen, UV-Strahlung und Radikale ¹¹².

In ruhenden Zellen liegt NF- κ B an Inhibitoren (I κ B α , I κ B β , I κ B γ) gebunden im Zytoplasma vor. Diese Inhibitoren werden phosphoryliert und rasch degradiert, sobald ein entsprechender Stimulus vorliegt, sodass NF- κ B in den Kern translozieren kann, um dort an DNA zu binden und Zielgene zu aktivieren. I κ B α wird durch die I κ B Kinase (IKK) phosphoryliert, die aus den beiden katalytischen Untereinheiten IKK α and IKK β und aus der regulatorischen Untereinheit IKK γ besteht ¹¹³⁻¹¹⁶.

Im Gegensatz zu anderen Zelltypen war die Rolle von NF- κ B in neutrophilen Granulozyten nur sehr unzureichend charakterisiert, was a) an der raschen Degradation von NF- κ B durch große intrazelluläre Mengen an aktiven proteolytischen Enzymen liegt, b) an der Schwierigkeit, PMNs zu infizieren und c) am Mangel hoch spezifischer Inhibitoren. Studien mit pharmakologischen Substanzen

wie PDTC, SN50 und Gliotoxin deuteten darauf hin, dass NF- κ B eine wesentliche Rolle in der Regulation der Neutrophilenapoptose zukommt^{29,117}.

Die Transduktion von PMN mit biologisch aktiven Peptiden kann dazu beitragen, intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden besser zu untersuchen und zu verstehen, und sie kann letztendlich auch therapeutisch genutzt werden. PMN sind jedoch kurzlebig, terminal differenziert und kaum zu infizieren. Bisherige Methoden wie Elektroporation, lipidbasierte Transfektionsansätze oder Calciumphosphat Transfektion waren nicht von Erfolg gekrönt.

Aus diesem Grund untersuchten wir die Tauglichkeit eines abgewandelten natürlichen Proteins, welches zur Gruppe der „trojanischen Pferde“ gehört. Diese Proteine sind in der Lage, Zellen zu transfizieren. Wir benutzten hierfür eine nur 11 Aminosäuren lange Peptidsequenz des humanen Immunodefizienz Virus TAT (HIV-TAT), um PMN zu transduzieren. Diese Methode war für andere Zellarten, jedoch nicht für Neutrophile beschrieben¹¹⁸⁻¹²⁰. Daran gekoppelt generierten wir ein hochspezifisches Peptid (NBD = Nemo binding domain), von dem bekannt ist, dass es die Interaktion zwischen IKK γ und dem IKK Komplex hemmt¹²¹.

Zunächst stellten wir mit einem FITC-gelabeltem HIV-TAT Peptid sicher, dass die Substanz tatsächlich in die Neutrophilen gelangt. Mittels Durchflusszytometrie und der Mikroskopie konnten wir dokumentieren, dass freies FITC nicht in die Zellen gelangt, während FITC gekoppelt an die TAT Sequenz schnell und effektiv transduziert wird. Bisher gab es keine beschriebenen Transfektionsmethoden, die in PMN vergleichbar effektiv waren.

Um Neutrophilenapoptose zu untersuchen, benutzten wir LPS, GM-CSF und Dexamethason, von denen bekannt ist, dass sie die Neutrophilenapoptose verzögern^{25,122}.

Nach 20 Stunden Kultivierung der Zellen mit Puffer, LPS, GM-CSF und Dexamethason beobachteten wir in PMN bei allen drei Substanzen eine Verzögerung der Apoptose. Um den Einfluss von NF- κ B dabei zu untersuchen, führten wir nach Behandlung von PMN mit LPS, GM-CSF und Dexamethason Western Blots, Gelshift Assays (EMSA) und Taqman durch, die zeigten, dass nur LPS zu einer Degradation von I κ B α im Western Blot, Aktivierung von NF- κ B im Gelshift und Hochregulation von I κ B α , welches selbst ein NF- κ B-abhängiges Gen

darstellt, führte. Die Vorbehandlung der PMN mit dem NBD-TAT Protein führte dazu, dass die NF- κ B Aktivierung gehemmt wurde. Die Zugabe des Peptids während der LPS-verzögerten Apoptose führte zu einer kompletten Hemmung des LPS Effekts und zu einer Apoptose, die mit der konstitutiven Apoptose vergleichbar war.

Mit dem NF- κ B inhibitorischen Peptid konnten wir auch bei der konstitutiven Apoptose einen Anstieg der Apoptoserate zeigen. Das Ergebnis weist darauf hin, dass auch in nicht-stimulierten PMN eine basale NF- κ B Aktivität vorliegt, die das Zellüberleben kontrolliert.

Mit den erhobenen Daten konnten wir zeigen, dass sowohl die konstitutive als auch die LPS-verzögerte Apoptose durch NF- κ B kontrolliert werden, und dass TAT Transduktionsdomänen ein effizientes Tool darstellen, um spezifische intrazelluläre Ziele, sogar in PMN, zu manipulieren.

3. Die PI3K/Akt-vermittelte Hemmung ANCA-induzierter Neutrophilenaktivierung durch febrile Temperaturen

von Vietinghoff S, **Choi M**, Rolle S, Luft FC, Kettritz R. Febrile temperatures control antineutrophil cytoplasmic autoantibody-induced neutrophil activation via inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. *Arthritis Rheum.* 2007 Sep;56(9):3149-58.

(geteilte Erstautorenschaft)

Während lokaler und systemischer Entzündungsprozesse werden neutrophile Granulozyten erhöhten Temperaturen ausgesetzt. Der Effekt erhöhter Fieber simulierender Temperaturen auf Neutrophilenfunktionen und –signaling wurde jedoch nur wenig untersucht. Unsere Hypothese war, dass erhöhte Temperaturen eine physiologische anti-entzündliche Wirkung haben. Diese Untersuchungen sind auch im Hinblick auf die weit verbreiteten, großzügigen fiebersenkenden Maßnahmen im klinischen Alltag von Bedeutung. In anderen Studien war gezeigt worden, dass z.B. in vitro Hitzeschockapplikation in Hepatozyten von Ratten zu einer Hemmung von NF- κ B und Stickstoffmonoxid führte, oder dass Ganzkörperhyperthermie in einem Endotoxin Mausmodell das Überleben der Tiere verbesserte^{123,124}.

In eigenen Arbeiten untersuchten wir den Einfluss fieber-ähnlicher Temperaturen in PMN. Wir hatten in unserer Arbeitsgruppe bereits herausgefunden, dass moderate kurzzeitige Temperaturerhöhungen die Aktivierung von NF- κ B und dadurch auch anti-apoptotische Signale inhibieren^{125,126}. Die Hemmung auf das Neutrophilensignaling konnten wir auch in Mäusen demonstrieren, die kurzzeitigen Temperaturerhöhungen von 40,5°C ausgesetzt wurden. Somit hatten wir starke Hinweise für die Relevanz dieser Befunde in komplexen in vivo Situationen.

Auch bei der ANCA-assoziierten Vaskulitis tritt im Rahmen der Erkrankung häufig Fieber auf, insbesondere wenn diese mit Infekten einhergehen. Infektionen sind zudem eine häufig gesehene Komplikation während einer immunsuppressiven Therapie zur Behandlung der Vaskulitis. Wir untersuchten daher, ob eine kurzzeitige, Fieberschübe simulierende Hitzeexposition die Signaltransduktion hemmen kann.

Darüber hinaus fragten wir uns, ob diese Manipulation auch die Sauerstoffradikalenproduktion in Zytokin-getriggerten und ANCA-aktivierten Neutrophilen herabsetzt.

Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, setzten wir isolierte humane Neutrophile über 60 Minuten erhöhten Temperaturen aus, die von 37°C bis 42°C reichten. Anschließend primten wir die Zellen mit TNF α oder GM-CSF und stimulierten mit monoklonalen Antikörpern gegen die ANCA-Zielantigene PR3 oder MPO. Wir konnten, unabhängig vom Priming mit TNF α oder GM-CSF, eine zunehmende Hemmung der Sauerstoffradikalenproduktion bei ansteigenden Temperaturen beobachten. Zum genaueren Verständnis zugrundeliegender Mechanismen untersuchten wir im Folgenden die zentralen Signaltransduktionswege PI3K/Akt, ERK und p38 MAPK. Wir präinkubierten zunächst die Zellen vor der ANCA Stimulation mit synthetischen Hemmern der Signalwege. Bei Hemmung von PI3K/Akt und p38 wurde die O₂⁻ Generation geblockt, während die Hemmung von ERK keinen solchen Effekt zeigte. Hitzeexposition dagegen bewirkte, dass im Western Blot nur die Phosphorylierung von Akt gehemmt werden konnte. Daraus folgerten wir, dass die hitzeinduzierte Hemmung der ANCA-induzierten O₂⁻ Produktion auf eine Hemmung von Akt zurückzuführen ist.

Wir konnten mit diesen Daten erstmals demonstrieren, dass Hitzeexposition einen inhibitorischen Effekt auf die ANCA-induzierte Neutrophilenaktivierung hat, und dass dies unter verschiedenen pro-inflammatorischen Primingkonditionen auftritt. Dieser Effekt war „dosisabhängig“ in einem Temperaturbereich zwischen 37 bis 42°C.

Dass PI3K/Akt für die ANCA-Aktivierung eine wesentliche Rolle spielt, hatten Ben-Smith und Kollegen sowie unsere Arbeitsgruppe bereits gezeigt^{85,86}. Zusätzlich haben wir in dieser Studie gezeigt, dass PI3K/Akt auch für die ANCA-induzierte Aktivierung in GM-CSF geprimten PMN wichtig ist. Diese Tatsache konnten wir später auch in komplexen in vivo Situationen unter Verwendung eines Mausmodells bestätigen¹²⁷.

Als Konsequenz postulieren wir, dass systemisches Fieber und lokal erhöhte Temperaturen im inflammatorischen Gewebe anti-entzündliche Funktionen ausüben. Dieser Effekt stellt einen natürlichen Abwehrmechanismus dar. Der unkritische

Einsatz fiebersenkender Präparate könnte diesen natürlichen Mechanismus ausschalten.

4. Kurzzeitige Hitzeexpositionen hemmen entzündliche Prozesse durch Verhinderung der Neutrophilenmigration und Hemmung der NF- κ B Aktivierung in neutrophilen Granulozyten, die chemotaktischen Stimuli ausgesetzt sind

Choi M, Salanova B, Rolle S, Wellner M, Schneider W, Luft FC, Kettritz R. Short-term heat exposure inhibits inflammation by abrogating recruitment of and nuclear factor kappaB activation in neutrophils exposed to chemotactic cytokines. Am J Pathol. 2008 Feb; 172(2): 367-377.

