

Aus der  
Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie  
Charité, Unviversitätsmedizin Berlin  
Ärztlicher Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Friedrich C. Luft

## **Habilitationsschrift**

# **Mechanismen der ANCA-induzierten Vaskulitis**

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

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin  
von

**Dr. med. Adrian Schreiber  
Geboren am 13.04.1973 in Halle**

**Eingereicht: März 2010**

**Dekanin: Univ.-Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich**

**1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Thomas Benzing**

**2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Christian Hugo**

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I. Einleitung</b> .....	4
<b>II. Fragestellung der vorliegenden Arbeiten</b> .....	11
<b>III. Eigene Originalarbeiten</b> .....	12
1. Die Membranexpression von Proteinase 3 auf neutrophilen Granulozyten ist genetisch determiniert .....	12
2. Die Bedeutung der Membranexpression von Proteinase 3 auf neutrophilen Granulozyten in der ANCA-induzierten Aktivierung .....	22
3. Die Membranexpression von Proteinase 3 auf neutrophilen Granulozyten von Patienten mit Wegenerscher Granulomatose und auf humanen stammzell- differentierten neutrophilen Granulozyten. ....	37
4. Zirkulierende, sich aus dem Knochenmark entwickelnde Zellen sind notwendig und ausreichend, um eine ANCA Glomerulonephritis zu induzieren. ....	49
5. Der Anaphylatoxinrezeptor für C5 <sub>a</sub> vermittelt die Aktivierung neutrophiler Granulozyten und die Entstehung einer Glomerulonephritis durch ANCA. ....	62
6. Die Phosphoinositol 3-Kinase $\gamma$ vermittelt die ANCA-induzierte Glomerulonephritis. ....	75
<b>IV. Diskussion</b> .....	88
<b>V. Zusammenfassung</b> .....	93
<b>VI. Ausblick und weitere Vorhaben</b> .....	96
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	98
<b>Danksagung</b> .....	103
<b>ERKLÄRUNG</b> .....	105

## Abkürzungsverzeichnis

ANCA	Antineutrophile-zytoplasmatische Antikörper
PMN	Polymorphonukleäre Granulozyten= neutrophile Granulozyten
ROS	reaktive Sauerstoffradikale
PR3	Proteinase 3
MPO	Myeloperoxidase
F <sub>γ</sub> R	F <sub>γ</sub> Rezeptor
mPR3	Proteinase 3 Expression auf der Membran neutrophiler Granulozyten
FACS	Durchflusszytometrie
IgG	Immunglobulin G
PI3Kinase	Phosphoinositol-3-Kinase
WT	Wildtypische Tiere
KO	Knock-out
RAG	Recombination Activating Gene, verantwortlich für die VDJ Rekombination
DPPI	Dipeptidylpeptidase I
DHR	Dihydrorhodamine

## I. Einleitung

Antineutrophile-zytoplasmatische Antikörper (ANCA)- assoziierte Vaskulitiden sind durch eine nekrotisierende Entzündung der kleinen Blutgefäße und 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.

Die erstmalige Erwähnung einer generalisierten Vaskulitis eines Patienten fand durch Kussmaul und Meyer im Jahr 1866 statt, die den Begriff Periarteriitis nodosa prägten <sup>1</sup>. Friedrich Wegener beschrieb 1936 Patienten mit einer nekrotisierenden Vaskulitis und granulomatösen Entzündung <sup>2</sup>. Es folgten Veröffentlichungen von Ringertz (1947) und Johnson (1948). In einer Übersichtsarbeit von Godman und Churg über 22 Fallberichte und sieben von den Autoren selbst behandelte Patienten wurde erstmals der Begriff „Wegenersche Granulomatose“ verwandt. Unter diesem Eponym ist die Erkrankung bis heute bekannt, wenngleich dieses im Jahre 2000 aufgrund einer möglichen Beteiligung Friedrich Wegeners am NS-Regime kritisch hinterfragt wurde <sup>3</sup>.

Bis zum heutigen Tag ist die detaillierte Pathogenese der verschiedenen Vaskulitissubgruppen nicht völlig aufgeklärt, so dass derzeit noch immer die Klassifikation und Einteilung nach der Chapel-Hill-Konsensuskonferenz von 1994 erfolgt, welche eine Zuordnung anhand des kleinsten befallenen Gefäßes vollzieht und damit eher eine Einteilung nach pathologischen denn nach ätiologischen Gesichtspunkten versucht <sup>4</sup>.

Antineutrophile-zytoplasmatische Antikörper (ANCA) sind Autoantikörper, die gegen zytoplasmatische Bestandteile neutrophiler Granulozyten und Monozyten gerichtet sind. ANCA wurden erstmalig von Davies et al. 1982 beschrieben,

welcher diese in Patienten mit segmentaler nekrotisierender Glomerulonephritis mittels indirekter Immunfluoreszenz an ethanol-fixierten neutrophilen Granulozyten nachwies <sup>5</sup>. Der heute etablierte enge Zusammenhang zwischen dem Auftreten von ANCA und der Wegenerschen Granulomatose begründet sich grundlegend auf eine von van der Woude et al. 1985 publizierte Arbeit <sup>6</sup>. Dabei beschrieb diese Arbeitsgruppe bei Inkubation der Antikörper mit fixierten neutrophilen Granulozyten ein zytoplasmatisches Fluoreszenzmuster, das heute als cANCA Muster bezeichnet wird. Falk und Jennette unterschieden 1988 davon ein distinktes Fluoreszenzmuster mit einer perinukleären Fluoreszenz (pANCA) <sup>7</sup>. In den folgenden Jahren wurden durch verschiedene Arbeitsgruppen die Zielantigene der ANCA charakterisiert: in der cANCA Fluoreszenz die 29-kDa-Serin-Protease Proteinase 3 (PR3) und in der pANCA Fluoreszenz vornehmlich die Myeloperoxidase (MPO) <sup>8,9,7</sup>. Kürzlich wurde zudem LAMP-2 als wichtiges ANCA-Zielantigen charakterisiert, andere Antigene wie Kathepsin-G, Elastase, Laktoferrin oder  $\alpha$ -Enolase spielen in der Pathogenese und Klinik der ANCA-Vaskulitiden keine Bedeutung <sup>10</sup>.

Aufgrund der engen Assoziation zwischen dem Auftreten von ANCA und den oben aufgeführten Kleingefäßvaskulitiden zum einen und der Korrelation zwischen den ANCA-Titer und der Krankheitsaktivität zum anderen wurde ein pathogenetischer Zusammenhang schon lange vermutet. Gegen eine unmittelbar schädigende Wirkung der ANCA spricht dabei das immunhistologische Bild einer „pauci-immune“-Glomerulonephritis, also einer Glomerulonephritis mit sehr geringen Immunglobulin- und Komplementablagerungen. In dem gegenwärtigen Verständnis der Pathogenese dieser Erkrankungen ist die Interaktion zwischen ANCA, den neutrophilen Granulozyten und dem Endothel zentraler Bestandteil der Krankheitsentstehung. Dieses Konzept beruht maßgeblich darauf, dass von verschiedenen Arbeitsgruppen überzeugend demonstriert werden konnte, dass isolierte ANCA IgG neutrophile Granulozyten *in vitro* aktivieren können, welches in der Generation von reaktiven Sauerstoffradikalen und in der Degranulation von Proteasen resultiert <sup>11,12,13,14,15</sup>. Zudem konnte elegant eine Endothelzellschädigung

in der aktiven ANCA Vaskulitis durch den Nachweis zirkulierender Endothelzellen von der Arbeitsgruppe um Haubitz demonstriert werden <sup>16</sup>.

Die ANCA-Antigene PR3 und MPO befinden sich innerhalb der Granula von neutrophilen Granulozyten und in den monozytären Lysosomen. Das bedeutet, dass die Interaktion zwischen ANCA und ihren Zielantigenen nur dann zustande kommen kann, wenn die Antikörper entweder in die Zelle aufgenommen werden können, die Antigene vom Zellinneren auf die Zellmembran transloziert werden oder aber die Antigene degranuliert werden und dann die Interaktion außerhalb des Granulozyten abläuft. In verschiedenen Arbeiten konnte letztlich überzeugend demonstriert werden, dass die Interaktion zwischen ANCA und den Zielantigenen hauptsächlich auf der Membran der neutrophilen Granulozyten stattfindet. Dabei spielt zum einen die Aktivierung von Fc $\gamma$ -Rezeptoren und zum anderen das „cross-linken“ der ANCA-Antigene auf der Zellmembran eine Rolle, wodurch verschiedene Signaltransduktionswege aktiviert werden <sup>13,17,18</sup>.

*In vitro* Experimente konnten etablieren, dass die Stimulation neutrophiler Granulozyten mit geringen Mengen proinflammatorischer Mediatoren, wie der Zytokine TNF $\alpha$  oder IL-8, eine essentielle Voraussetzung für die nachfolgende Aktivierung durch ANCA ist <sup>19,20,21,12,22</sup>. Durch diesen als Priming bezeichneten Vorgang, der für sich allein nicht zur Aktivierung der neutrophilen Granulozyten führt, wird eine erhöhte Membranexpression der ANCA-Zielantigene induziert, wodurch diese den ANCA leichter zugänglich werden. Dieses könnte auch erklären, warum Infekte zum Triggern der Grunderkrankung führen können. Unterstützt wird diese Hypothese durch Noronha et al., welche erhöhte TNF $\alpha$ -Konzentrationen bestimmen konnten <sup>23</sup>. Letztlich konnten Huugen et al. tierexperimentell die Bedeutung des Primings für die Induktion einer murinen ANCA-induzierten Glomerulonephritis darstellen <sup>24</sup>. Die genauen Signaltransduktionswege, welche die Translokation der ANCA-Antigene PR3 und MPO auf die Membran der neutrophilen Granulozyten kontrollieren, sind dabei nicht geklärt gewesen.