In der zuvor angeführten Arbeit demonstrierten wir den inhibitorischen Effekt erhöhter Temperaturen auf die ANCA-induzierte Neutrophilenaktivierung, die durch den Signaltransduktionsweg PI3K/Akt vermittelt wird.

Sepsis bzw. lokal entzündliche Prozesse führen zu einer verstärkten Leukozytenmigration an den Ort des Geschehens¹²⁸. GM-CSF und IL-8 sind dabei wichtige Chemokine, die neutrophile Granulozyten anlocken und wiederum primen¹²⁹⁻¹³². Unsere Hypothese, dass Fieber antientzündlich wirkt, indem es inflammatorische Antworten unterdrückt, könnte dazu beitragen, zytokininduzierte Schäden zu vermindern. In der Literatur existieren dazu zahlreiche Daten, die diese Hypothese stützen. So wurde z.B. in Endotoxin-stimulierten Makrophagen nach vorhergehendem Hitzeschock eine verminderte TNF α Produktion beobachtet¹³³. Um die Hypothese in vivo zu prüfen, etablierten wir in der Maus ein neutrophilenspezifisches Entzündungsmodell der Haut, indem wir uns die chemotaktische Wirkung von GM-CSF und IL-8 zu Nutze machten. In einem ersten Schritt adhären und interagieren zirkulierende Neutrophile mit Gefäßendothel und intrazellulären Matrixbestandteilen, ehe sie an den Ort der Entzündung migrieren. Unsere Annahme war, dass moderate Hitzeexposition in vivo antiinflammatorische Effekte aufweist. Wir untersuchten hierbei insbesondere den Effekt auf die Neutrophilenmigration und die Aktivierung von NF- κ B.

Verschiedene Arbeitsgruppen hatten gezeigt, dass die Adhäsion an extrazelluläre Matrix durch β 2-Integrine intrazelluläre Signaltransduktionswege und deren

biologische Wirkung verstärkt^{7,134-138}. In vorhergehenden Arbeiten hatten wir herausgefunden, dass GM-CSF und IL-8 unter Suspensionsbedingungen nicht zu einer Aktivierung von NF- κ B führten, diese Fähigkeit aber durch ein kostimulatorisches Signal über β 2-Integrine erlangten¹³⁹.

Daher stellen durch Chemokine aktivierte Neutrophile, die in entzündetes Gewebe migrieren, eine Entstehungsquelle NF- κ B-regulierter Moleküle dar. NF- κ B ist somit ein potenter übergeordneter Regulator proinflammatorischer Antworten.

Um den Einfluss fieberähnlicher Temperaturen zu prüfen, setzten wir 8-12 Wochen alte Mäuse einer Ganzkörperhyperthermie aus. Mit Hilfe von Wärmeplatten erhöhten wir die rektal gemessene Körperkerntemperatur in narkotisierten Tieren auf 40°C für 60 Minuten, während die Kontrolltiere bei einer Körperkerntemperatur von 37°C gehalten wurden. Nach einer Erholungsphase von einer Stunde wurde intradermal GM-CSF oder IL-8 injiziert bzw. PBS als Lösungsmittelkontrolle. Die Tiere wurden nach drei Stunden getötet, und die Haut wurde einer histologischen Untersuchung unterzogen. Bei den normothermen Tieren war in der GM-CSF- und IL-8-behandelten Haut eine starke Neutrophileninfiltration zu sehen, die in den hyperthermiebehandelten Tieren deutlich vermindert war. Mittels in-situ Hybridisierung untersuchten wir als NF- κ B-abhängiges Gen die I κ B α mRNA Expression im Hautinfiltrat. Zytokin-behandelte Haut in normothermen Mäusen zeigte eine deutliche Expression der mRNA als Zeichen einer erhöhten NF- κ B Aktivität, während in hitzebehandelten Tieren ein signifikant verminderter mRNA Nachweis vorlag.

Um zu untersuchen, welche biologischen Neutrophilenfunktionen durch Hitze beeinflusst werden, isolierten wir humane PMN in vitro und eruierten den Hitzeeffekt auf Neutrophilenadhäsion, -spreading und -migration. Wir erwärmten PMN auf Temperaturen von 40°C und beobachteten bei der GM-CSF und IL-8 gerichteten Neutrophilenmigration eine signifikante Hemmung, während die Erwärmung keinerlei Effekte auf Adhäsion und Spreading hatte. Einen zelltoxischen Effekt kurzzeitiger Hitzeexposition schlossen wir durch verschiedene Visualitätstests aus. Da sowohl Zytokinrezeptoren als auch β 2-Integrine für das Anlocken der PMN und für das Signaling wichtig sind, prüften wir anhand der Durchflusszytometrie, ob sich die Rezeptorexpression von GM-CSF, IL-8 oder CD18 nach Hitzebehandlung verändert.

Dies war nicht der Fall, sodass der Effekt nicht durch ein sogenanntes Rezeptorshedding zu erklären war.

Da die zytokin-induzierte Migration mit synthetischen Inhibitoren von PI3K/Akt und ERK signifikant vermindert war, testeten wir als nächstes, ob Hitze die Phosphorylierung dieser Signalwege verändert. Beide Zytokine führen in PMN zu einer starken Phosphorylierung von Akt und ERK, aber nur die Akt-Phosphorylierung wurde durch vorherige Hitzebehandlung gehemmt. In der Literatur wurde von anderen Autoren ebenfalls berichtet, dass PI3K/Akt die Neutrophilenmigration kontrolliert, wenn GM-CSF oder IL-8 als Chemokine benutzt werden. Dagegen ist immer noch Gegenstand der Diskussionen, ob ERK bei der Neutrophilenmigration eine Rolle zukommt.

Im entzündlichen Hautmodell demonstrierten wir, wie oben beschrieben, eine Hemmung NF- κ B abhängiger mRNA nach Hitzeexposition. Wir prüften, ob Hitzebehandlung auch eine GM-CSF- bzw. IL-8-induzierte NF- κ B Aktivierung hemmt, wenn die Neutrophilen auf Fibronectin aufliegen. Unter diesen Bedingungen erhielten die Neutrophilen ein zytokinvermitteltes und ein β 2-integrinabhängiges Signal. Beide Signale kooperieren bei der NF- κ B Aktivierung. Die Vorbehandlung der Zellen erfolgte mit 40°C oder 37°C, bevor sie mit Zytokinen stimuliert wurden. Wir führten verschiedene NF- κ B Assays durch (Western Blot, EMSA, Taqman), die übereinstimmend eine NF- κ B Hemmung durch kurzzeitige Hitzeexposition ergaben. Für eine in vivo relevante Bestätigung des Effekts isolierten wir Knochenmarksneutrophile nach Hitzebehandlung von Mäusen und stimulierten die Zellen mit murinem GM-CSF unter Suspensions- oder Adhäsionsbedingungen. Wie erwartet, sahen wir in Suspensionszellen keine NF- κ B Aktivierung, aber dafür eine sehr starke Aktivierung in PMN auf Fibronectin. Die hitzebehandelten PMN konnten NF- κ B auch unter Adhäsionsbedingungen nicht aktivieren.

Durch unsere Studie konnten wir somit erstmals beschreiben, dass fieberähnliche Temperaturen a) in vivo zu einer deutlichen Verminderung einer neutrophilenspezifischen Hautentzündung führen, b) in vitro Neutrophilenmigrationen durch eine Hemmung des PI3K/Akt-Pathways reduzieren und c) in vivo und in vitro auch zu einer Hemmung von NF- κ B und NF- κ B-abhängiger Genexpression führen,

wenn die Zytokinstimulation in Anwesenheit eines kostimulatorischen β 2-Integrinsignals erfolgt.

Wir zeigen, dass Fieber inflammatorische Antworten limitiert, können dabei jedoch nicht ausschließen, dass dabei auch wichtige Signale unterdrückt werden, die zur Resolution von Entzündungsprozessen wichtig sind. Wir haben erste Einblicke in temperaturabhängige zellbiologische Mechanismen gewonnen. Das natürliche Phänomen Fieber und dessen komplexe Bedeutung bedarf weiterer Forschung.

5. Identifikation von Inhibitoren der PR3-NB1 Interaktion durch ein small molecule high-throughput screening

Choi M, Eulenberg C, Rolle S, Wellner M, von Kries JP, Luft FC, Kettritz R. *The use of small molecule high-throughput screening to identify inhibitors of the proteinase 3-NB1 interaction. Clin Exp Immunol 2010, Aug; 161(2):389-96*

Wie bereits erwähnt, ist die Serinprotease Proteinase 3 (PR3) das wichtigste Autoantigen für ANCA bei der Wegener Granulomatose. Die Bindung von PR3-ANCA an Zytokin-geprimte Neutrophile führt zur Sauerstoffradikalenproduktion, erhöht die Adhäsion und Degranulation proteolytischer Enzyme und führt zur dysregulierten Apoptose in vitro^{59,140}. In Tiermodellen wurde bewiesen, dass die Interaktion von ANCA mit Neutrophilen einen Schlüsselmechanismus für die Erkrankung darstellt^{65,66,141}.

Wir haben zudem in früheren Arbeiten demonstriert, dass der GPI-verankerte Rezeptor NB1 (CD177) PR3 auf der Oberfläche präsentiert^{76,142}. NB1 und PR3 werden auf der Oberflächenmembran exprimiert, und der Prozentsatz membranpositiver Zellen für beide Moleküle liegt zwischen 0 und 100%. Ein höherer Prozentsatz mPR3/ NB1 positiver Zellen ist mit einem gesteigerten Risiko für ein schlechteres Outcome der ANCA Vaskulitis assoziiert^{71,72,79,143}.

PR3 befindet sich in neutrophilen Granulozyten v.a. in den primären Granula. Es wurde aber auch in den sekundären und sekretorischen Granula nachgewiesen^{49,71,144-146}, während NB1 in den sekundären und tertiären Granula vorkommt^{142,147}.

Es ist bekannt, dass die Membran-PR3 Expression durch Zytokinpriming, während der Adhäsion in Gegenwart von ANCA und als Folge der Apoptose hochreguliert wird^{9,148-151}. Der genaue Mechanismus dagegen, der zur zunehmenden Expression von PR3 auf der Oberfläche NB1-positiver Zellen führt, ist nicht geklärt. Vorstellbar wäre, dass intrazelluläres NB1 und PR3 unabhängig voneinander an die Oberfläche translozieren und dort miteinander einen Komplex bilden. Als zweite Hypothese könnten PR3 und NB1 als präformierter Komplex translozieren. Als dritter Weg wäre denkbar, dass PR3 sezerniert wird und als extrazelluläres PR3 an den NB1 Rezeptor

bindet¹⁵². Die Hemmung der Assoziation von PR3 mit NB1 oder die Auflösung eines vorhandenen Komplexes könnte therapeutische Auswirkungen für die PR3-ANCA induzierte Neutrophilenaktivierung haben.

Um synthetische Peptide zu finden, die diese Assoziation stören, führten wir ein „high-throughput“ Screening mit einer Bibliothek von 20.000 kleinmolekularen Substanzen durch. Diese Methode wird bei einer Reihe verschiedener Fragestellungen zunehmend genutzt. Das Compound Screening ist an unserem Institut für Molekulare Pharmakologie etabliert und hatte bereits zur Identifizierung von Molekülen geführt, die z.B. die aktive Stelle des P450 Enzyms CYP130, die Sterol 14 α -Demethylase CYP51 und die Protein Phosphatase Shp2 blockierten¹⁵³⁻¹⁵⁵.

Wir etablierten zur Durchführung des Screenings zuerst einen zellbasierten Assay. Voraussetzung dafür waren NB1-exprimierende Zellen, die in 384-well Platten adhären und sich auch nach mehreren Waschschritten nicht ablösen. Da PMNs diese Bedingungen nicht erfüllen konnten, wählten wir HEK293 Zellen und transfizierten diese mit NB1. Nach Optimierung der experimentellen Bedingungen erzielten wir eine NB1-Expression von über 95%, die für mindestens vier Tage stabil blieb. Über einen Pipettierroboter wurden die Compounds in die Wells appliziert, danach wurde exogenes PR3 hinzugegeben. Die Zellen wurden nach mehreren Waschschritten mit FITC-markierten anti-PR3 Antikörpern gefärbt und die Expression im Photometer bestimmt. Eine verminderte Fluoreszenz im Vergleich zu DMSO behandelten Zellen wurde als Hemmung der PR3-NB1 Interaktion gewertet. 13 von 20.000 Compounds inhibierten bei einer Konzentration von 50 μ M die Bindung von PR3 zu mehr als 70%. Bei sieben dieser Compounds wurde durch weitere Validierungsversuche die Hemmung bestätigt. Zwei Compounds mussten allerdings aufgrund von Zelltoxizität von weiteren Experimenten ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse bestätigten wir in einem nächsten Schritt in NB1-transfizierten HEK 293 Zellen mittels Durchflusszytometrie. Bei der nächsten Fragestellung ging es darum, ob exogen zugeführtes PR3 auf Neutrophilen zu einer nachweisbaren Bindung an NB1 führt und ob dieses durch die Compounds unterbunden werden kann. In der Tat wurde exogen zugeführtes PR3 an die NB1-positiven Neutrophilen gebunden, was mit einer in vivo Situation von sekretiertem PR3 vergleichbar wäre. Die

Vorbehandlung mit den Compounds führte zu einer fast kompletten Unterdrückung dieser Bindung.

Unsere weitere Fragestellung zum Wirkmechanismus der Compounds war, ob die Compounds die konstitutive PR3 Expression vermindern können, indem ein bereits bestehender Komplex dissoziiert wird, oder ob die Hochregulation von PR3 nach $\text{TNF}\alpha$ Behandlung beeinflusst werden kann. Auch nach längeren Inkubationszeiten sahen wir keine Änderung der konstitutiven PR3 Expression. Wir schlussfolgerten, dass die Compounds nicht in der Lage waren, einen bestehenden Komplex zur Dissoziation zu bringen. Dagegen zeigten wir in Anwesenheit der Compounds während der TNF-induzierten Translokation und während der nachfolgenden PR3-Färbung eine signifikante Hemmung der PR3-NB1 Komplexbildung. Dieses Phänomen lässt vermuten, dass Membran PR3 und NB1 einer raschen Internalisierung und Rezirkulation unterliegen. Beschrieben wurde dieses Phänomen in einer Untersuchung von Bauer und Kollegen ⁷⁷.

Die Stärke dieser Arbeit lag darin, dass wir einen zellbasierten Assay etablierten, bei dem NB1-transfizierte Zellen einem high-throughput Screen unterzogen werden konnten. Die Methode spiegelt sicherlich eher die in vivo Situation wieder als mit rekombinantem NB1 beschichtete Wells.

Zusammenfassend identifizierten wir kleinmolekulare Compounds, die die Bindung von exogenem PR3 an Membran-NB1 verhinderten. Die Compounds konnten PR3 nicht aus einem bestehenden Komplex verdrängen, aber sie reduzierten bei ständiger Anwesenheit die $\text{TNF}\alpha$ -vermittelte Hochregulation der PR3 Expression auf NB1-positiven Neutrophilen. Eine weitere Modifizierung der Compounds wäre notwendig, um mit nanomolaren Konzentrationen in vivo Experimente zuzulassen.

Desweiteren wäre es sehr hilfreich, die dreidimensionale Struktur von NB1 zu kennen, um Protein-Protein Interaktionen zu untersuchen oder Computer-Simulationsstudien zur Identifikation der NB1-PR3 Bindungsstelle durchzuführen. Im Gegensatz zu NB1 ist die PR3 Struktur bekannt. Ein weiterer Ansatz wäre, PR3 Regionen zu kartieren, die für die NB1 Bindung relevant wären und über „drug design“ die ermittelten Sites zu blockieren. Wichtige Informationen hierzu erhielten wir aus einer Arbeit von Hajjar et al., die einen hydrophoben Anteil der PR3 identifizierten, der wichtig ist für Membranbindung ¹⁵⁶. Untersuchungen von Korkmaz et al., die hybride PR3 vom Affen und vom Menschen herstellten, zeigten die zentrale Bedeutung einer hydrophoben PR3 Region für die Bindung an NB1 ¹⁵⁷. Darüber

hinaus gibt es Daten zum Alpha1-Proteaseinhibitor, der die Dissoziation von PR3 vom NB1 Rezeptor bewirkt, am ehesten durch Konformationsänderungen an der hydrophoben PR3 Region. Allerdings wäre dieser Proteaseinhibitor nicht für therapeutische Zwecke geeignet, da er kovalent an alle Serinproteasen bindet und somit nicht spezifisch genug wäre.

III. Diskussion

Die hier vorliegenden Arbeiten geben Aufschlüsse über Signalwege, die neutrophile Granulozyten während inflammatorischer Vorgänge regulieren, sowohl im Rahmen ANCA-induzierter Mechanismen als auch bei zytokin-induzierten Prozessen während allgemeiner Entzündungsreaktionen. Um ANCA-induzierte Folgeschäden zu minimieren, verfolgten wir mehrere experimentelle Ansätze, die neutrophile Granulozyten während ihrer Primingphase, während der Aktivierung oder während ihrer Regulation der Apoptose beeinflussen. Aktivierte neutrophile Granulozyten führen unter anderem zur Produktion von Sauerstoffradikalen und zur Bildung von Zytokinen, die wiederum zur Schädigung im Gewebe und am Gefäßendothel führen und weitere Zellen an den Entzündungsort rekrutieren. Bis dato werden die Wegenersche Granulomatose, die mikroskopische Polyangiitis und das Churg-Strauss Syndrom sehr uniform mit Glukokortikoiden und verschiedenen Immunsuppressiva behandelt, um die Patientenmortalität zu senken und weitere Organschäden zu verhindern. Glukokortikoide und Immunsuppressiva haben eine Reihe von Nebenwirkungen, inklusive septischer Komplikationen, Toxizität und maligner Transformationen. Statine sind für ihre pleiotropen Effekte bekannt, die unabhängig von der Senkung des LDL's vermittelt werden. Statine konnten z.B. Angiotensin-II-vermittelte Nierenschädigungen vermindern ¹⁰². Wir untersuchten deswegen den Einfluss zweier Statine auf die ANCA-induzierte Aktivierung. Für diese Untersuchungen wählten wir ein vorwiegend lipophiles und ein eher hydrophiles Statin aus. Wir konnten erstmalig zeigen, dass Statine die durch ANCA-Aktivierung hervorgerufene Sauerstoffradikalenproduktion deutlich vermindern ¹⁵⁸. Bei der weiteren Fragestellung, an welcher Stelle des Aktivierungsprozesses neutrophiler Granulozyten die Statine agieren, stellten wir heraus, dass im Wesentlichen die Zytokin-abhängige Primingphase beeinflusst wird. Der hierfür verantwortliche Signaltransduktionsweg ist die Phosphorylierung von ERK. Von Statinen ist auch aus anderen Arbeiten bekannt, dass sie die Signalwege von MAPkinasen beeinflussen und ihre Effekte darüber steuern ^{102,104}. Statine könnten von daher dazu beitragen, als supportive Therapie die Krankheitsaktivität bei ANCA-assoziierten Vaskulitiden zu beeinflussen, wobei in vitro Daten jedoch in vivo validiert

werden müssen. Insgesamt zeigt diese Studie dass ein besseres Verständnis der intrazellulären Mechanismen ANCA-induzierter entzündlicher Prozesse erforderlich ist, um neue Therapieansätze zu charakterisieren. Spezifischere Wirkungen solcher Medikamente könnten zu weniger unerwünschten toxischen Effekten führen.

Während wir mit Statinen das Priming beeinflussen konnten, untersuchten wir mit einem physiologischen Phänomen eine weitere Hemmung der ANCA-induzierten Sauerstoffradikalenproduktion, die auf eine Hemmung des Signalweges PI3K/Akt zurückzuführen war, der in der ANCA-induzierten Produktion reaktiver Sauerstoffradikale eine Rolle spielt. Hierbei ging es um das Phänomen des Fiebers. Während lokaler und systemischer Entzündungsprozesse werden neutrophile Granulozyten erhöhten Temperaturen ausgesetzt. Fieber wird in der Praxis reflexartig gesenkt. Es ist aber in den meisten Fällen nicht die Ursache der Krankheit, sondern vielmehr die Reaktion des Organismus auf inflammatorische Prozesse, die es zu behandeln gilt. Fieber zählt zu den häufigsten Gründen, eine allgemeinmedizinische oder pädiatrische Praxis aufzusuchen (nach W. Fink, G. Haidinger: Die Häufigkeit von Gesundheitsstörungen in 10 Jahren Allgemeinpraxis. Z. Allg. Med. 83 (200) 102–108. Zitiert nach Womit sich Hausärzte hauptsächlich beschäftigen. MMW-Fortschr. Med. Nr. 16 / 2007 (149. Jg.)). Es wurde in verschiedenen Untersuchungen vorgeschlagen, dass erhöhte Temperaturen anti-entzündlich wirken können. Darüber hinaus gibt es experimentelle und klinische Arbeiten, die positive Effekte von Hyperthermie bei der Tumorthherapie nachwiesen¹⁵⁹⁻¹⁶⁶. Der generelle – und eventuell vorschnelle – Einsatz fiebersenkender Therapien kann somit durchaus in Frage gestellt werden^{123,124}. Fieber stellt wahrscheinlich eine physiologische Reaktion dar und könnte durchaus eine entzündungsbegrenzende Rolle spielen. Fieber unkritisch zu senken entspricht nicht dem Forschungsstand der Fieberphysiologie (s. auch¹⁶⁷).