Neben dieser induzierten Membranexpression findet sich jedoch auch eine basale PR3-Expression auf der Zellmembran. Interessanterweise zeigt sich dabei, dass zwei distinkte Neutrophilenpopulationen existieren: eine Subpopulation ohne basale PR3-Membranexpression (mPR3<sub>low</sub>) und eine Subpopulation mit deutlicher PR3-Expression (mPR3<sub>high</sub>). Dieses bimodale Expressionsmuster ist intraindividuell sehr stabil sowie spezifisch und dabei komplett unabhängig vom Aktivierungsgrad der neutrophilen Granulozyten<sup>25,26</sup>. Auffällig ist dabei die große Diversität an mPR3-Expression innerhalb gesunder Spender, die von einer Expression mit 0% bis zu 100% mPR3<sub>high</sub> Population reicht. Wie dieser Prozentsatz bestimmt ist, ist gegenwärtig noch immer nicht vollständig geklärt; jedoch konnten von Vietinghoff et al. 2007 demonstrieren, dass PR3 abhängig von einem weiteren Membranmolekül, dem CD177 (oder NB1), auf der Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten exprimiert wird<sup>27</sup>. Im Weiteren war nicht bekannt, was den Prozentsatz an mPR3-Expression determiniert: unterliegt dieser einer genetischen Kontrolle, oder sind es viel mehr Umweltaspekte, die diesen kontrollieren. Wir untersuchten daraufhin den mPR3-Prozentsatz in unserer WG-Kohorte und untersuchten in Zwillingsstudien, ob dieser genetisch kontrolliert ist.

Zudem konnte demonstriert werden, dass ein höherer mPR3-Prozentsatz ein Risikofaktor für das Auftreten von ANCA-assoziierten Vaskulitiden ist, und dass dieser folgend einen Risikofaktor für das Auftreten von Rezidiven der Erkrankung darstellen kann. Ob dieses aufgrund einer unterschiedlichen Aktivierbarkeit der beiden Subpopulationen durch ANCA auftritt, ist nicht geklärt gewesen. Somit untersuchten wir, ob sich die mPR3<sub>low</sub> von der mPR3<sub>high</sub> Neutrophilenpopulation in der *in vitro* Aktivierbarkeit durch ANCA unterscheiden. Des Weiteren überprüften wir hier, ob die genetische Information des mPR3-Phänotyps in der hämatopoetischen Stammzelle liegt (durch Stammzellendifferenzierungsexperimente) und untersuchten in unserer WG-Kohorte den Einfluss des mPR3-Phänotyps auf den klinischen Verlauf der Erkrankung.

Wie schon erwähnt, führt die Interaktion zwischen ANCA und den membran-exprimierten Antigenen zu einer vollständigen Aktivierung der neutrophilen

Granulozyten, resultierend in der Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS), der Degranulation von toxischen Substanzen und der verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen<sup>28,19</sup>. In dieser Aktivierung spielen verschiedene Signaltransduktionswege eine Rolle: einerseits konnte die Aktivierung des p21 RAS Moleküls gezeigt werden, andererseits wurde die Aktivierung des 5-Lipoxygeneseweges demonstriert<sup>29,30,18</sup>. Aber insbesondere die Phosphoinositol 3-Kinase scheint dabei eine essentielle Rolle zu spielen<sup>17,31</sup>. In diesen Studien konnte zum einen eine Aktivierung des „down-stream“ Mediators Akt durch ANCA-Stimulation gezeigt werden, zum anderen ist die ANCA-Aktivierung durch spezifische PI3K-Hemmer inhibierbar. Welche Isoform der PI3K dabei allerdings involviert ist und ob eine Inhibition auch *in vivo* positive Effekte hat, ist nicht geklärt. Wir haben daher weiter untersucht, welche Isoform der PI3-Kinase aktiviert wird und haben dabei die PI3K $\gamma$  herausarbeiten können. Zudem konnten wir in tierexperimentellen Untersuchungen unter der Verwendung von PI3K $\gamma$ -defizienten Mäusen und der Verwendung eines hochspezifischen Hemmers die Rolle dieser Kinase in der Krankheitsinduktion herausarbeiten.

Die hier beschriebenen *in vitro* Befunde sprechen sehr stark für eine pathogene Bedeutung der ANCA-Neutrophilen-Interaktion in der Entstehung der systemischen Vaskulitis und Glomerulonephritis. Der direkteste Nachweis der pathogenen Bedeutung der ANCA in der Entstehung der Vaskulitis ist der Bericht über den transplazentaren Transfer von MPO-ANCA mit der Entwicklung von pulmonaler Haemorrhagie und Glomerulonephritis in einem Neugeborenen einer an einer ANCA-assoziierten Vaskulitis erkrankten Mutter<sup>32</sup>. Tierexperimentell konnten Xiao et al. 2002 erstmalig nachweisen, dass ANCA eine systemische Vaskulitis initiieren können<sup>33</sup>. Hier wurden MPO-defiziente Tiere mit muriner MPO immunisiert und anschließend Splenozyten dieser Tiere in immuninkompetente RAG2-defiziente Mäuse transferiert. Hierdurch wurde eine schwere nekrotisierende und extrakapillär-proliferierende Glomerulonephritis und systemische Vaskulitis induziert. In einem zweiten Ansatz wurde IgG aus den immunisierten Mäusen isoliert und in MPO-positive wildtypische Tiere transferiert. Auch dieses resultierte in der Induktion einer extrakapillär-proliferativen Glomerulonephritis, welche pauci-



immun war und damit die humane Erkrankung sehr gut widerspiegelt. Diese Experimente bewiesen erstmalig, dass ANCA IgG allein die Erkrankung induzieren können und damit wirklich eine kausale Rolle in dieser Erkrankungsgruppe spielen und nicht nur einen Marker der Erkrankung darstellen. Xiao et al. konnten in einer Nachfolgearbeit elegant beweisen, dass die Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und ANCA für die Erkrankung notwendig ist, indem durch die spezifische Depletion neutrophiler Granulozyten Tiere vor der Erkrankung geschützt wurden<sup>34</sup>. Demgegenüber konnte bisher für anti-PR3 ANCA kein überzeugendes Tiermodell mit Induktion einer systemischen Vaskulitis und Glomerulonephritis entwickelt werden<sup>35</sup>. Wir haben dann das oben genannte Tiermodell durch einen Knochenmarktransplantationsansatz weiter optimiert und des weiteren etabliert, dass MPO-positive zirkulierende Zellen das primäre Ziel der ANCA sind und notwendig wie ausreichend zur Krankheitsinduktion sind.

Aus den Charakteristika der Wegenerschen Granulomatose ist bisher angenommen worden, dass diese Erkrankung eine komplementunabhängige Entität darstellt. Dieses beruht zum einen darauf, dass in der Immunhistologie keine Ablagerung von Komplementfaktoren zu detektieren ist, und dass zum anderen keine Verminderung der Serumkonzentration der Komplementfaktoren als Zeichen eines Komplementverbrauches zu verzeichnen ist. 2006 konnten Xiao et al. überraschend tierexperimentell darstellen, dass Mäuse mit einer Komplementfaktor-C3- oder Komplementfaktor-B-Defizienz vor der Erkrankung geschützt waren, währenddessen eine Defizienz des Komplementfaktors C4 keinen Einfluss auf die Erkrankungsschwere hatte<sup>36</sup>. Dieses deutet auf eine Bedeutung des alternativen Weges der Komplementaktivierung in der ANCA-Vaskulitis hin. Die Gruppe um Peter Heeringa konnte ebenfalls eine Bedeutung des Komplementsystems in der ANCA-Vaskulitis tierexperimentell herausarbeiten; hierbei wurde durch eine spezifische Inhibition des Komplementfaktors C5 eine verminderte Erkrankungsschwere erreicht. Wie in der ANCA-assoziierten Vaskulitis das Komplementsystem angesichts der nicht bestehenden glomerulären Komplementablagerungen involviert ist und wie die Aktivierung des Komplementsystems vonstatten geht, haben wir in einer Folgearbeit detailliert

aufgeklärt und dabei das Anaphylatoxin C5<sub>a</sub> als essentiellen Bestandteil der Aktivierungskaskade herausgearbeitet.

Unser Ziel war es, die Mechanismen der Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch ANCA tierexperimentell und durch diverse *in vitro* Versuche detaillierter zu untersuchen und zu verstehen. Das bessere Verständnis von Krankheitsmechanismen sollte darüber hinaus neue therapeutische Zielmoleküle identifizieren.

## **II. Fragestellung der vorliegenden Arbeiten**

Die detaillierten pathogenetischen Abläufe bei den ANCA-assoziierten Vaskulitiden wurden in den vorliegenden Arbeiten näher untersucht. Dabei wurden zwei Aspekte herausgegriffen und zum Gegenstand detaillierter Untersuchungen gemacht, nämlich die Mechanismen in der kausal bedeutenden Expression des ANCA-Antigens Proteinase 3 auf der Membran neutrophiler Granulozyten und die detaillierten Effektormechanismen in dieser Erkrankung, welche im komplexen Tiermodell untersucht wurden.

### III. Eigene Originalarbeiten

#### 1. Die Membranexpression von Proteinase 3 auf neutrophilen Granulozyten ist genetisch determiniert.

*Schreiber A, Busjahn A, Luft FC, Kettritz R. Membrane expression of proteinase 3 is genetically determined. J Am Soc Nephrol 2003;14:68-75*

Studien zeigten, dass die Menge an mPR3 Expression (im Unterschied zum Prozentsatz) mit der Krankheitsaktivität korreliert <sup>37</sup>. Zudem zeigte sich, dass das ANCA-Zielantigen PR3 nur auf einer Subpopulation neutrophiler Granulozyten exprimiert wird <sup>26,25</sup>. Der Prozentsatz an mPR3<sub>high</sub> exprimierenden neutrophilen Granulozyten scheint dabei innerhalb eines Individuums sehr stabil zu sein. Demgegenüber zeigt sich jedoch eine große interindividuelle Variabilität mit einem mPR3<sub>high</sub> Prozentsatz zwischen 0 und 100%. Des Weiteren konnte in einer Studie demonstriert werden, dass ein hoher mPR3<sub>high</sub> Prozentsatz einen Risikofaktor für die Entwicklung einer ANCA-assoziierten Vaskulitis (in einer französischen Kohorte) darstellt <sup>26</sup>. Wie der mPR3-Prozentsatz determiniert wird, war zu diesem Zeitpunkt völlig unklar. Aus einer kleinen Untersuchung an zwei Familien über 3 Generationen wurde der Verdacht geäußert, dass ein genetischer Einfluss bestehen könnte <sup>26</sup>. Wir haben in dieser Arbeit die Hypothesen geprüft, (I) dass der Prozentsatz an mPR3-positiven Granulozyten in unserer Kohorte an Patienten mit Wegenerscher Granulomatose höher ist als in einer Kontrollkohorte und (II) dass dieser Prozentsatz genetisch determiniert ist.

Wir konnten hier mit longitudinalen Doppelbestimmungen nachweisen, dass der mPR3 Prozentsatz über einen längeren Zeitraum sehr stabil ist. Auch in unserer Berliner Kohorte konnten wir daraufhin nachweisen, dass Patienten mit

Wegenerscher Granulomatose einen höheren mPR3 Prozentsatz aufweisen (mittlerer mPR3<sub>high</sub> Prozentsatz von 56,3% in der Kontrollgruppe gegen 76,8% in den Patienten mit Wegenerscher Granulomatose). Daraufhin untersuchten wir eineiige und zweieiige Zwillingspaare in ihrer mPR3 Expression und fanden eine sehr hohe Korrelation zwischen den eineiigen Zwillingspaaren (mit einem  $R=0,99$ ), währenddessen sich in den zweieiigen Zwillingen keine Korrelation aufweisen ließ ( $R=0,06$ ). Für die Gesamtmenge an membran-exprimierter PR3 gilt dabei ein ähnliches Bild der Korrelation. Dieses deutet auf eine deutliche genetische Regulierung der mPR3 Expression hin. Im Weiteren untersuchten wir, ob die Differenz in der Membranexpression an PR3 zwischen den mPR3<sub>high</sub> und mPR3<sub>low</sub> neutrophilen Granulozyten Folge eines differenten Gesamtzellgehaltes an PR3 ist. Dabei bestimmten wir den intrazellulären PR3 Gehalt mittels intrazellulärer Durchflußzytometrie (FACS) und fanden in beiden Populationen eine identische Expression. Auch verglichen wir Spender mit hohem und niedrigem mPR3 Prozentsatz und fanden ebenfalls keinen Unterschied im Gesamtzellgehalt (mittels Western-Blot Analyse). Letztlich trennten wir durch eine Durchflußzytometriesortierung (FACS-Sort) beide Populationen physisch voneinander und fanden auch hier keinen Unterschied im intrazellulären PR3 Gehalt zwischen beiden Populationen.

Die Ergebnisse dieser Publikation implizieren, dass der mPR3 Prozentsatz einen Risikofaktor für die Entwicklung einer Wegenerschen Granulomatose darstellt. Dieses bestätigt die Daten, die an einer französischen Patientenkohorte erhoben wurden. Zudem konnten wir hier erstmalig experimentell schlüssig beweisen, dass der intraindividuell äußerst stabile mPR3 Prozentsatz auf genetischer Ebene reguliert wird. Darüber hinaus konnten wir ausschließen, dass der Unterschied in der Membranexpression auf einem differenten Gesamtzellgehalt an PR3 beruht. Diese Daten tragen weiter zum Verständnis der Membranexpression von PR3 bei.

## 2. Die Bedeutung der Membranexpression von Proteinase 3 auf neutrophilen Granulozyten in der ANCA-induzierten Aktivierung.

*Schreiber A, Luft FC, Kettritz R. Membrane proteinase 3 expression and ANCA-induced neutrophil activation. Kidney Int 2004;65:2172-83*

In der oben erwähnten Arbeit konnten wir zeigen, dass ein erhöhter Prozentsatz membran-positiver neutrophiler Granulozyten einen Risikofaktor für die Wegenersche Granulomatose darstellt. Dieses war auch in anderen Patientenkohorten dargestellt worden <sup>26</sup>. Zudem wurde in einer weiteren Untersuchung ein Zusammenhang zwischen dem Prozentsatz der PR3-Membranexpression und dem Auftreten von Rezidiven der Erkrankung beschrieben <sup>38</sup>. In vielen *in vitro* Untersuchungen konnte klar dokumentiert werden, dass die Interaktion zwischen dem neutrophil-exprimierten ANCA-Antigen Proteinase 3 und ANCA zur Stimulation der neutrophilen Granulozyten führt. Wir stellten daher die Hypothese auf, dass eine höhere PR3-Membranexpression diese Interaktion zwischen ANCA und ihrem Zielantigen erleichtert, welche dann in einer konsekutiv stärkeren Aktivierung resultiert. Wir überprüften, ob neben der unterschiedlichen PR3-Membranexpression noch weitere Membranmoleküle ein bimodales Expressionsmuster aufweisen und somit den unterschiedlichen klinischen Verlauf erklären könnten.

Um diese Hypothese zu testen, trennten wir die mPR3<sub>low</sub> und mPR3<sub>high</sub> Population neutrophiler Granulozyten physisch durch eine magnetische Bead-Separation. Damit konnten wir jeweils eine zu 95% reine Subpopulation erreichen. Dieser experimentelle Ansatz wurde bewusst gewählt, da dieser es ermöglichte, neutrophile Granulozyten eines Spenders miteinander zu vergleichen und somit die

große interindividuelle Differenz zwischen verschiedenen Spendern als Einflussgröße ausschloss. Wir konnten demonstrieren, dass eine Stimulation der mPR3<sub>high</sub> Population durch PR3-ANCA zu einer deutlich verstärkten Sauerstoffradikalproduktion im Vergleich zu der mPR3<sub>low</sub> Population führte, währenddessen beide Populationen durch MPO-ANCA oder andere Stimulantien identisch aktivierbar waren. Dieses konnte zusätzlich durch die Demonstration einer Dosisabhängigkeit (vom Prozentsatz der PR3-Membranexpression) bestätigt werden. Dabei titrierten wir aus den zwei physisch getrennten Populationen wiederum gemischte Populationen mit definierten Prozentsätzen. Im Weiteren konnten wir in dieser Arbeit demonstrieren, dass die mPR3<sub>high</sub> im Vergleich zur mPR3<sub>low</sub> Population eine stärkere Aktivierung ANCA-stimulierter Signaltransduktionswege (Aktivierung der PI3Kinase mit Phosphorylierung von Akt) durch PR3-ANCA aber nicht MPO-ANCA aufweist. Diese Ergebnisse bewiesen erstmalig, dass es in der Stimulation neutrophiler Granulozyten durch PR3-ANCA eine deutliche Abhängigkeit von der PR3 Membranexpression gibt. Diese Ergebnisse können damit potentiell erklären, wie der Prozentsatz das Auftreten der Erkrankung zum einen und zum anderen den klinischen Verlauf der Erkrankung beeinflussen kann. Im Weiteren untersuchten wir in dieser Arbeit, ob sich diese beiden Subpopulationen in anderen wichtigen biologischen Funktionen unterscheiden. Dazu wurde untersucht, ob beide Populationen eine differente Migrationsfähigkeit durch extrazelluläre Matrix besitzen. Hintergrund dieser Untersuchungen ist, dass die ANCA Erkrankung durch einen ausgeprägten glomerulären Neutrophileninflux charakterisiert ist und die membran-exprimierte PR3 als proteolytisch aktives Enzym diese Migration begünstigen könnte. In diesen Untersuchungen konnten wir aber mittels unterschiedlichen experimentellen Ansätzen keinen Unterschied herausarbeiten.

Diese Studie konnte erstmalig darstellen, dass der Prozentsatz der PR3-membranexprimierenden Neutrophilenpopulation die Stimulierbarkeit durch PR3-ANCA bestimmt. Unsere Daten lassen vermuten, dass diese verstärkte Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch PR3-ANCA dann konsekutiv zur vermehrten

Sauerstoffradikalproduktion führt, welches dann zur beobachteten schwereren klinischen Manifestation führt.



### **3. Die Membranexpression von Proteinase 3 auf neutrophilen Granulozyten von Patienten mit Wegenerscher Granulomatose und auf humanen stammzell-differentierten neutrophilen Granulozyten.**

*Schreiber A, Otto B, Ju X, Zenke M, Goebel U, Luft FC, Kettritz R. Membrane proteinase 3 expression in patients with Wegener's granulomatosis and in human hematopoietic stem cell-derived neutrophils. J Am Soc Nephrol. 2005;16:2216-24*

Unsere Voruntersuchungen und Arbeiten anderer Gruppen zeigten, dass die Membranexpression von Proteinase 3 auf neutrophilen Granulozyten interindividuell sehr heterogen mit Prozentsätzen zwischen 0% und 100% Membran-Proteinase 3-exprimierender neutrophiler Granulozyten ist, währenddessen dieses intraindividuell äußert stabil auch über längere Zeiträume ist<sup>39,26,38</sup>. Zudem wurde postuliert, dass ein höherer Prozentsatz an Membran-Proteinase 3 exprimierenden neutrophilen Granulozyten einen Risikofaktor für ANCA-assoziierte Vaskulitiden darstellt und dass Patienten mit höheren Prozentsätzen eine höhere Rezidivrate der Erkrankung aufweisen<sup>38</sup>. Aus unseren oben detaillierter erläuterten Zwillingsuntersuchungen wussten wir, dass der Membranexpression von Proteinase 3 offensichtlich eine genetische Regulation zugrunde liegt, wie genau diese vonstatten geht, war unklar.

Ziel dieser Arbeit war daher: I) die Untersuchung der Membran-Proteinase 3 Expression in unserer Kohorte an Patienten mit Wegenerscher Granulomatose im Vergleich zu einer gesunden Vergleichspopulation, II) die Überprüfung, ob innerhalb der Kohorte der Patienten mit Wegenerscher Granulomatose ein höherer Prozentsatz einen Risikofaktor für eine erhöhte Rezidivrate oder einen anderweitig aggressiveren Verlauf der Erkrankung darstellt, III) die Untersuchung, ob die hämatopoetische Stammzelle in eine bimodale Neutrophilenpopulation differenziert werden kann und damit diesen Phänotyp erklären kann.