Da bei der ANCA-assoziierten Vaskulitis Fieber häufig vorkommt, untersuchten wir, ob kurzzeitige Hitzeexposition die Signaltransduktion hemmen kann, die für Sauerstoffradikalenproduktion in Zytokin-getriggerten und ANCA-aktivierten Neutrophilen verantwortlich ist. Die mit ansteigenden Temperaturen beobachtete zunehmende Hemmung der Sauerstoffradikalenproduktion in TNF α - oder GM-CSF-geprimten und mit ANCA stimulierten neutrophilen Granulozyten bestätigte den antiinflammatorischen Effekt der kurzzeitigen Hitzeexposition¹⁶⁸. Der in dieser Studie im Wesentlichen verantwortliche Signalweg PI3K/Akt geht konform mit

vorangegangen (auch eigenen) Arbeiten, die die prominente Rolle von PI3K/Akt für die ANCA-Aktivierung auswiesen^{85,86}. Die Rolle von Fieber in neutrophilen Granulozyten hatten wir bereits in eigenen Arbeiten untersucht. Hier hemmten kurzzeitige Temperaturerhöhungen die Aktivierung von NF- κ B und daraus resultierend anti-apoptotische Signale^{125,126}. Die Hemmung des Neutrophilensignaling konnten wir nachfolgend auch in Mäusen demonstrieren, die kurzzeitigen Temperaturerhöhungen von 40,5°C ausgesetzt wurden und deren aus dem Knochenmark isolierte Neutrophile eine abgeschwächte oder fehlende NF- κ B Aktivierung aufwiesen. Mit diesen Ergebnissen zeigten wir, dass kurzzeitige Temperaturanstiege auch für die in vivo Situation eine funktionelle Relevanz besitzen.

Diese Hypothese stützten wir in einer Nachfolgearbeit anhand eines inflammatorischen, neutrophilenspezifischen Hautmodells für komplexe in vivo Situationen. Die chemotaktische Wirkung von GM-CSF und IL-8 führte nach subkutaner Applikation in der Maus zu einem raschen Neutrophileninflux und zur Anschaltung von NF- κ B in den lokal infiltrierten Zellen. Durch die Interaktion mit intrazellulären Matrixbestandteilen während der Migration an den Ort der Zytokinexposition kommt es zur Aktivierung von NF- κ B bei Zytokinen, die in Suspensionsbedingungen keine Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors auslösen können¹³⁹. Moderate Hitzeexposition in vivo zeigte eine deutliche Verminderung der neutrophilenspezifischen Hautentzündung, eine in vitro Hemmung der Neutrophilenmigration durch Hemmung des PI3K/Akt-Pathways und in vivo und in vitro auch eine Hemmung von NF- κ B und NF- κ B-abhängiger Genexpression¹²⁷. Wir zeigen, dass Fieber inflammatorische Antworten limitiert, können jedoch nicht ausschließen, dass dabei auch wichtige Signale unterdrückt werden, die zur Resolution von Infektion wichtig sind.

Nachdem wir demonstriert hatten, dass Statine Neutrophilenpriming reduzieren und Fieber ANCA-induzierte Sauerstoffradikalenproduktion und Neutrophilenmigration über Akt und Gewebeinflammation über NF- κ B hemmt, beschäftigten wir uns mit einem weiteren Aspekt der Neutrophilenbiologie, nämlich mit der Terminierung entzündlicher Prozesse durch die Apoptose. Da eine verzögerte Apoptose zur Zunahme von Entzündung und zur gesteigerten oder prolongierten Gewebsverletzung führt, untersuchten wir den Effekt einer Hemmung des

apoptoseverzögernden Transkriptionsfaktors NF- κ B in neutrophilen Granulozyten. Da synthetische Peptide mehr oder weniger unspezifisch agieren, war die Zielsetzung des Projekts, gezielt und spezifisch NF- κ B in den Neutrophilen auszuschalten. Hierfür mussten wir einen Weg finden, um diese Zellen effizient zu transduzieren. Mit einem Peptid (NBD-TAT), welches zur Gruppe der „trojanischen Pferde“ gehört, die in der Lage sind, Zellen zu transfizieren, gelang es uns, auch bei den schwer zu transduzierenden neutrophilen Granulozyten das Protein schnell und wirksam in die Zelle zu bringen ¹⁶⁹. Die Vorbehandlung der neutrophilen Granulozyten mit dem NBD-TAT Peptid führte dazu, dass die Zytokin-induzierte NF- κ B Aktivierung gehemmt wurde. Die Zugabe des Peptids während der LPS-verzögerten Apoptose führte zu einer kompletten Hemmung des LPS Effekts und zu einer Apoptose, die mit der konstitutiven Apoptose vergleichbar war. Wir konnten damit zeigen, dass die LPS-vermittelte Apoptose NF- κ B vermittelt ist. Mit dem NF- κ B inhibitorischen Peptid konnten wir auch bei der konstitutiven Apoptose einen Anstieg der Apoptoserate zeigen, was darauf hindeutet, dass auch in nicht-stimulierten PMN eine basale NF- κ B Rate vorliegt.

Unsere Arbeit unterstützt die Möglichkeit, unter Verwendung einer Transduktionsdomäne biologisch aktive Peptide einzusetzen, die dazu verwendet werden könnten, intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden besser zu untersuchen und zu verstehen. In letzter Konsequenz könnte das auch therapeutische Konsequenzen haben.

Um nach weiteren therapeutischen Optionen zu suchen, die die ANCA-Aktivierung unterbinden, machten wir uns eine neuere Technologie zu Nutze, das „high-throughput“ Screening, bei dem eine Bibliothek von 20.000 kleinmolekularen Substanzen in einem zellbasierten Ansatz getestet wurde ¹⁷⁰. Die Hemmung der Assoziation von PR3 mit NB1 oder die Auflösung eines vorhandenen Komplexes mit einem inhibitorischen Peptid sollte hierbei zielführend sein. Dies hätte therapeutische Auswirkungen in Bezug auf die PR3-ANCA induzierte Neutrophilenaktivierung.

Anhand des Compound Screens identifizierten wir kleinmolekulare Compounds, die die Bindung von exogenem PR3 an Membran-NB1 verhinderten. Die Compounds konnten PR3 dabei nicht aus einem bestehenden Komplex verdrängen, reduzierten aber bei ständiger Anwesenheit die TNF α -vermittelte Hochregulation der PR3 Expression auf NB1-positiven Neutrophilen. Eine weitere Modifizierung der

Compounds wäre notwendig, um mit nanomolaren Konzentrationen in vivo Experimente zuzulassen.

Wir diskutierten bereits im oberen Abschnitt, dass es hilfreich wäre, die dreidimensionale Struktur von NB1 zu kennen, um Protein-Protein Interaktionen zu untersuchen oder Computer-Simulationsstudien zur Identifikation der NB1-PR3 Bindungsstelle zuzulassen. Weiterführende Untersuchungen hierzu lieferten Hajjar und Korkmaz et al., die einen hydrophoben Anteil am PR3 identifizierten, der für die Bindung an den NB1-Rezeptor verantwortlich ist^{156,157}.

IV. Zusammenfassung

Die hier dargestellten Arbeiten beschäftigen sich mit Mechanismen der Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch Zytokine und ANCA. Dabei sollten Signalwege identifiziert werden, die als neue anti-inflammatorische Therapieziele dienen können.

Im ersten Teil der Habilitationsschrift wurden Untersuchungen zum Einfluss von Statinen auf die ANCA-induzierte Aktivierung humaner neutrophiler Granulozyten dargestellt. Aufgrund der pleiotropen Effekte der Statine untersuchten wir die Hypothese, dass Statine die ANCA-induzierte Sauerstoffradikalenproduktion über die Inhibition intrazellulärer Signalwege vermindern können. Durch Vorbehandlung der PMN mit Statinen wurde eine konzentrationsabhängige Hemmung der durch ERK vermittelten Sauerstoffradikalenproduktion beobachtet. Statine könnten somit zu einer Verminderung der inflammatorischen Prozesse bei ANCA-assoziierten Vaskulitiden beitragen.

Nachfolgend untersuchten wir die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der die Expression zahlreicher Gene während entzündlicher Vorgänge, bei der Zellproliferation, bei Stressantworten und während der Apoptose kontrolliert¹⁰⁷⁻¹¹⁰. Wir benutzten eine HIV-TAT Sequenz mit einem daran gekoppelten Peptid zur Hemmung des IKK Komplexes, um eine spezifische Hemmung von NF- κ B zu erzielen,¹¹⁸⁻¹²¹. Diese Vorgehensweise stellt eine neue Methode zur effektiven Transduktion in PMN dar. Die Zugabe des Konstrukts während der LPS-verzögerten Apoptose führte zu einer kompletten Hemmung der LPS-induzierten NF- κ B Aktivierung und des anti-apoptotischen LPS Effektes. TAT Transduktionsdomänen stellen somit ein effizientes Tool dar, um spezifische intrazelluläre Ziele in PMN zu manipulieren.

In einem weiteren Teil der Arbeiten beschäftigten wir uns mit der Rolle von Fieber im Rahmen lokaler und systemischer Entzündungsprozesse. Wir testeten die Auswirkung kurzzeitiger Hitzeexposition auf Signaltransduktionswege, die für Sauerstoffradikalenproduktion in Zytokin-getriggerten und ANCA-aktivierten

Neutrophilen verantwortlich sind. In geprimten und ANCA-stimulierten PMN konnten wir zeigen, dass kurzzeitige Hitze die Sauerstoffradikalenproduktion durch eine verminderte Phosphorylierung von PI3K/Akt herabsetzen konnte. Darüber hinaus konnten wir erstmals demonstrieren, dass Hitzeexposition auch einen inhibitorischen Effekt auf die ANCA-induzierte Neutrophilenaktivierung hat. Dieser Effekt war „dosisabhängig“ in einem pathophysiologisch bedeutsamen Bereich zwischen 37 und 42°C.

Um den Einfluss fieberähnlicher Temperaturen in komplexen in vivo Situationen zu prüfen, etablierten wir in einer nachfolgenden Arbeit ein neutrophilenspezifisches entzündliches Hautmodell. Bei den normothermen Tieren war in der GM-CSF- und IL-8-behandelten Haut eine starke Neutrophileninfiltration sowie eine NF- κ B Aktivierung zu sehen, die in den hyperthermiebehandelten Tieren deutlich vermindert war. In vitro beobachteten wir eine signifikante Hemmung der Neutrophilenmigration nach Hitzeexposition durch Inhibierung des PI3K/Akt Pathways. Mit verschiedenen NF- κ B Assays (Western Blot, EMSA, Taqman) zeigten wir auch ex vivo eine Inhibition von NF- κ B durch Hitze. Wir zeigten mit diesen Experimenten, dass Fieber inflammatorische Antworten limitiert. Unsere Ergebnisse stellen den unkritischen Gebrauch fiebersenkender Mittel bei Entzündungen in Frage.

Im abschließenden Teil der Schrift ging es uns um die Assoziation von PR3 mit NB1. Diese Interaktion ist für die PR3-ANCA-induzierte Neutrophilenaktivierung von Bedeutung. Eine Hemmung der PR3 NB1 Interaktion wäre als therapeutischer Ansatz denkbar. In einem „high-throughput“ Screening mit einer Bibliothek von 20.000 kleinmolekularen Substanzen identifizierten wir Compounds, die eine mehr als 70%ige Inhibition der PR3 Bindung an NB1 bewirkten. Die konstitutive PR3 Expression war in Anwesenheit der Compounds nicht zu beeinflussen, während bei der TNF α -induzierten Translokation eine signifikante Hemmung auftrat. Eine weitere Modifizierung der Substanzen wäre notwendig, um mit nanomolaren Konzentrationen deren in vivo Nutzen zu etablieren.

V. Ausblick und Darstellung weiterer Vorhaben

In weiteren Vorhaben werden wir uns insbesondere mit weiteren Signalwegen oder Vermittlern der ANCA-induzierten Glomerulonephritis beschäftigen, um zum einen das Wissen um die Mechanismen der Erkrankung zu erweitern und zum anderen nach weiteren therapeutischen Optionen zur Behandlung der Erkrankung zu suchen. Wir haben bereits den Transkriptionsfaktor NF- κ B als maßgeblich beteiligt bei der Neutrophilenaktivierung untersucht¹⁶⁹, konnten in Vorarbeiten jedoch keine ANCA-induzierte NF- κ B Aktivierung in Neutrophilen herausarbeiten. Die Rolle von NF- κ B bei der ANCA-Aktivierung wurde bisher auch von anderen Arbeitsgruppen nicht weiter untersucht. Bontscho et al. aus unserer Arbeitsgruppe untersuchten den Proteasominhibitor Bortezomib im Tiermodell, der in vivo zur Plasmazelldepletion führte und die Tiere vor der ANCA-induzierten Erkrankung schützte¹⁷¹. Von Bortezomib ist bekannt, dass es in der Lage ist, die nukleäre Lokalisation von NF- κ B durch die Hemmung des Proteasoms, welches normalerweise die Degradation von ubiquitinierten I κ B bewirkt, zu vermindern.

Um eine Involvierung von NF- κ B zu untersuchen, haben wir in einem Vorversuch retrospektiv Nierengewebe von erkrankten Mäusen des in unserem Labor etablierten MPO-ANCA-Mausmodells auf ihre NF- κ B Bindungsaktivität getestet. Die Tiere wurden in vorhergehenden Arbeiten bereits unterschiedlichen Therapienansätzen (Bortezomib, Cyclophosphamid) unterzogen, sodass graduelle Krankheitsschweregrade mit variierendem Ausmaß von Halbmondbildungen in den Glomeruli vorlagen. Aus dem Nierengewebe präparierten wir nukleäre Extrakte und sahen mittels Gelshiftassay graduelle Unterschiede in der NF- κ B Bindungsaktivität, die mit dem prozentuellen Ausmaß der Halbmondbildungen in der Niere signifikant korrelierten. Im Supershiftassay stellten wir fest, dass sich der NF- κ B Komplex aus den Untereinheiten p50 und p65 zusammensetzt. Mit immunhistochemischen Färbungen bzw. mittels in situ Hybridisierungen für I κ B α mRNA werden wir im Folgenden die Lokalisation bzw. die beteiligten Strukturen in der Niere analysieren.

Bei der ANCA-assoziierten Vaskulitis ist die Interaktion zwischen ANCA, den neutrophilen Granulozyten und dem Endothel zentraler Bestandteil der Krankheitsentstehung. Aus diesem Grund werden wir neben der Stimulation isolierter Neutrophiler auch Kokulturen mit Endothelzellen bzw. auch monozytäre Zellen auf ihre NF- κ B Aktivierung in Anwesenheit von Priming und ANCA untersuchen. Primäre Monozyten produzieren nach ANCA Stimulation IL-1 β (Ergebnisse unseres Labors). Von IL-1 β wiederum ist bekannt, dass es ein Stimulator von NF- κ B in Endothelzellen ist, so dass die Hypothese, dass auch Monozyten Endothelzellkokulturen in Anwesenheit von ANCA zur NF- κ B Aktivierung führen können, nahe liegt.

In einem zweiten Teil geht es um die in vivo Relevanz einer NF- κ B Hemmung im ANCA-Mausmodell. Zum einen bestünde die Option eines therapeutischen Ansatzes mit Gabe eines NF- κ B Inhibitors. Hierfür käme z.B. die Substanz Andrographolide in Frage. Andrographolide ist eine pflanzliche Substanz, die die p50 Untereinheit von NF- κ B konjugiert und damit die NF- κ B DNA Bindung blockiert^{172,173}. In Tiermodellen wurde die Substanz hinreichend getestet, z.B. bei Asthamamodellen, zur Reduktion arterieller Stenosen oder in einem Tiermodell mit Lupus erythematodes. Sie erwies sich in wirksamen Dosierungen als nicht toxisch¹⁷⁴⁻¹⁷⁷.

Als weitere Option können wir NF- κ B-knockout Mausmodelle in Kooperation mit der AG Scheiderei am Max Delbrück Centrum verwenden. Ein verfügbarer Mausstamm ist ein knock-in Modell mit einem I κ B Δ N Superrepressor, der ubiquitär exprimiert wird und die Degradation des NF- κ B-inhibitorischen Peptides I κ B verhindert¹⁷⁸. Die Tiere müssen mit einer Cre-Maus gekreuzt werden, um das Vollbild der Erkrankung zu erreichen. Sollte sich in den Versuchen zeigen, dass vorrangig Endothelzellen involviert sind, wäre es sinnvoll, das zweite Mausmodell, eine Tie-1- Δ N-Cre-knock-in Maus, zu verwenden, die ein endothelspezifisches NF- κ B knock-out aufweist¹⁷⁹. Durch passiven MPO-AK Transfer werden die Tiere dann auf Ausbildung der ANCA-induzierten Glomerulonephritis untersucht (Histologie, Proteinurie, Hämaturie, Allgemeinzustand der Tiere).

Ziel der Untersuchungen ist es, die Vielfältigkeit der ANCA Regulation näher zu verstehen und wirksame Therapieansätze zu finden, die auch Ansätze für eine Therapie im klinischen Alltag der ANCA Erkrankung bieten könnte.

Literaturverzeichnis

- 1 Zhang J, Alcaide P, Liu L, et al. Regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by mast cells, macrophages, and neutrophils. *PLoS One*; 6:e14525
- 2 Kilpatrick LE, Sun S, Li H, et al. Regulation of TNF-induced oxygen radical production in human neutrophils: role of delta-PKC. *J Leukoc Biol*; 87:153-164
- 3 Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:173-182
- 4 Ren Y, Stuart L, Lindberg FP, et al. Nonphlogistic clearance of late apoptotic neutrophils by macrophages: efficient phagocytosis independent of beta 2 integrins. *J Immunol* 2001; 166:4743-4750
- 5 Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; 303:1532-1535
- 6 Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, et al. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol* 2006; 8:668-676
- 7 Dransfield I, Stocks SC, Haslett C. Regulation of cell adhesion molecule expression and function associated with neutrophil apoptosis. *Blood* 1995; 85:3264-3273
- 8 Hart SP, Ross JA, Ross K, et al. Molecular characterization of the surface of apoptotic neutrophils: implications for functional downregulation and recognition by phagocytes. *Cell Death Differ* 2000; 7:493-503
- 9 Kettritz R, Scheumann J, Xu Y, et al. TNF-alpha--accelerated apoptosis abrogates ANCA-mediated neutrophil respiratory burst by a caspase-dependent mechanism. *Kidney Int* 2002; 61:502-515
- 10 Cox G. IL-10 enhances resolution of pulmonary inflammation in vivo by promoting apoptosis of neutrophils. *Am J Physiol* 1996; 271:L566-571
- 11 Murray J, Barbara JA, Dunkley SA, et al. Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha: requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro. *Blood* 1997; 90:2772-2783
- 12 Wei S, Liu JH, Epling-Burnette PK, et al. Critical role of Lyn kinase in inhibition of neutrophil apoptosis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* 1996; 157:5155-5162
- 13 Hebert MJ, Takano T, Holthofer H, et al. Sequential morphologic events during apoptosis of human neutrophils. Modulation by lipoxygenase-derived eicosanoids. *J Immunol* 1996; 157:3105-3115
- 14 Kettritz R, Gaido ML, Haller H, et al. Interleukin-8 delays spontaneous and tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis of human neutrophils. *Kidney Int* 1998; 53:84-91
- 15 Matute-Bello G, Liles WC, Radella F, 2nd, et al. Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:1969-1977
- 16 Keel M, Ungethum U, Steckholzer U, et al. Interleukin-10 counterregulates proinflammatory cytokine-induced inhibition of neutrophil apoptosis during severe sepsis. *Blood* 1997; 90:3356-3363
- 17 Garlachs CD, Eskafi S, Cicha I, et al. Delay of neutrophil apoptosis in acute coronary syndromes. *J Leukoc Biol* 2004; 75:828-835
- 18 Alvarado-Kristensson M, Melander F, Leandersson K, et al. p38-MAPK signals survival by phosphorylation of caspase-8 and caspase-3 in human neutrophils. *J Exp Med* 2004; 199:449-458