Die ersten beiden Fragestellungen wurden an der Kohorte von Patienten mit Wegenerscher Granulomatose untersucht, die in der I. Inneren Klinik an der Franz-Volhard-Klinik in Berlin-Buch behandelt wurden. Von 81 Patienten und 154 gesunden Kontrollen wurden die neutrophilen Granulozyten isoliert und deren Membran-PR3 Expression mittels Durchflußzytometrie phänotypisiert. Hierbei fanden wir wie in den zwei anderen vorbeschriebenen Kohorten einen deutlich höheren mittleren Prozentsatz an PR3-exprimierenden Granulozyten in dieser Patientenkohorte. Im nächsten Schritt untersuchten wir den klinischen Verlauf der Erkrankung. Dabei zeigte sich, dass Patienten mit einem höheren Membran-PR3 Prozentsatz bei Erstdiagnose höhere Kreatininwerte, eine niedrigere Kreatininclearance, höhere CRP-Werte, niedrigere Albuminspiegel und einen geringeren Hb-Wert hatten. Zudem zeigte sich, dass Patienten, die initial dialysepflichtig waren, einen höheren PR3-Membranprozentsatz aufweisen. Somit konnten wir hier deutliche Hinweise für einen aggressiveren klinischen Verlauf der Erkrankung bei Patienten mit höherem PR3-Membranprozentsatz finden. Im Unterschied zu den Untersuchungen der niederländischen Gruppe konnten wir jedoch keinen Einfluss auf die Rezidivrate der Erkrankung darstellen.

Im zweiten Teil untersuchten wir, ob humane CD34-positive umbilikale hämatopoetische Stammzellen in funktionale neutrophile Granulozyten *in vitro* differenziert werden können und ob hierbei eine bimodale PR3-Membranexpression entsteht. In diesen Untersuchungen konnten wir durch eine 14-tägige *in vitro* Differenzierung eine zu 88%-reine Neutrophilenpopulation erreichen, welche in der Morphologie, der Expression verschiedener spezifischer Neutrophilenoberflächenmarker und auch in der Funktionalität (Produktion reaktiver Sauerstoffradikale) den reifen peripheren neutrophilen Granulozyten sehr ähneln. Interessanterweise konnten wir in dieser uniformen Neutrophilenpopulation trotz identischer *in vitro* Differenzierungsbedingungen die Entstehung einer bimodalen Expression an PR3 beobachten. Diese Daten belegen, dass die Information zur Entstehung einer bimodalen Neutrophilenpopulation innerhalb der hämatopoetischen Stammzelle liegt und nicht eine Folge der Umgebungsbedingungen (zum Beispiel verschiedener Zytokinmilieus) ist.

Diese Arbeit konnte somit nachweisen, dass ein höherer Prozentsatz an Membran-Proteinase 3 exprimierenden neutrophilen Granulozyten auch in unserer großen Kohorte an Patienten mit Wegenerscher Granulomatose einen Risikofaktor für einen schwereren Verlauf darstellt, wenngleich wir hier keinen Einfluss auf die Rezidivhäufigkeit fanden. Im Weiteren konnten wir erstmalig nachweisen, dass die Information zur Entstehung dieser zwei diversen Neutrophilenpopulation innerhalb der hämatopoetischen Stammzelle liegt.

#### **4. Zirkulierende, sich aus dem Knochenmark entwickelnde Zellen sind notwendig und ausreichend, um eine ANCA Glomerulonephritis zu induzieren.**

*Schreiber A, Xiao H, Falk RJ, Jennette JC. Bone marrow-derived cells are sufficient and necessary targets to mediate glomerulonephritis and vasculitis induced by anti-myeloperoxidase antibodies. J Am Soc Nephrol. 2006;17:3355-64*

In den oben aufgeführten Studien haben wir uns vornehmlich mit der Expression der ANCA Antigene auf den neutrophilen Granulozyten und der Aktivierung dieser durch ANCA beschäftigt. Diese *in vitro* Untersuchungen legen nahe, dass die Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und den ANCA der Erkrankung pathogenetisch zugrunde liegt. Ein direkter Hinweis darauf kann jedoch nur mittels tierexperimentellen Untersuchungen gelingen. Dieser Beweis konnte erstmalig elegant von Xiao et al. geführt werden<sup>33</sup>. In diesem Modell konnte eine extrakapillär-proliferative Glomerulonephritis in Mäusen durch adoptiven Transfer von Splenozyten von MPO-immunisierten MPO-defizienten Mäusen in RAG2-defiziente Tiere induziert werden. In einem zweiten Schritt wurde durch Transfer nur der anti-MPO IgG in wildtypische Tiere eine Glomerulonephritis induziert. Hierbei war jedoch nur eine sehr geringe Erkrankungsschwere induziert worden, bei der im Mittel lediglich 5 Prozent der Glomeruli extrakapilläre Proliferationen aufwiesen. Zudem ist die humane ANCA-Erkrankung typischerweise eine remittierende und lang andauernde Erkrankung, welches in diesem Tiermodell nicht ausreichend dargestellt wurde und somit nicht hinreichend untersuchbar ist.

Ziel dieser Arbeit war daher, ein optimiertes Tiermodell der anti-MPO ANCA induzierten Vaskulitis und Glomerulonephritis zu etablieren, welches zum einen eine schwerere Erkrankungsaktivität zeigt und damit die humane Erkrankung

besser darstellt und zum anderen eine Untersuchung der Erkrankung über längere Zeiträume ermöglicht.

Hierzu wurde ein neuer differenter Ansatz der Krankheitsinduktion gewählt: MPO-defiziente Mäuse wurden mit muriner Myeloperoxidase immunisiert. Diese Tiere entwickeln daraufhin anti-MPO-Antikörper; da diese jedoch MPO-defizient sind, findet sich das Zielantigen nicht und die Tiere erkranken nicht. Zur Etablierung des Antigens MPO in diesen Tieren wurde nun der Ansatz einer Knochenmarktransplantation mit MPO-positiven (wildtypischen) Knochenmarkzellen gewählt. Dazu wurden die Mäuse nach Erreichen eines hohen anti-MPO Antikörpertiters letal bestrahlt und anschließend mit MPO-positiven Knochenmarkzellen rekonstituiert. Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass anti-MPO Titer das Engraftment mit MPO-positiven Zellen nicht verhindert, und dass diese Tiere nach Engraftment eine systemische Vaskulitis entwickeln.

Die Tiere entwickelten dabei eine systemische Vaskulitis, eine pulmonale Kapillaritis und insbesondere eine schwere extrakapillär-proliferative Glomerulonephritis. Dabei imponierte die Nierenerkrankung mit einer deutlich schwereren Manifestation als die zuvor entwickelten Modelle, zudem war es jetzt möglich, die Erkrankung über einen achtwöchigen Zeitraum longitudinal zu untersuchen. In keiner der durchgeführten Kontrollgruppen zeigten sich Hinweise für eine systemische Vaskulitis oder Glomerulonephritis (nicht immunisierte Tiere transplantiert mit MPO-positivem Knochenmark, immunisierte Tiere transplantiert mit MPO-defizientem Knochenmark, wildtypische nicht-immunisierte Tiere transplantiert mit wildtypischem Knochenmark).

In einem weiteren Ansatz überprüften wir die Hypothese, dass zirkulierende Zellen das primäre Ziel der ANCA darstellen. Gute Hinweise dafür hatten wir aus dem oben beschriebenen aktiven Knochenmarktransplantationsmodell schon gewonnen; in einem differenteren Ansatz generierten wir verschiedene chimäre Mäuse: wildtypische Tiere transplantiert mit wildtypischen Knochenmark (damit MPO-Expression in zirkulierenden und ortsständigen Zellen), MPO-defiziente Tiere

transplantiert mit wildtypischem Knochenmark (MPO-Expression nur in zirkulierenden Zellen) und wildtypische Tiere transplantiert mit MPO-defizientem Knochenmark (MPO-Expression nur in ortsständigen Zellen), in welche dann anti-MPO IgG transferiert wurde. Dabei entwickelten nur Tiere mit einer MPO-Expression in zirkulierenden Zellen eine Glomerulonephritis.

Diese Arbeit etablierte ein neues, verbessertes Tiermodell der ANCA-Vaskulitis und bewies erstmalig experimentell, dass die Expression des ANCA Zielantigen nur in zirkulierenden Zellen ausreichend und notwendig zur Induktion der Erkrankung ist und damit das primäre Ziel der Antikörper darstellt.

## 5. Der Anaphylatoxinrezeptor für C5<sub>a</sub> vermittelt die Aktivierung neutrophiler Granulozyten und die Entstehung einer Glomerulonephritis durch ANCA.

*Schreiber A, Xiao H, Jennette JC, Schneider W, Luft FC, Kettritz R. C5a receptor mediates neutrophil activation and ANCA-induced glomerulonephritis. J Am Soc Nephrol. 2009 Feb;20:289-98*

Die ANCA-assoziierten Vaskulitiden und Glomerulonephritiden sind durch das Fehlen beziehungsweise die sehr geringe Ablagerung von glomerulären Immunglobulinen oder Komplementfaktoren gekennzeichnet, was im angloamerikanischen Raum als „pauci-immune“ Glomerulonephritis bezeichnet wird („spärlich“). Zudem zeigt sich bei der ANCA Vaskulitis keine systemische Verminderung der Komplementfaktoren C3 oder C4, so dass die Bedeutung des Komplementsystems in der Pathogenese dieser Erkrankung bisher als sehr unbedeutend betrachtet wurde. Wir konnten in einer Vorarbeit überraschend zeigen, dass im Tiermodell der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis der alternative Weg der Komplementsystemaktivierung fundamental für die Induktion der Glomerulonephritis ist<sup>36</sup>.