- 19 Klein JB, Buridi A, Coxon PY, et al. Role of extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol-3 kinase in chemoattractant and LPS delay of constitutive neutrophil apoptosis. *Cell Signal* 2001; 13:335-343
- 20 Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, et al. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 1995; 270:1326-1331
- 21 Widmann C, Gibson S, Johnson GL. Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. *J Biol Chem* 1998; 273:7141-7147
- 22 Jarpe MB, Widmann C, Knall C, et al. Anti-apoptotic versus pro-apoptotic signal transduction: checkpoints and stop signs along the road to death. *Oncogene* 1998; 17:1475-1482
- 23 Frasch SC, Nick JA, Fadok VA, et al. p38 mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent intracellular signal transduction pathways leading to apoptosis in human neutrophils. *J Biol Chem* 1998; 273:8389-8397
- 24 Luo HR, Loison F. Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation. *Am J Hematol* 2008; 83:288-295
- 25 Klein JB, Rane MJ, Scherzer JA, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor delays neutrophil constitutive apoptosis through phosphoinositide 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. *J Immunol* 2000; 164:4286-4291
- 26 McDonald PP, Bald A, Cassatella MA. Activation of the NF-kappaB pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils. *Blood* 1997; 89:3421-3433
- 27 McDonald PP, Bovolenta C, Cassatella MA. Activation of distinct transcription factors in neutrophils by bacterial LPS, interferon-gamma, and GM-CSF and the necessity to overcome the action of endogenous proteases. *Biochemistry* 1998; 37:13165-13173
- 28 Hallett JM, Leitch AE, Riley NA, et al. Novel pharmacological strategies for driving inflammatory cell apoptosis and enhancing the resolution of inflammation. *Trends Pharmacol Sci* 2008; 29:250-257
- 29 Niwa M, Hara A, Kanamori Y, et al. Nuclear factor-kappaB activates dual inhibition sites in the regulation of tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil apoptosis. *Eur J Pharmacol* 2000; 407:211-219
- 30 Ward C, Chilvers ER, Lawson MF, et al. NF-kappaB activation is a critical regulator of human granulocyte apoptosis in vitro. *J Biol Chem* 1999; 274:4309-4318
- 31 Castro-Alcaraz S, Miskolci V, Kalasapudi B, et al. NF-kappa B regulation in human neutrophils by nuclear I kappa B alpha: correlation to apoptosis. *J Immunol* 2002; 169:3947-3953
- 32 Ravichandran KS. Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *J Exp Med*; 207:1807-1817
- 33 Friggeri A, Banerjee S, Biswas S, et al. Participation of the Receptor for Advanced Glycation End Products in Efferocytosis. *J Immunol*
- 34 He M, Kubo H, Morimoto K, et al. Receptor for advanced glycation end products binds to phosphatidylserine and assists in the clearance of apoptotic cells. *EMBO Rep*; 12:358-364
- 35 Savill J, Dransfield I, Gregory C, et al. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:965-975
- 36 Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, et al. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 1998; 101:890-898
- 37 Huynh ML, Fadok VA, Henson PM. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest* 2002; 109:41-50

- 38 Liu CY, Liu YH, Lin SM, et al. Apoptotic neutrophils undergoing secondary necrosis induce human lung epithelial cell detachment. *J Biomed Sci* 2003; 10:746-756
- 39 Charles LA, Caldas ML, Falk RJ, et al. Antibodies against granule proteins activate neutrophils in vitro. *J Leukoc Biol* 1991; 50:539-546
- 40 Jennette JC, Falk RJ. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies and associated diseases: a review. *Am J Kidney Dis* 1990; 15:517-529
- 41 Kettritz R, Schreiber A, Luft FC, et al. Role of mitogen-activated protein kinases in activation of human neutrophils by antineutrophil cytoplasmic antibodies. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:37-46
- 42 Kettritz R, Jennette JC, Falk RJ. Crosslinking of ANCA-antigens stimulates superoxide release by human neutrophils. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8:386-394
- 43 Porges AJ, Redecha PB, Kimberly WT, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies engage and activate human neutrophils via Fc gamma RIIa. *J Immunol* 1994; 153:1271-1280
- 44 Charles LA, Falk RJ, Jennette JC. Reactivity of antineutrophil cytoplasmic autoantibodies with mononuclear phagocytes. *J Leukoc Biol* 1992; 51:65-68
- 45 Reumaux D, Vosseveld PJ, Roos D, et al. Effect of tumor necrosis factor-induced integrin activation on Fc gamma receptor II-mediated signal transduction: relevance for activation of neutrophils by anti-proteinase 3 or anti-myeloperoxidase antibodies. *Blood* 1995; 86:3189-3195
- 46 Kocher M, Edberg JC, Fleit HB, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies preferentially engage Fc gammaRIIIb on human neutrophils. *J Immunol* 1998; 161:6909-6914
- 47 Kallenberg CG, Brouwer E, Weening JJ, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: current diagnostic and pathophysiological potential. *Kidney Int* 1994; 46:1-15
- 48 Niles JL MR, Ahmad MF, Arnaut MA. Wegener's granulomatosis autoantigen is a novel neutrophil serine proteinase. *Blood* 1989; 74:1888-1893
- 49 Csernok E, Ludemann J, Gross WL, et al. Ultrastructural localization of proteinase 3, the target antigen of anti-cytoplasmic antibodies circulating in Wegener's granulomatosis. *Am J Pathol* 1990; 137:1113-1120
- 50 Falk RJ, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988; 318:1651-1657
- 51 Ludemann J, Csernok E, Ulmer M, et al. Anti-neutrophil cytoplasm antibodies in Wegener's granulomatosis: immunodiagnostic value, monoclonal antibodies and characterization of the target antigen. *Neth J Med* 1990; 36:157-162
- 52 Goldschmeding R, van der Schoot CE, ten Bokkel Huinink D, et al. Wegener's granulomatosis autoantibodies identify a novel diisopropylfluorophosphate-binding protein in the lysosomes of normal human neutrophils. *J Clin Invest* 1989; 84:1577-1587
- 53 Finkielman JD, Lee AS, Hummel AM, et al. ANCA are detectable in nearly all patients with active severe Wegener's granulomatosis. *Am J Med* 2007; 120:643 e649-614
- 54 Tervaert JW, van der Woude FJ, Fauci AS, et al. Association between active Wegener's granulomatosis and anticytoplasmic antibodies. *Arch Intern Med* 1989; 149:2461-2465
- 55 Boomsma MM, Stegeman CA, van der Leij MJ, et al. Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of antineutrophil cytoplasmic antibody levels: a prospective study. *Arthritis Rheum* 2000; 43:2025-2033
- 56 Han WK, Choi HK, Roth RM, et al. Serial ANCA titers: useful tool for prevention of relapses in ANCA-associated vasculitis. *Kidney Int* 2003; 63:1079-1085

- 57 Finkielman JD, Merkel PA, Schroeder D, et al. Antiproteinase 3 antineutrophil cytoplasmic antibodies and disease activity in Wegener granulomatosis. *Ann Intern Med* 2007; 147:611-619
- 58 Csernok E, Ernst M, Schmitt W, et al. Activated neutrophils express proteinase 3 on their plasma membrane in vitro and in vivo. *Clin Exp Immunol* 1994; 95:244-250
- 59 Falk RJ, Terrell RS, Charles LA, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:4115-4119
- 60 Keogan MT, Rifkin I, Ronda N, et al. Anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA) increase neutrophil adhesion to cultured human endothelium. *Adv Exp Med Biol* 1993; 336:115-119
- 61 Vargunam M, Adu D, Taylor CM, et al. Endothelium myeloperoxidase-antimyeloperoxidase interaction in vasculitis. *Nephrol Dial Transplant* 1992; 7:1077-1081
- 62 Ewert BH, Jennette JC, Falk RJ. Anti-myeloperoxidase antibodies stimulate neutrophils to damage human endothelial cells. *Kidney Int* 1992; 41:375-383
- 63 Savage CO, Pottinger BE, Gaskin G, et al. Autoantibodies developing to myeloperoxidase and proteinase 3 in systemic vasculitis stimulate neutrophil cytotoxicity toward cultured endothelial cells. *Am J Pathol* 1992; 141:335-342
- 64 Mayet WJ, Schwarting A, Meyer zum Buschenfelde KH. Cytotoxic effects of antibodies to proteinase 3 (C-ANCA) on human endothelial cells. *Clin Exp Immunol* 1994; 97:458-465
- 65 Xiao H, Heeringa P, Hu P, et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *J Clin Invest* 2002; 110:955-963
- 66 Schreiber A, Xiao H, Falk RJ, et al. Bone marrow-derived cells are sufficient and necessary targets to mediate glomerulonephritis and vasculitis induced by anti-myeloperoxidase antibodies. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17:3355-3364
- 67 Xiao H, Heeringa P, Liu Z, et al. The role of neutrophils in the induction of glomerulonephritis by anti-myeloperoxidase antibodies. *Am J Pathol* 2005; 167:39-45
- 68 Huugen D, Xiao H, van Esch A, et al. Aggravation of anti-myeloperoxidase antibody-induced glomerulonephritis by bacterial lipopolysaccharide: role of tumor necrosis factor-alpha. *Am J Pathol* 2005; 167:47-58
- 69 Schlieben DJ, Korbet SM, Kimura RE, et al. Pulmonary-renal syndrome in a newborn with placental transmission of ANCA. *Am J Kidney Dis* 2005; 45:758-761
- 70 Pfister H, Ollert M, Frohlich LF, et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies against the murine homolog of proteinase 3 (Wegener autoantigen) are pathogenic in vivo. *Blood* 2004; 104:1411-1418
- 71 Witko-Sarsat V, Lesavre P, Lopez S, et al. A large subset of neutrophils expressing membrane proteinase 3 is a risk factor for vasculitis and rheumatoid arthritis. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:1224-1233
- 72 Rarok AA, Stegeman CA, Limburg PC, et al. Neutrophil membrane expression of proteinase 3 (PR3) is related to relapse in PR3-ANCA-associated vasculitis. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:2232-2238
- 73 Schreiber A, Busjahn A, Luft FC, et al. Membrane expression of proteinase 3 is genetically determined. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:68-75
- 74 Halbwachs-Mecarelli L, Bessou G, Lesavre P, et al. Bimodal distribution of proteinase 3 (PR3) surface expression reflects a constitutive heterogeneity in the polymorphonuclear neutrophil pool. *FEBS Lett* 1995; 374:29-33
- 75 Matsumoto T, Kaneko T, Wada H, et al. Proteinase 3 expression on neutrophil membranes from patients with infectious disease. *Shock* 2006; 26:128-133

- 76 von Vietinghoff S, Tunnemann G, Eulenberg C, et al. NB1 mediates surface expression of the ANCA antigen proteinase 3 on human neutrophils. *Blood* 2007; 109:4487-4493
- 77 Bauer S, Abdgawad M, Gunnarsson L, et al. Proteinase 3 and CD177 are expressed on the plasma membrane of the same subset of neutrophils. *J Leukoc Biol* 2007; 81:458-464
- 78 Schreiber A, Luft FC, Kettritz R. Membrane proteinase 3 expression and ANCA-induced neutrophil activation. *Kidney Int* 2004; 65:2172-2183
- 79 Hu N, Westra J, Huitema MG, et al. 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 Rheum* 2009; 60:1548-1557
- 80 David A, Fridlich R, Aviram I. The presence of membrane Proteinase 3 in neutrophil lipid rafts and its colocalization with FcγRIIIb and cytochrome b558. *Exp Cell Res* 2005; 308:156-165
- 81 Fridlich R, David A, Aviram I. Membrane proteinase 3 and its interactions within microdomains of neutrophil membranes. *J Cell Biochem* 2006; 99:117-125
- 82 Kantari C, Pederzoli-Ribeil M, Amir-Moazami O, et al. Proteinase 3, the Wegener autoantigen, is externalized during neutrophil apoptosis: evidence for a functional association with phospholipid scramblase 1 and interference with macrophage phagocytosis. *Blood* 2007; 110:4086-4095
- 83 David A, Kacher Y, Specks U, et al. Interaction of proteinase 3 with CD11b/CD18 (β2 integrin) on the cell membrane of human neutrophils. *J Leukoc Biol* 2003; 74:551-557
- 84 Jerke U, Rolle S, Dittmar G, et al. Complement receptor Mac-1 is an adaptor for NB1 (CD177)-mediated PR3-ANCA neutrophil activation. *J Biol Chem*; 286:7070-7081
- 85 Kettritz R, Choi M, Butt W, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase controls antineutrophil cytoplasmic antibodies-induced respiratory burst in human neutrophils. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:1740-1749
- 86 Ben-Smith A, Dove SK, Martin A, et al. Antineutrophil cytoplasm autoantibodies from patients with systemic vasculitis activate neutrophils through distinct signaling cascades: comparison with conventional Fcγ receptor ligation. *Blood* 2001; 98:1448-1455
- 87 Hewins P, Williams JM, Wakelam MJ, et al. Activation of Syk in neutrophils by antineutrophil cytoplasm antibodies occurs via Fcγ receptors and CD18. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:796-808
- 88 Williams J, Hewins P, Savage C. The influence of autoantibodies to myeloperoxidase on neutrophil function and intracellular signaling. *Jpn J Infect Dis* 2004; 57:S5-6
- 89 Williams JM, Savage CO. Characterization of the regulation and functional consequences of p21ras activation in neutrophils by antineutrophil cytoplasm antibodies. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:90-96
- 90 Schreiber A, Rolle S, Peripelittchenko L, et al. Phosphoinositol 3-kinase-γ mediates antineutrophil cytoplasmic autoantibody-induced glomerulonephritis. *Kidney Int*; 77:118-128
- 91 Xiao H, Schreiber A, Heeringa P, et al. Alternative complement pathway in the pathogenesis of disease mediated by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Am J Pathol* 2007; 170:52-64
- 92 Schreiber A, Xiao H, Jennette JC, et al. C5a receptor mediates neutrophil activation and ANCA-induced glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20:289-298

- 93 Xing GQ, Chen M, Liu G, et al. Differential deposition of C4d and MBL in glomeruli of patients with ANCA-negative pauci-immune crescentic glomerulonephritis. *J Clin Immunol*; 30:144-156
- 94 Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994; 344:1383-1389
- 95 Effect of simvastatin on coronary atheroma: the Multicentre Anti-Atheroma Study (MAAS). *Lancet* 1994; 344:633-638
- 96 Influence of pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS). *Circulation* 1998; 97:1440-1445
- 97 Downs JR, Clearfield M, Weis S, et al. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA* 1998; 279:1615-1622
- 98 Tonkin AM, Chen L. Effects of combination lipid therapy in the management of patients with type 2 diabetes mellitus in the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD) trial. *Circulation*; 122:850-852
- 99 Horne BD, Muhlestein JB, Carlquist JF, et al. Statin therapy, lipid levels, C-reactive protein and the survival of patients with angiographically severe coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36:1774-1780
- 100 Ikeda U, Ito T, Shimada K. Statins and C-reactive protein. *Lancet* 1999; 353:1274-1275
- 101 Strandberg TE, Vanhanen H, Tikkanen MJ. Associations between change in C-reactive protein and serum lipids during statin treatment. *Ann Med* 2000; 32:579-583
- 102 Park JK, Muller DN, Mervaala EM, et al. Cerivastatin prevents angiotensin II-induced renal injury independent of blood pressure- and cholesterol-lowering effects. *Kidney Int* 2000; 58:1420-1430
- 103 Dunzendorfer S, Rothbacher D, Schratzberger P, et al. Mevalonate-dependent inhibition of transendothelial migration and chemotaxis of human peripheral blood neutrophils by pravastatin. *Circ Res* 1997; 81:963-969
- 104 Kanno T, Abe K, Yabuki M, et al. Selective inhibition of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLF)-dependent superoxide generation in neutrophils by pravastatin, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase. *Biochem Pharmacol* 1999; 58:1975-1980
- 105 Mehta JL, Li DY, Chen HJ, et al. Inhibition of LOX-1 by statins may relate to upregulation of eNOS. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289:857-861
- 106 Savill JS, Henson PM, Haslett C. Phagocytosis of aged human neutrophils by macrophages is mediated by a novel "charge-sensitive" recognition mechanism. *J Clin Invest* 1989; 84:1518-1527
- 107 Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 2002; 109 Suppl:S81-96.
- 108 Karin M. The NF-kappa B activation pathway: its regulation and role in inflammation and cell survival. *Cancer J Sci Am* 1998; 4 Suppl 1:S92-99.
- 109 Wulczyn FG, Krappmann D, Scheidereit C. The NF-kappa B/Rel and I kappa B gene families: mediators of immune response and inflammation. *J Mol Med* 1996; 74:749-769.
- 110 Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:141-179
- 111 Ward C, Walker A, Dransfield I, et al. Regulation of granulocyte apoptosis by NF-kappaB. *Biochem Soc Trans* 2004; 32:465-467
- 112 Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, et al. Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* 1995; 9:2723-2735.

- 113 Karin M. How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene* 1999; 18:6867-6874.
- 114 Regnier CH, Song HY, Gao X, et al. Identification and characterization of an IkappaB kinase. *Cell* 1997; 90:373-383.
- 115 Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, et al. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell* 1997; 91:243-252
- 116 Hatada EN, Nieters A, Wulczyn FG, et al. The ankyrin repeat domains of the NF-kappa B precursor p105 and the protooncogene bcl-3 act as specific inhibitors of NF-kappa B DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:2489-2493.
- 117 Fortenberry JD, Owens ML, Chen NX, et al. S-nitrosoglutathione inhibits TNF-alpha-induced NFkappaB activation in neutrophils. *Inflamm Res* 2001; 50:89-95
- 118 Elliott G, O'Hare P. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* 1997; 88:223-233
- 119 Vives E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem* 1997; 272:16010-16017
- 120 Derossi D, Joliot AH, Chassaing G, et al. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem* 1994; 269:10444-10450
- 121 May MJ, D'Acquisto F, Madge LA, et al. Selective inhibition of NF-kappaB activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the IkappaB kinase complex. *Science* 2000; 289:1550-1554
- 122 Lee A, Whyte MK, Haslett C. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *J Leukoc Biol* 1993; 54:283-288
- 123 Vera DR, Stadalnik RC, Metz CE, et al. Diagnostic performance of a receptor-binding radiopharmacokinetic model. *J Nucl Med* 1996; 37:160-164
- 124 Hotchkiss R, Nunnally I, Lindquist S, et al. Hyperthermia protects mice against the lethal effects of endotoxin. *Am J Physiol* 1993; 265:R1447-1457
- 125 Kettritz R, Choi M, Salanova B, et al. Fever-like temperatures affect neutrophil NF-kappaB signaling, apoptosis, and ANCA-antigen expression. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17:1345-1353
- 126 Salanova B, Choi M, Rolle S, et al. The effect of fever-like temperatures on neutrophil signaling. *FASEB J* 2005; 19:816-818
- 127 Choi M, Salanova B, Rolle S, et al. Short-term heat exposure inhibits inflammation by abrogating recruitment of and nuclear factor-{kappa}B activation in neutrophils exposed to chemotactic cytokines. *Am J Pathol* 2008; 172:367-777
- 128 Guo RF, Riedemann NC, Laudes IJ, et al. Altered neutrophil trafficking during sepsis. *J Immunol* 2002; 169:307-314
- 129 Gomez-Cambronero J, Horn J, Paul CC, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a chemoattractant cytokine for human neutrophils: involvement of the ribosomal p70 S6 kinase signaling pathway. *J Immunol* 2003; 171:6846-6855
- 130 Li FK, Davenport A, Robson RL, et al. Leukocyte migration across human peritoneal mesothelial cells is dependent on directed chemokine secretion and ICAM-1 expression. *Kidney Int* 1998; 54:2170-2183
- 131 Smart SJ, Casale TB. TNF-alpha-induced transendothelial neutrophil migration is IL-8 dependent. *Am J Physiol* 1994; 266:L238-245
- 132 Yong KL, Rowles PM, Patterson KG, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces neutrophil adhesion to pulmonary vascular endothelium in vivo: role of beta 2 integrins. *Blood* 1992; 80:1565-1575

- 133 Snyder YM, Guthrie L, Evans GF, et al. Transcriptional inhibition of endotoxin-induced monokine synthesis following heat shock in murine peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* 1992; 51:181-187
- 134 Evangelista V, Pamuklar Z, Piccoli A, et al. Src family kinases mediate neutrophil adhesion to adherent platelets. *Blood* 2006
- 135 Jenei V, Deevi RK, Adams CA, et al. Nitric oxide produced in response to engagement of beta2 integrins on human neutrophils activates the monomeric GTPases Rap1 and Rap2 and promotes adhesion. *J Biol Chem* 2006; 281:35008-35020
- 136 Schnitzler N, Haase G, Podbielski A, et al. A co-stimulatory signal through ICAM-beta2 integrin-binding potentiates neutrophil phagocytosis. *Nat Med* 1999; 5:231-235
- 137 Liles WC, Ledbetter JA, Waltersdorff AW, et al. Cross-linking of CD18 primes human neutrophils for activation of the respiratory burst in response to specific stimuli: implications for adhesion-dependent physiological responses in neutrophils. *J Leukoc Biol* 1995; 58:690-697
- 138 Fuortes M, Jin WW, Nathan C. Adhesion-dependent protein tyrosine phosphorylation in neutrophils treated with tumor necrosis factor. *J Cell Biol* 1993; 120:777-784
- 139 Kettritz R, Choi M, Rolle S, et al. Integrins and cytokines activate nuclear transcription factor-kappaB in human neutrophils. *J Biol Chem* 2004; 279:2657-2665
- 140 Harper L, Ren Y, Savill J, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies induce reactive oxygen-dependent dysregulation of primed neutrophil apoptosis and clearance by macrophages. *Am J Pathol* 2000; 157:211-220
- 141 Little MA, Smyth L, Salama AD, et al. Experimental autoimmune vasculitis: an animal model of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated systemic vasculitis. *Am J Pathol* 2009; 174:1212-1220
- 142 von Vietinghoff S, Eulenberg C, Wellner M, et al. Neutrophil surface presentation of the anti-neutrophil cytoplasmic antibody-antigen proteinase 3 depends on N-terminal processing. *Clin Exp Immunol* 2008; 152:508-516
- 143 Schreiber A, Otto B, Ju X, et al. Membrane proteinase 3 expression in patients with Wegener's granulomatosis and in human hematopoietic stem cell-derived neutrophils. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:2216-2224
- 144 Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 1997; 89:3503-3521
- 145 Lominadze G, Powell DW, Luerman GC, et al. Proteomic analysis of human neutrophil granules. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4:1503-1521
- 146 Calafat J, Goldschmeding R, Ringeling PL, et al. In situ localization by double-labeling immunoelectron microscopy of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies in neutrophils and monocytes. *Blood* 1990; 75:242-250
- 147 Goldschmeding R, van Dalen CM, Faber N, et al. Further characterization of the NB 1 antigen as a variably expressed 56-62 kD GPI-linked glycoprotein of plasma membranes and specific granules of neutrophils. *Br J Haematol* 1992; 81:336-345
- 148 Brachemi S, Mambole A, Fakhouri F, et al. Increased membrane expression of proteinase 3 during neutrophil adhesion in the presence of anti proteinase 3 antibodies. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18:2330-2339
- 149 Durant S, Pederzoli M, Lepelletier Y, et al. Apoptosis-induced proteinase 3 membrane expression is independent from degranulation. *J Leukoc Biol* 2004; 75:87-98
- 150 Harper L, Cockwell P, Adu D, et al. Neutrophil priming and apoptosis in anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis. *Kidney Int* 2001; 59:1729-1738
- 151 Hellmich B, Csernok E, Trabandt A, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) but not granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)