Fokus dieser Arbeit war, die genauen Mechanismen der Komplementaktivierung in der ANCA-assoziierten Vaskulitis aufzudecken. Dabei wurde einerseits auf die Mechanismen in der Aktivierung der Komplementkaskade und andererseits auf die resultierenden Effekte der Aktivierung des Komplementsystems fokussiert. Diese Fragestellungen wurden in *in vitro* und *in vivo* Versuchen detailliert untersucht.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Hypothese überprüft, dass ANCA-stimulierte neutrophile Granulozyten für die Aktivierung des Komplementsystems verantwortlich zeichnen. Hierzu wurden diese mit aufgereinigten ANCA IgG stimuliert, welches in der Generation von reaktiven Sauerstoffradikalen und der

Degranulation resultiert. Überstände dieser stimulierten Zellen wurden im Anschluss mit gesunden, humanen Sera koinkubiert. Dabei konnten wir zeigen, dass die Überstände ANCA-stimulierter neutrophilen Granulozyten zur Aktivierung der Komplementkaskade mit konsekutiver Generierung der Anaphylatoxine C3<sub>a</sub> und C5<sub>a</sub> führen. Im Weiteren konnten wir demonstrieren, dass dieses zum großen Teil über die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale vermittelt wird. Da Anaphylatoxine als potente Entzündungsmediatoren eine wichtige Rolle spielen, wurde im nächsten Schritt getestet, ob die durch ANCA-Stimulation generierten Anaphylatoxine C3<sub>a</sub> und C5<sub>a</sub> neutrophile Granulozyten für die weitere ANCA-Stimulation primen können. Indem wir die Hochregulation der Membranexpression der ANCA-Antigene PR3 und MPO und die Stimulation der Sauerstoffradikalenbildung zeigten, konnten wir C5<sub>a</sub> als einen effizienten und potenten Primer für die nachfolgende ANCA-Stimulation etablieren.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit dieser Prozess der Komplementaktivierung, den wir *in vitro* gut etablieren konnten, eine wirkliche Bedeutung in der Erkrankung besitzt. Dazu nutzen wir das schon näher beschriebene murine Modell der anti-MPO induzierten Glomerulonephritis, bei der wir die Erkrankung durch eine Knochenmarktransplantation in immunisierte Tiere induzieren. Hierbei verwendeten wir zum einen Knochenmarkzellen aus wildtypischen Tieren und zum anderen aus C5<sub>a</sub>-Rezeptor-defizienten Tieren. In diesen Untersuchungen zeigte sich, dass nur jene Tiere, welche mit wildtypischem Knochenmark transplantiert wurden, eine Glomerulonephritis entwickelten, währenddessen Tiere, die mit Knochenmark aus C5<sub>a</sub>-Rezeptor-defizienten Tieren transplantiert wurden, eine deutlich geringe Erkrankungsschwere demonstrieren. Somit konnten wir eine Relevanz der *in vitro* Befunde darstellen und dabei den C5<sub>a</sub>-Rezeptor als von essentieller Bedeutung für die ANCA Vaskulitis etablieren.

Die Ergebnisse dieser Publikation implizieren zusammen mit unseren Vorarbeiten eine essentielle Rolle des Komplementsystems für die ANCA-induzierte Glomerulonephritis. Zudem wurde hier zum ersten Mal demonstriert, dass der C5<sub>a</sub>-Rezeptor eine zentrale Bedeutung in der ANCA-induzierten Glomerulonephritis



besitzt. Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass das Komplementsystem einen wichtigen Amplifikationsloop in der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis darstellt. Dabei wird das Komplementsystem durch ANCA-stimulierte neutrophile Granulozyten aktiviert, welches dann zur Generierung der potenten Anaphylatoxine  $C3_a$  und  $C5_a$  führt. Von diesen scheint insbesondere das  $C5_a$  im Sinne eines Amplifikationsloops wiederum neutrophile Granulozyten für eine ANCA-induzierte Stimulation zu primen. Eine Inhibition des Komplementsystems könnte daher eine neue Therapieoption der ANCA-assoziierten Vaskulitis darstellen.

## 6. Die Phosphoinositol 3-Kinase $\gamma$ vermittelt die ANCA-induzierte Glomerulonephritis.

**Schreiber A, Rolle S, Peripelittchenko L, Rademann J, Schneider W, Luft FC, Kettritz R.** Phosphoinositol 3-kinase  $\gamma$  mediates Anti-Neutrophil Cytoplasmic Autoantibody-induced glomerulonephritis *Kidney Int.* 2009 Nov 11.

In verschiedenen Arbeiten konnte überzeugend demonstriert werden, dass die Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und den ANCA IgG eine zentrale Bedeutung in der Pathogenese der ANCA assoziierten Vaskulitis darstellt<sup>19,14,40,41,42,43</sup>. Dabei binden ANCA an die Zielantigene MPO und PR3, welche auf der Zelloberfläche geprimter neutrophiler Granulozyten exprimiert werden. In diesem Prozess der Aktivierung der neutrophilen Granulozyten spielen verschiedene Signaltransduktionswege eine essentielle Bedeutung<sup>17,31,18</sup>. Insbesondere der Phosphoinositol 3-Kinase (PI3K) Akt Signaltransduktionsweg ist dabei von essentieller Bedeutung. Dieses konnte von verschiedenen Gruppen in *in vitro* Experimenten herausgearbeitet werden. Inwieweit diese Signaltransduktionswege jedoch eine echte *in vivo* Relevanz in der Erkrankung besitzen und welche spezielle PI3K Subklasse hierin von Bedeutung ist, war weitgehend unklar.

Wir postulierten, dass die PI3K $\gamma$  Isoform die Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch ANCA kontrolliert und dass die ANCA-induzierte Glomerulonephritis durch diesen Signaltransduktionsweg vermittelt wird. Letztlich überprüften wir, ob eine spezifische pharmakologische Inhibition dieses Signaltransduktionsweges im Tiermodell eine therapeutische Option darstellen kann.

Zum Beweis der essentiellen Bedeutung der PI3K $\gamma$  Isoform in der ANCA-induzierten Glomerulonephritis wurden im beschriebenen ANCA-Tiermodell

wildtypische mit PI3K $\gamma$ -defizienten Tiere verglichen. Dabei zeigte sich, dass die knock-out Tiere eine deutlich verminderte Erkrankungsschwere der Glomerulonephritis entwickelten. Um die Mechanismen der Protektion zu identifizieren, wurde ein – schon publizierter und etablierter - spezifischer PI3K $\gamma$ -Inhibitor synthetisiert (AS605240) und diverse Funktionen neutrophiler Granulozyten *in vitro* getestet, welchen eine Bedeutung in der ANCA Pathogenese zugesprochen wird. In diesen Experimenten zeigte sich, dass die spezifische pharmakologische Inhibition der PI3K $\gamma$  durch AS605240 die ANCA-induzierte Aktivierung dieses Signaltransduktionsweges hemmt und dass infolgedessen die ANCA-induzierte Sauerstoffradikalproduktion, die Degranulation und die Transmigration gehemmt sind. So konnten wir hier in diversen Funktionstests erstmalig nachweisen, dass der PI3K $\gamma$ -Signaltransduktionsweg von essentieller Bedeutung für die ANCA-induzierte Aktivierung neutrophiler Granulozyten ist. In einem zweiten *in vivo* Ansatz wurde Tieren der spezifische PI3K $\gamma$ -Hemmer AS605240 als oraler Inhibitor verabreicht. Durch diesen therapeutischen Ansatz konnten wir eine deutliche Verminderung der Schwere der ANCA-induzierten Glomerulonephritis erreichen.

In dieser Arbeit konnten wir zum ersten Mal die essentielle Bedeutung der PI3K $\gamma$  in der ANCA-induzierten Glomerulonephritis darstellen. Zudem konnte im Tiermodell demonstriert werden, dass die pharmakologische Inhibition der PI3K $\gamma$  ein potentieller Therapieansatz der ANCA-induzierten Glomerulonephritis sein könnte.

## IV. Diskussion

In den hier zusammengefassten Arbeiten wurden mit unterschiedlichen Methoden die zugrunde liegenden Mechanismen der ANCA-induzierten Vaskulitis und Glomerulonephritis näher untersucht. Dabei wurden zum einen die genauen Mechanismen der Membranexpression der ANCA-Antigene auf neutrophilen Granulozyten und zum anderen die Effektormechanismen neutrophiler Granulozyten und deren Bedeutung in der Induktion der Vaskulitis und Glomerulonephritis näher untersucht.

Trotz deutlich verbesserter Therapien mit gutem initialen Ansprechen stellen die ANCA-induzierten Vaskulitiden für den Kliniker noch immer eine problematische Erkrankung dar, da bei einer hohen Rezidivhäufigkeit die Therapien oftmals einen nicht anhaltenden Effekt erreichen und die etablierten zytotoxischen Therapien mit einer hohen Nebenwirkungsrate assoziiert sind. Daher ist ein besseres Verständnis der Erkrankung und Ihrer Pathogenese dringend notwendig, um bessere und spezifischere Therapien entwickeln zu können.

In den ersten Arbeiten fokussierten wir auf die Mechanismen der ANCA-Antigenexpression und deren Bedeutung in der ANCA-induzierten Stimulation. Interessanterweise wurde für die Membranexpression der Proteinase 3 auf neutrophilen Granulozyten ein bimodales Verteilungsmuster mit zwei distinkten Neutrophilenpopulationen gefunden. Wir konnten dieses an einer großen Kohorte gesunder Probanden bestätigen und zeigten, dass dieser Prozentsatz eine große interindividuelle Diversität besitzt, sich hingegen intraindividuell äußerst stabil verhält. Wir demonstrierten durch Untersuchungen an Zwillingspaaren, dass dieser Prozentsatz genetisch determiniert ist<sup>39</sup>. Diese Studie präsentierte zum ersten Mal Daten darüber, wie die PR3-Membranexpression reguliert sein könnte. In weiteren Studien konnte dann später von verschiedenen Gruppen demonstriert werden, dass diese heterogene Membranexpression der Proteinase 3 durch ein bimodal

exprimiertes GPI-verankertes Membranprotein (CD177) im Sinne eines PR3-Rezeptors determiniert wird<sup>27,44</sup>.

Von verschiedenen Gruppen war etabliert worden, dass ein erhöhter Prozentsatz der Membranexpression der PR3 einen Risikofaktor für die Entstehung einer ANCA-Vaskulitis darstellt<sup>26,38,45</sup>. Die pathogenetische Bedeutung einer erhöhten PR3-Membranexpression für die Erkrankung war zu diesem Zeitpunkt unklar. Wir konnten hier nachweisen, dass eine erhöhte Membranexpression von PR3 in einer vermehrten Stimulierbarkeit der neutrophilen Granulozyten durch ANCA resultiert<sup>42</sup>. Diese Aktivierung erfolgt einerseits über die Vermittlung von Fc $\gamma$ -Rezeptoren (Fc $\gamma$ RIIa und Fc $\gamma$ RIIIb), andererseits über das Quervernetzen der Antigene auf der Zellmembran<sup>11,17,14,13</sup>. Dieses könnte erklären, wie eine vermehrte PR3-Membranexpression zu einer stärkeren Aktivierung der Granulozyten führen kann. Eine kürzlich publizierte niederländische Studie konnte den Einfluss der PR3 Membranexpression auf die Aktivierbarkeit durch ANCA nicht bestätigen<sup>46</sup>. Dieses kann jedoch zum großen Teil durch einen differenten experimentellen Ansatz dieser Gruppe erklärt werden. Die Autoren führten einen Vergleich der Aktivierbarkeit zwischen Granulozyten verschiedener Spender durch, was aber aufgrund der bekannt großen interindividuellen Schwankung potentiell sehr fehlerbehaftet ist. Zum anderen wurde in dieser Arbeit als Marker der Aktivierbarkeit der Granulozyten die Bildung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffradikale mittels der DHR-Methode (Durchflußzytometriemethode zur Messung von intrazellulärem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unter Verwendung von Dihydrorhodamine) definiert, wohingegen wir die bedeutendere Bildung extrazellulären Superoxides bestimmten.

Dass eine vermehrte Membranexpression der PR3 neben der Rolle als Risikofaktor für das Auftreten der ANCA-assoziierten Erkrankung auch den klinischen Verlauf der Erkrankung bestimmt, konnten wir in einer weiteren Arbeit darstellen<sup>45</sup>. Hier konnten wir darstellen, dass Patienten mit einem höheren Prozentsatz an Membran-PR3 exprimierenden neutrophilen Granulozyten mit klinischen Parametern der Erkrankungsschwere, wie der Nierenfunktion, dem Albuminspiegel

oder dem Grad der Anämie, korrelieren. Zudem bestand eine Korrelation zu der Nierenfunktion 5 Jahre nach Stellen der Initialdiagnose. Hingegen fanden wir hier keinen Einfluss auf die Rezidivhäufigkeit der Erkrankung, wie es von einer anderen Gruppe demonstriert wurde<sup>38</sup>.

Zusammenfassend konnten wir durch diese Arbeiten die Mechanismen der PR3 Membranexpression auf neutrophilen Granulozyten besser verstehen. Der Einfluss dieser heterogenen Antigenexpression auf die klinische Präsentation und den Verlauf der Erkrankung wurde etabliert, und es konnte letztlich erstmalig demonstriert werden, dass diese Antigenexpression einen direkten Einfluss auf die Aktivierbarkeit der Granulozyten durch ANCA besitzt.

In einer Reihe von *in vitro* Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen konnte überzeugend herausgearbeitet werden, dass ANCA IgG an membran-exprimierte Antigene auf neutrophilen Granulozyten binden und dadurch zu einer Aktivierung dieser Zellen führen. Zur weiteren detaillierteren Untersuchung der pathogenetischen Mechanismen dieser Erkrankung sind jedoch tierexperimentelle Untersuchungen dringend erforderlich. Zwar konnte überzeugend demonstriert werden, dass ANCA mit isolierten neutrophilen Granulozyten interagieren und diese aktivieren, doch ob diese Interaktion eine Bedeutung in der Entstehung der Vaskulitis besitzt, war unklar. Zudem wurde in mehreren Arbeiten postuliert, dass eine Antigenexpression in non-myeloiden Zellen existiert<sup>47,48,49</sup>.

Wir überprüften diese Hypothese durch einen tierexperimentellen Ansatz, der die komplexe *in vivo* Situation erfasst. Hier konnten wir beweisen, dass zirkulierende, aus dem Knochenmark stammende Zellen das primäre Ziel der ANCA darstellen und dabei notwendig und ausreichend für die Krankheitsinduktion durch ANCA (anti-MPO IgG) sind<sup>50</sup>. Bestätigend für diese Ergebnisse zeigte sich auch, dass durch die spezifische Depletion der neutrophilen Granulozyten im murinen Tiermodell die Erkrankung komplett verhindert werden kann<sup>34</sup>. Somit konnte mit Hilfe verschiedener experimenteller Ansätze experimentell eindeutig nachgewiesen werden, dass die Interaktion zwischen den ANCA und den neutrophil-exprimierten

Antigenen die zentrale Bedeutung in der Pathogenese der ANCA-assoziierten Vaskulitis besitzt.

Eine Bedeutung des Komplementsystems in der ANCA-assoziierten Vaskulitis war bisher nicht vermutet worden, da hier weder Immunglobulin- noch Komplementablagerungen detektierbar sind und zudem kein systemischer Komplementverbrauch zu verzeichnen ist. In einer Vorarbeit konnten wir hier erstmalig demonstrieren, dass der alternative Weg der Komplementaktivierung eine Bedeutung in der Pathogenese der Erkrankung besitzt und dass dabei die ANCA-stimulierten neutrophilen Granulozyten der Vermittler der Komplementaktivierung sind <sup>36</sup>. Unsere weiteren Arbeiten konnten hierbei die Bedeutung der Generierung des Anaphylatoxins C5<sub>a</sub> als Vermittler eines autokrinen Aktivierungskreises identifizieren <sup>51</sup>. Durch eine pharmakologische Inhibition des Komplementfaktors C5 konnte dieses in einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt werden <sup>52</sup>. Diese Daten identifizieren eine bisher unbekannte Rolle des Komplementsystems in der ANCA-assoziierten Vaskulitis und ermöglichen potentiell, neue therapeutische Ansätze durch eine spezifische Komplementinhibition (insbesondere des C5<sub>a</sub>) zu entwickeln.

Mit dem experimentellen Nachweis, dass die Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und den ANCA IgG zur Induktion der Vaskulitis führt, sind neue, besser gezielte Therapien potentiell denkbar. Hierbei ist insbesondere eine spezifische Inhibition der Aktivierung der neutrophilen Granulozyten durch die ANCA ein Ansatz. Um diesen zu überprüfen, testeten wir, ob die Hemmung eines speziellen Signaltransduktionsweges eine therapeutische Option darstellen könnte. In diesen Experimenten konnten wir demonstrieren, dass die Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch ANCA durch eine spezifische Inhibition der PI3K $\gamma$  Isoform in einer verminderten Stimulierbarkeit durch ANCA resultiert und dass die *in vivo* Inhibition dieser Kinase zu einer deutlich verminderten Erkrankungsschwere führt <sup>53</sup>.

Unsere Erkenntnis, dass die PI3K $\gamma$  Isoform von essentieller Bedeutung für die Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch ANCA ist, identifiziert diesen Signaltransduktionsweg als ein potentielles neues spezifischeres Therapieziel.



## V. Zusammenfassung

Im Mittelpunkt der von mir durchgeführten Arbeiten der letzten 10 Jahre stehen die Krankheitsmechanismen in der Entstehung der humanen ANCA-assoziierten Vaskulitis und Glomerulonephritis. Ich führte dabei Untersuchungen im *in vitro* Zellaktivierungsmodell und im *in vivo* Tiermodell durch. Die Quintessenz der vorliegenden Untersuchungen ist, dass die ANCA-induzierte Glomerulonephritis durch die Interaktion zwischen den ANCA IgG und den neutrophil-exprimierten ANCA-Antigenen PR3 und Myeloperoxidase vermittelt wird. Hierbei wird eine inflammatorische Kaskade initiiert, welche mit der Membranexpression der PR3 auf den neutrophilen Granulozyten beginnt und über die Bindung der ANCA an diese, die nachfolgende Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege, wie des PI3K/Akt Weges bewirkt, die zur konsekutiven neutrophilen-vermittelten Gewebsschädigung und Vaskulitis führt. Wir beschreiben in dieser Kaskade einerseits die Mechanismen der Antigenexpression auf den neutrophilen Granulozyten und versuchen andererseits, die genauen Wege der Aktivierung der neutrophilen Granulozyten durch ANCA tierexperimentell und in der Zellkultur zur überprüfen.

Durch diverse *in vitro* Experimente konnten wir an humanen Zellen die Interaktion zwischen den Autoantikörpern und den neutrophil-exprimierten Antigenen genau charakterisieren. Diese Untersuchungen geben einen wichtigen Einblick in die Pathogenese dieser Erkrankung. Die Verwendung von tierexperimentellen Modellen der ANCA-induzierten Vaskulitis ermöglichte es uns zusätzlich, die Funktion spezifischer Proteine, Rezeptoren und Signaltransduktionswege in einem komplexen Tiermodell zu überprüfen. Hierbei wurden zahlreiche Methoden angewendet, wie die Nutzung von konventionellen Keimbahndeletionen, Knochenmarktransplantationen, Aufreinigung von Proteinen, immunhisto- und immunzytochemische Analysen, quantitativer RT-PCR, Western-Blot-Analysen, FACS-Analysen (neben diversen anderen Standardmethoden).

Im ersten Teil der Arbeiten lag der Schwerpunkt auf der detaillierten Charakterisierung und dem Verständnis der Membranexpression des ANCA-Antigens Proteinase 3 (PR3) auf neutrophilen Granulozyten. Wir zeigten hier, dass die sehr heterogene Membranexpression der PR3 einer genetischen Kontrolle unterliegt. Wir fanden eine signifikante Assoziation zwischen PR3-Membranexpression und der klinischen Manifestation der ANCA-Erkrankung. Darüber hinaus konnten wir erstmalig zeigen, dass die Membranexpression der PR3 unabhängig vom intrazellulären (Gesamtzell-) Gehalt an PR3 ist und somit durch eine unterschiedliche Membranpräsentation zu erklären ist. Dieses wurde dann später durch die Identifizierung eines PR3-Membranrezeptors bestätigt<sup>27,44</sup>. In einer Folgearbeit konnten wir demonstrieren, dass die Membranexpression der PR3 die Stimulierbarkeit der neutrophilen Granulozyten durch PR3-ANCA bestimmt, indem wir eine stärkere Aktivierung von Signaltransduktionswegen und eine vermehrte Generierung reaktiver Sauerstoffradikale demonstrierten. Dieses konnte zum ersten Mal erklären, wie die Membranexpression der PR3 den klinischen Verlauf der Erkrankung beeinflussen könnte.

Der nächste Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Identifizierung der primären Ziel- und Effektorzelle in der ANCA-assoziierten Vaskulitis im komplexen Tiermodell. Hierin konnten wir durch verschiedene Methoden darstellen, dass zirkulierende, myeloide, von dem Knochenmark gebildete Zellen das primäre Zell der ANCA darstellen und notwendig wie ausreichend zur Induktion der ANCA- Glomerulonephritis sind. Zudem war es uns möglich, ein neues und robusteres Tiermodell der anti-MPO induzierten Vaskulitis zu entwickeln, mit dem es uns im Weiteren möglich ist, die Erkrankung besser zu untersuchen. Wir verwendeten dieses optimierte Tiermodell für Untersuchungen zur Rolle des Komplementsystems in der Pathogenese der ANCA-assoziierten Vaskulitis und konnten hier insbesondere den Anaphylatoxinrezeptor für C5<sub>a</sub> als entscheidend herausarbeiten. Es war uns hierbei möglich, einen neuen Amplifizierungskreis der Aktivierung der neutrophilen Granulozyten durch ANCA zu identifizieren, welches durch die Generierung von C5<sub>a</sub> vermittelt wird.