- induces plasma membrane expression of proteinase 3 (PR3) on neutrophils in vitro. *Clin Exp Immunol* 2000; 120:392-398
- 152 Witko-Sarsat V, Reuter N, Mouthon L. Interaction of proteinase 3 with its associated partners: implications in the pathogenesis of Wegener's granulomatosis. *Curr Opin Rheumatol*; 22:1-7
- 153 Podust LM, Ouellet H, von Kries JP, et al. Interaction of Mycobacterium tuberculosis CYP130 with heterocyclic arylamines. *J Biol Chem* 2009; 284:25211-25219
- 154 Eddine AN, von Kries JP, Podust MV, et al. X-ray structure of 4,4'-dihydroxybenzophenone mimicking sterol substrate in the active site of sterol 14alpha-demethylase (CYP51). *J Biol Chem* 2008; 283:15152-15159
- 155 Hellmuth K, Grosskopf S, Lum CT, et al. Specific inhibitors of the protein tyrosine phosphatase Shp2 identified by high-throughput docking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:7275-7280
- 156 Hajjar E, Mihajlovic M, Witko-Sarsat V, et al. Computational prediction of the binding site of proteinase 3 to the plasma membrane. *Proteins* 2008; 71:1655-1669
- 157 Korkmaz B, Kuhl A, Bayat B, et al. A hydrophobic patch on proteinase 3, the target of autoantibodies in Wegener granulomatosis, mediates membrane binding via NB1 receptors. *J Biol Chem* 2008; 283:35976-35982
- 158 Choi M, Rolle S, Rane M, et al. Extracellular signal-regulated kinase inhibition by statins inhibits neutrophil activation by ANCA. *Kidney Int* 2003; 63:96-106
- 159 Mayrhauser U, Stiegler P, Stadlbauer V, et al. Effect of hyperthermia on liver cell lines: important findings for thermal therapy in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res*; 31:1583-1588
- 160 Huilgol NG, Gupta S, Sridhar CR. Hyperthermia with radiation in the treatment of locally advanced head and neck cancer: a report of randomized trial. *J Cancer Res Ther*; 6:492-496
- 161 Fisher JW, Sarkar S, Buchanan CF, et al. Photothermal response of human and murine cancer cells to multiwalled carbon nanotubes after laser irradiation. *Cancer Res*; 70:9855-9864
- 162 Atkinson RL, Zhang M, Diagaradjane P, et al. Thermal enhancement with optically activated gold nanoshells sensitizes breast cancer stem cells to radiation therapy. *Sci Transl Med*; 2:55ra79
- 163 Lin DY, Lin SM, Liaw YF. Non-surgical treatment of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 1997; 12:S319-328
- 164 Grabellus F, Podleska LE, Bjerlestam S, et al. Increased shedding of soluble TNF-receptor 1 during hyperthermic TNF-alpha-based isolated limb perfusion. *Int J Hyperthermia*; 27:33-41
- 165 Gellermann J, Hildebrandt B, Issels R, et al. Noninvasive magnetic resonance thermography of soft tissue sarcomas during regional hyperthermia: correlation with response and direct thermometry. *Cancer* 2006; 107:1373-1382
- 166 Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, et al. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol* 2002; 3:487-497
- 167 Thompson HJ. Fever: a concept analysis. *J Adv Nurs* 2005; 51:484-492
- 168 von Vietinghoff S, Choi M, Rolle S, et al. Febrile temperatures control antineutrophil cytoplasmic autoantibody-induced neutrophil activation via inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. *Arthritis Rheum* 2007; 56:3149-3158
- 169 Choi M, Rolle S, Wellner M, et al. Inhibition of NF-kappaB by a TAT-NEMO-binding domain peptide accelerates constitutive apoptosis and abrogates LPS-delayed neutrophil apoptosis. *Blood* 2003; 102:2259-2267

- 170 Choi M, Eulenberg C, Rolle S, et al. The use of small molecule high-throughput screening to identify inhibitors of the proteinase 3-NB1 interaction. *Clin Exp Immunol*; 161:389-396
- 171 Bontscho J, Schreiber A, Manz RA, et al. Myeloperoxidase-specific plasma cell depletion by bortezomib protects from anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies-induced glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*; 22:336-348
- 172 Wang YJ, Wang JT, Fan QX, et al. Andrographolide inhibits NF-kappaBeta activation and attenuates neointimal hyperplasia in arterial restenosis. *Cell Res* 2007; 17:933-941
- 173 Xia YF, Ye BQ, Li YD, et al. Andrographolide attenuates inflammation by inhibition of NF-kappa B activation through covalent modification of reduced cysteine 62 of p50. *J Immunol* 2004; 173:4207-4217
- 174 Chan SJ, Wong WS, Wong PT, et al. Neuroprotective effects of andrographolide in a rat model of permanent cerebral ischaemia. *Br J Pharmacol*; 161:668-679
- 175 Li J, Luo L, Wang X, et al. Inhibition of NF-kappaB expression and allergen-induced airway inflammation in a mouse allergic asthma model by andrographolide. *Cell Mol Immunol* 2009; 6:381-385
- 176 Bao Z, Guan S, Cheng C, et al. A novel antiinflammatory role for andrographolide in asthma via inhibition of the nuclear factor-kappaB pathway. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179:657-665
- 177 Kalergis AM, Iruretagoyena MI, Barrientos MJ, et al. Modulation of nuclear factor-kappaB activity can influence the susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Immunology* 2009; 128:e306-314
- 178 Schmidt-Ullrich R, Memet S, Lilienbaum A, et al. NF-kappaB activity in transgenic mice: developmental regulation and tissue specificity. *Development* 1996; 122:2117-2128
- 179 Henke N, Schmidt-Ullrich R, Dechend R, et al. Vascular endothelial cell-specific NF-kappaB suppression attenuates hypertension-induced renal damage. *Circ Res* 2007; 101:268-276

Danksagung

Ich danke meiner Familie.

Hier vor allem meinem lieben Mann Philipp Grätzel von Grätz, der mit Geduld und Gelassenheit arbeitsintensive Stunden teilte und mir den Halt gab, meinen und unseren Weg zu gehen. Mein Dank gilt unseren lieben, süßen Kindern Luca Han-Soo und Alessio Min-Ou, deren Frohsinn und Offenheit Tor und Tür zu anderen Facetten des Lebens öffnen.

Ein riesengroßer Dank geht an meine geliebten Eltern, ihren Partnern und meinen Schwiegereltern für ihre Aufmunterungen, für das Gefühl, für einen da zu sein, die uns zudem nicht nur materiell, sondern auch bei der Betreuung und Versorgung der Kinder stets gern und immer unterstützten. Ohne (Schwieger-) Eltern wäre die Arbeit niemals in dieser intensiven Form möglich gewesen. Mein inniger Dank geht deswegen an meine Mutter Cha-Jo An und an meinen Vater Sung Taik Choi, an Goung-O Choi, Heinz Mäckler, an Renate und Jochen Grätzel von Grätz.

Besonders verbunden fühle ich mich meinem Bruder Kyu-Do. Seine Ansichten und sein Witz zeigen mir, dass es neben den Belangen des Berufes immer andere Dinge des Lebens zu entdecken gilt.

Ich danke Herrn Professor Dr. Ralph Kettritz für die Ermunterung zum Beginn einer wissenschaftlichen Arbeit, für die enge wissenschaftliche und persönliche Betreuung und Unterstützung, für die Aufmunterung und das gemeinsame Leiden in Phasen wissenschaftlich frustraner Episoden, für die kritische Diskussion und die stets offenen Türen. Neben der Wissenschaft lehrte er mich in der Klinik, Patienten als Menschen zu betrachten und sie in ihrer Gesamtheit zu behandeln. Seine Strukturiertheit und umfassende Kenntnis mit Bezug zu Studienlagen und den pathophysiologisch zu Grunde liegenden Mechanismen haben für das Wirken als Ärztin eine wunderbare Voraussetzung geschaffen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. h. c. Friedrich C. Luft, der mich in erster Instanz lehrte, die klinische Arbeit zu lieben, der unsere Abteilung durch seinen Geist, durch

sein Wissen und durch seine Menschlichkeit prägte. Der Beginn meiner wissenschaftlichen Arbeit war von seinem steten Interesse begleitet und seinem immerwährenden Angebot der Unterstützung.

Insbesondere zu danken habe ich unserem herausragenden Laborteam. Ich danke Susanne Rolle, mit der ich seit meinen Anfängen im Labor zusammen arbeite, ich danke meinem lieben Kollegen, Freund und wissenschaftlichen Begleiter Adrian Schreiber. Ich danke den unermüdlich mitwirkenden Kollegen der Arbeitsgruppe Astrid Bergmann, Julia Bontscho, Claudia Eulenberg, Uwe Jerke und Sylvia Krüger für deren selbstlose Unterstützung in allen Belangen und für die gute herzliche Atmosphäre.

All den Patienten und gesunden Spendern, die erst durch ihre Blut- und Gewebeproben diese Arbeit ermöglichten, möchte ich danken.

Die vorliegende Arbeit wurde umfassend von der Charité, dem MDC, der EU und der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,

welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,

die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen

Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.

mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....

Datum

.....

Unterschrift