Der letzte Teil der Arbeit beschäftigte sich mit den detaillierten Signaltransduktionswegen in der Aktivierung neutrophiler Granulozyte durch ANCA und hierbei mit dem Schlüsselweg der PI3K $\gamma$ . Wir konnten in dieser Arbeit diesen Signaltransduktionsweg als essentiell für die ANCA-induzierte Vaskulitis identifizieren. Die Erkenntnis, dass die spezifische pharmakologische Inhibition dieser Kinase zu einer deutlich reduzierten Erkrankungsschwere im Tiermodell der ANCA-induzierten Vaskulitis führte, könnte zur Entwicklung eines alternativen Therapiekonzeptes in der Behandlung der ANCA-assoziierten Vaskulitis führen.

## VI. Ausblick und weitere Vorhaben

Die zukünftigen Arbeiten werden sich mit der weiteren Untersuchung der pathogenetischen Prozesse in der ANCA-induzierten Vaskulitis und Glomerulonephritis beschäftigen. Hierbei konnten wir in unseren Arbeiten die zentrale Bedeutung der Interaktion zwischen den ANCA und den neutrophilen Granulozyten herausarbeiten. Die weiteren Arbeiten werden sich mit der detaillierten Untersuchung der weiteren Mechanismen der Induktion der Vaskulitis beschäftigen. Hierbei werden die diversen Funktionen der neutrophilen Granulozyten durch Verwendung von Tieren mit Keimbahndeletionen im komplexen Tiermodell der ANCA-assoziierten Vaskulitis untersucht werden. Ziel ist die Dissektion der spezifischen Rolle der verschiedenen Effektormechanismen der neutrophilen Granulozyten in der ANCA-assoziierten Vaskulitis. Hierbei werden wir uns mit der Bedeutung der zwei wichtigen Effektormechanismen neutrophiler Granulozyten beschäftigen: der Generierung reaktiver Sauerstoffradikale und der Degranulation von Serinproteasen.

Im ersten Teil werden wir auf die spezifische Bedeutung der Bildung reaktiver Sauerstoffradikale durch ANCA-stimulierte neutrophile Granulozyten fokussieren. Dazu werden verschiedene Knock-out Tiere verwendet werden, die keine suffiziente NADPH-Oxidase besitzen. Hierin zeigte sich in ersten Experimenten, dass die NADPH-Oxidase-defizienten Tiere ( $gp91phox^{-/-}$ ) überraschenderweise einen deutlich aggravierten Phänotyp der Glomerulonephritis entwickelten. Wir werden in den weiteren Untersuchungen dissezieren, worin der Mechanismus des stärkeren Phänotypes liegt. Erste Untersuchungen deuten hier auf eine essentielle Rolle der reaktiven Sauerstoffradikale für eine Suppression der Inflammation durch die Hemmung der Bildung des pro-inflammatorischen Zytokines IL-1 $\beta$  hin. Darüber hinaus soll die spezifische Rolle des Inflammasomkomplexes als essentieller Bestandteil des „innate“ Immunsystems in der ANCA-Vaskulitis untersucht werden.

In einem weiteren Schwerpunkt werden wir uns mit der Bedeutung der Serinproteasen in der Vermittlung des Gewebeschadens durch ANCA-stimulierte neutrophile Granulozyten beschäftigen. Serinproteasen werden als inaktive Proformen generiert, die eine Prozessierung durch das Enzym Dipeptidylpeptidase I (DPPI) benötigen. Hierbei werden wir DPPI-defiziente Tiere in dem anti-MPO ANCA Tiermodell anwenden, um die Rolle der Serinproteasen in der ANCA-Vaskulitis zu analysieren.

In einem weiteren Projekt werden wir den Schwerpunkt auf die Entwicklung eines anti-PR3 Tiermodells setzen und zudem im Tiermodell die Rolle der Membranexpression der PR3 untersuchen. Bisher ist kein suffizientes anti-PR3 Tiermodell entwickelt worden. Wir planen hier, transgene Tiere für das humane CD177 (PR3-Rezeptor) und transgene Tiere für das humane PR3 zu generieren. Im Weiteren werden doppelt-transgene Tiere durch Kreuzung dieser Stämme generiert werden. Diese Tiere sollten dann PR3 auf der Membran der neutrophilen Granulozyten präsentieren können. Durch einen passiven Transfer von humanen PR3-ANCA in diese Tiere ist dann perspektivisch der direkte Nachweis der pathogenen Bedeutung der PR3-ANCA zu führen. Zudem sind an diesen doppelt-transgenen Tieren diverse Untersuchungen der Membranexpression der PR3 möglich.

In einem weiteren Schwerpunkt werden wir uns mit der spezifischen Visualisierung der neutrophil-vermittelten Inflammation in der ANCA-induzierten Vaskulitis beschäftigen. Hierzu werden wir eine spezifische Darstellung der MPO-Aktivität im Gewebe mittels eines MPO-spezifischen Kontrastmittels im MRT erreichen.

Das ultimative Ziel dieser Untersuchungen ist es, in den ANCA-assoziierten Vaskulitiden die Pathogenese und die genauen Mechanismen im Detail besser zu verstehen und dadurch potentiell bessere und spezifischere Therapien entwickeln zu können.

## Literaturverzeichnis

1. Kussmaul, A., & Maier, R. Über eine bisher nicht beschriebene eigenthuehmliche Arterienerkrankung (Periarteriitis nodosa), die mit Morbus Brightii und rapid fortschreitender allgemeiner Muskellähmung einhergeht. *Dtsch Arch Klin Med* **1**, 484-518. (1866).
2. Wegener, F Ueber generalisierte septische Gefäßerkrankungen [About generalised septic vascular diseases]. *Verh Deut Pathol Ges* **29**, 202-210 (1936).
3. Woywodt, A., Haubitz, M., Haller, H. & Matteson, E.L. Wegener's granulomatosis. *Lancet* **367**, 1362-1366 (2006).
4. Jennette, J.C. u. a. Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum* **37**, 187-192 (1994).
5. Davies, D.J., Moran, J.E., Niall, J.F. & Ryan, G.B. Segmental necrotising glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology? *Br Med J (Clin Res Ed)* **285**, 606 (1982).
6. van der Woude, F.J. Anticytoplasmic antibodies in Wegener's granulomatosis. *Lancet* **2**, 48 (1985).
7. Falk, R.J. & Jennette, J.C. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N. Engl. J. Med* **318**, 1651-1657 (1988).
8. Goldschmeding, R. u. a. Wegener's granulomatosis autoantibodies identify a novel diisopropylfluorophosphate-binding protein in the lysosomes of normal human neutrophils. *J. Clin. Invest* **84**, 1577-1587 (1989).
9. Niles, J.L., McCluskey, R.T., Ahmad, M.F. & Arnaout, M.A. Wegener's granulomatosis autoantigen is a novel neutrophil serine proteinase. *Blood* **74**, 1888-1893 (1989).
10. Kain, R. u. a. Molecular mimicry in pauci-immune focal necrotizing glomerulonephritis. *Nat. Med* **14**, 1088-1096 (2008).
11. Porges, A.J. u. a. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies engage and activate human neutrophils via Fc gamma RIIa. *J. Immunol* **153**, 1271-1280 (1994).
12. Kettritz, R., Schreiber, A., Luft, F.C. & Haller, H. Role of mitogen-activated protein

- kinases in activation of human neutrophils by antineutrophil cytoplasmic antibodies. *J. Am. Soc. Nephrol* **12**, 37-46 (2001).
13. Kettritz, R., Jennette, J.C. & Falk, R.J. Crosslinking of ANCA-antigens stimulates superoxide release by human neutrophils. *J. Am. Soc. Nephrol* **8**, 386-394 (1997).
  14. Kocher, M., Edberg, J.C., Fleit, H.B. & Kimberly, R.P. Antineutrophil cytoplasmic antibodies preferentially engage Fc gammaRIIIb on human neutrophils. *J. Immunol* **161**, 6909-6914 (1998).
  15. Reumaux, D., Vossebeld, P.J., Roos, D. & Verhoeven, A.J. Effect of tumor necrosis factor-induced integrin activation on Fc gamma receptor II-mediated signal transduction: relevance for activation of neutrophils by anti-proteinase 3 or anti-myeloperoxidase antibodies. *Blood* **86**, 3189-3195 (1995).
  16. Woywodt, A. u. a. Circulating endothelial cells as markers for ANCA-associated small-vessel vasculitis. *Lancet* **361**, 206-210 (2003).
  17. Ben-Smith, A., Dove, S.K., Martin, A., Wakelam, M.J. & Savage, C.O. Antineutrophil cytoplasm autoantibodies from patients with systemic vasculitis activate neutrophils through distinct signaling cascades: comparison with conventional Fc gamma receptor ligation. *Blood* **98**, 1448-1455 (2001).
  18. Williams, J.M. u. a. Activation of the G(i) heterotrimeric G protein by ANCA IgG F(ab')<sub>2</sub> fragments is necessary but not sufficient to stimulate the recruitment of those downstream mediators used by intact ANCA IgG. *J. Am. Soc. Nephrol* **14**, 661-669 (2003).
  19. Falk, R.J., Terrell, R.S., Charles, L.A. & Jennette, J.C. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **87**, 4115-4119 (1990).
  20. Charles, L.A., Caldas, M.L., Falk, R.J., Terrell, R.S. & Jennette, J.C. Antibodies against granule proteins activate neutrophils in vitro. *J. Leukoc. Biol* **50**, 539-546 (1991).
  21. Csernok, E., Ernst, M., Schmitt, W., Bainton, D.F. & Gross, W.L. Activated neutrophils express proteinase 3 on their plasma membrane in vitro and in vivo. *Clin. Exp. Immunol* **95**, 244-250 (1994).
  22. Franssen, C.F. u. a. In vitro neutrophil activation by antibodies to proteinase 3 and myeloperoxidase from patients with crescentic glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol*

- 10**, 1506-1515 (1999).
23. Noronha, I.L., Krüger, C., Andrassy, K., Ritz, E. & Waldherr, R. In situ production of TNF-alpha, IL-1 beta and IL-2R in ANCA-positive glomerulonephritis. *Kidney Int* **43**, 682-692 (1993).
  24. Huugen, D. u. a. Aggravation of anti-myeloperoxidase antibody-induced glomerulonephritis by bacterial lipopolysaccharide: role of tumor necrosis factor-alpha. *Am. J. Pathol* **167**, 47-58 (2005).
  25. Halbwachs-Mecarelli, L., Bessou, G., Lesavre, P., Lopez, S. & Witko-Sarsat, V. Bimodal distribution of proteinase 3 (PR3) surface expression reflects a constitutive heterogeneity in the polymorphonuclear neutrophil pool. *FEBS Lett* **374**, 29-33 (1995).
  26. Witko-Sarsat, V. u. a. A large subset of neutrophils expressing membrane proteinase 3 is a risk factor for vasculitis and rheumatoid arthritis. *J. Am. Soc. Nephrol* **10**, 1224-1233 (1999).
  27. von Vietinghoff, S. u. a. NB1 mediates surface expression of the ANCA antigen proteinase 3 on human neutrophils. *Blood* **109**, 4487-4493 (2007).
  28. Johnson, P.A., Alexander, H.D., McMillan, S.A. & Maxwell, A.P. Up-regulation of the granulocyte adhesion molecule Mac-1 by autoantibodies in autoimmune vasculitis. *Clin. Exp. Immunol* **107**, 513-519 (1997).
  29. Grimminger, F. u. a. Neutrophil activation by anti-proteinase 3 antibodies in Wegener's granulomatosis: role of exogenous arachidonic acid and leukotriene B4 generation. *J. Exp. Med* **184**, 1567-1572 (1996).
  30. Williams, J.M. & Savage, C.O.S. Characterization of the regulation and functional consequences of p21ras activation in neutrophils by antineutrophil cytoplasm antibodies. *J. Am. Soc. Nephrol* **16**, 90-96 (2005).
  31. Kettritz, R. u. a. Phosphatidylinositol 3-kinase controls antineutrophil cytoplasmic antibodies-induced respiratory burst in human neutrophils. *J. Am. Soc. Nephrol* **13**, 1740-1749 (2002).
  32. Schlieben, D.J., Korbet, S.M., Kimura, R.E., Schwartz, M.M. & Lewis, E.J. Pulmonary-renal syndrome in a newborn with placental transmission of ANCA. *Am. J. Kidney Dis* **45**, 758-761 (2005).
  33. Xiao, H. u. a. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase



- cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *J. Clin. Invest* **110**, 955-963 (2002).
34. Xiao, H. u. a. The role of neutrophils in the induction of glomerulonephritis by anti-myeloperoxidase antibodies. *Am. J. Pathol* **167**, 39-45 (2005).
35. Pfister, H. u. a. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies against the murine homolog of proteinase 3 (Wegener autoantigen) are pathogenic in vivo. *Blood* **104**, 1411-1418 (2004).
36. Xiao, H., Schreiber, A., Heeringa, P., Falk, R.J. & Jennette, J.C. Alternative complement pathway in the pathogenesis of disease mediated by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Am. J. Pathol* **170**, 52-64 (2007).
37. Muller Kobold, A.C., Kallenberg, C.G. & Tervaert, J.W. Leucocyte membrane expression of proteinase 3 correlates with disease activity in patients with Wegener's granulomatosis. *Br. J. Rheumatol* **37**, 901-907 (1998).
38. Rarok, A.A., Stegeman, C.A., Limburg, P.C. & Kallenberg, C.G.M. Neutrophil membrane expression of proteinase 3 (PR3) is related to relapse in PR3-ANCA-associated vasculitis. *J. Am. Soc. Nephrol* **13**, 2232-2238 (2002).
39. Schreiber, A., Busjahn, A., Luft, F.C. & Kettritz, R. Membrane expression of proteinase 3 is genetically determined. *J. Am. Soc. Nephrol* **14**, 68-75 (2003).
40. Sibelius, U. u. a. Wegener's granulomatosis: anti-proteinase 3 antibodies are potent inducers of human endothelial cell signaling and leakage response. *J. Exp. Med* **187**, 497-503 (1998).
41. Ewert, B.H., Becker, M.E., Jennette, J.C. & Falk, R.J. Antimyeloperoxidase antibodies induce neutrophil adherence to cultured human endothelial cells. *Ren Fail* **17**, 125-133 (1995).
42. Schreiber, A., Luft, F.C. & Kettritz, R. Membrane proteinase 3 expression and ANCA-induced neutrophil activation. *Kidney Int* **65**, 2172-2183 (2004).
43. Little, M.A. u. a. Antineutrophil cytoplasm antibodies directed against myeloperoxidase augment leukocyte-microvascular interactions in vivo. *Blood* **106**, 2050-2058 (2005).
44. Bauer, S. u. a. Proteinase 3 and CD177 are expressed on the plasma membrane of the same subset of neutrophils. *J. Leukoc. Biol* **81**, 458-464 (2007).
45. Schreiber, A. u. a. Membrane proteinase 3 expression in patients with Wegener's granulomatosis and in human hematopoietic stem cell-derived neutrophils. *J. Am. Soc.*

- Nephrol* **16**, 2216-2224 (2005).
46. Hu, N. u. a. 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* **60**, 1548-1557 (2009).
  47. Brockmann, H. u. a. Proteinase-3 as the major autoantigen of c-ANCA is strongly expressed in lung tissue of patients with Wegener's granulomatosis. *Arthritis Res* **4**, 220-225 (2002).
  48. Hattar, K. u. a. Interaction of antibodies to proteinase 3 (classic anti-neutrophil cytoplasmic antibody) with human renal tubular epithelial cells: impact on signaling events and inflammatory mediator generation. *J. Immunol* **168**, 3057-3064 (2002).
  49. Mayet, W.J., Csernok, E., Szymkowiak, C., Gross, W.L. & Meyer zum Büschenfelde, K.H. Human endothelial cells express proteinase 3, the target antigen of anticytoplasmic antibodies in Wegener's granulomatosis. *Blood* **82**, 1221-1229 (1993).
  50. Schreiber, A., Xiao, H., Falk, R.J. & Jennette, J.C. Bone marrow-derived cells are sufficient and necessary targets to mediate glomerulonephritis and vasculitis induced by anti-myeloperoxidase antibodies. *J. Am. Soc. Nephrol* **17**, 3355-3364 (2006).
  51. Schreiber, A. u. a. C5a receptor mediates neutrophil activation and ANCA-induced glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol* **20**, 289-298 (2009).
  52. Huugen, D. u. a. Inhibition of complement factor C5 protects against anti-myeloperoxidase antibody-mediated glomerulonephritis in mice. *Kidney Int* **71**, 646-654 (2007).
  53. Schreiber, A. u. a. Phosphoinositol 3-kinase-gamma mediates antineutrophil cytoplasmic autoantibody-induced glomerulonephritis. *Kidney Int* (2009).doi:10.1038/ki.2009.420

## Danksagung

Zu allererst möchte ich meinen Eltern Christel Meyhöfer und Anton Schreiber danken. Ich danke Ihnen für die vielfältigen geistigen Anregungen, ihre nicht zu vernachlässigende materielle Förderung und vor allem ihre permanente Motivation dazu, mir mit Offenheit, Neugier, aber auch Gelassenheit und Selbstvertrauen, Dinge anzueignen. Nur durch ihre immer bestehende Unterstützung ist es mir möglich gewesen, diesen wissenschaftlichen und persönlichen Werdegang zu realisieren. Auch meinen beiden lieben Geschwistern Vera und Christoph Schreiber möchte ich danken, da sie mir in jeder Lebenslage stets zur Seite standen und mir immer wieder offenbaren, dass es neben der Medizin und Wissenschaft andere wichtige Facetten des Lebens gibt.

Meiner Lebenspartnerin Tabea Beeker gilt besonderer Dank, da sie mich mit viel Geduld und Liebe bei meinem Weg unterstützt. Insbesondere für die Toleranz gegenüber der von ihr in Kauf genommenen wissenschaftlichen Arbeit und meine zusätzlich bestehenden Interessen danke ich ihr.

Herrn Professor Dr. Ralph Kettritz danke ich für die umfassende wissenschaftliche und persönliche Betreuung und Unterstützung. Er führte mich behutsam an die wissenschaftliche Arbeit heran und lehrte mich, ein kritischer, kreativer und fokussierter Wissenschaftler zu sein. Insbesondere danke ich ihm aber dafür, dass er mich immer lehrte, die Wissenschaft nicht der Wissenschaft selbst wegen durchzuführen, sondern das Krankheitsbild und den Patienten dahinter zu sehen. Er ermöglichte eine lebhaft wissenschaftliche Atmosphäre, in der es mir erst möglich wurde, als eigenständig arbeitender Wissenschaftler zu gedeihen. Herrn Prof. Dr. med. h. c. Friedrich C. Luft danke ich sehr für sein stetiges Interesse an meiner Arbeit und seine stetige Unterstützung. Herr Professor Luft hat mich mehr als alles andere nachhaltig beeindruckt und geprägt. Die Synergie eines guten Kliniklers und guten Wissenschaftlers ist das von meinen beiden Mentoren, Herrn Professor Kettritz und Herrn Professor Luft, täglich vorgelebte Ideal.

Mein besonderer Dank gilt dem motivierten Laborteam und hier insbesondere Susanne Rolle, die mich seit meinen Anfängen im Labor begleitete, Sylvia Krüger, die hoch motiviert alle neuen Ideen in die Praxis umsetzt, und meiner lieben Kollegin und wissenschaftlichen Begleiterin Dr. med. Mira Choi.

Herrn Prof. J. Charles Jennette und Frau Prof. Hong Xiao möchte ich für die befruchtende Zeit in ihrem Labor danken, in welchem es mir möglich war, neue Aspekte dieser Erkrankung kennen zu lernen und mein methodisches Spektrum zu erweitern.

All den Patienten und gesunden Spendern, die erst durch ihre Blut- und Gewebeprobe 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,

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